

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - ICBS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - PPGCS

LÍVIA SANTIAGO TEIXEIRA VILELA

**Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* das espécies vegetais
Coccoloba mollis Casaretto, *Triplaris americana* Linnaeus, e *Coutarea
hexandra* (Jacq.) K. Schum.**

Maceió

2011

LÍVIA SANTIAGO TEIXEIRA VILELA

**Avaliação do potencial antimicrobiano *in vitro* das espécies vegetais
Coccoloba mollis Casaretto, *Triplaris americana* Linnaeus, e *Coutarea
hexandra* (Jacq.) K. Schum.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Eliana Maria Maurício da Rocha

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Lysete de Assis Bastos

Maceió.

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

V711a Vilela, Livia Santiago Teixeira.
Avaliação do potencial antimicrobiano in vitro das espécies vegetais
Cocoloba mollis Casaretto, *Triplaris americana* Linnacus e *Contarea hexandra*
(Jacq.) K. Schum / Livia Santiago Teixeira Vilela. – 2011.
88 f. : il.

Orientadora: Eliana Maria Maurício da Rocha.
Co-Orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de
Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Polygonaceae. 3. Rubiaceae. 4. Toxicidade.
5. *Artemia salina*. I. Título.

CDU: 579.222

Dedico:

*À minha família, esposo e em especial à
Maria Eduarda, luz de meus dias.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e por me acalmar nas horas em que pensei que nunca conseguiria seguir em frente, que com seu amor poderoso tornou essa conquista possível. Sei que posso contar com a ajuda d'Ele sempre que precisar.

A meus pais Manoel Messias Teixeira e Gina Santiago da Silva, e ao meu irmão Thiago Manoel Santiago Teixeira, por estarem sempre ao meu lado, esforçando-se sempre para proporcionar a melhor educação possível e pelo inestimável amor.

A meu esposo José Bruno de Freitas Vilela pelo exemplo de companheirismo, fidelidade, amor, amizade que me proporciona todos os dias e pelo melhor presente que a vida poderia nos dar que é nossa pequena Maria Eduarda.

A professora Dra. Eliana Maria Maurício da Rocha, pela confiança que depositou em mim aceitando me orientar a distância mesmo com tantos acontecimentos pessoais girando em torno disso, e por todo conhecimento transmitido.

A professora Dra. Maria Lysete de Assis Bastos, por aceitar o convite de me co-orientar sem ao menos saber se eu conseguiria seguir em frente, por ter sido uma verdadeira “mãe” ao transmitir seu conhecimento, e por toda paciência, dedicação, confiança e fé depositada em mim.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por dedicarem seu apertado tempo para nos passar seus conhecimentos.

A botânica do Instituto do Meio Ambiente, Rosangela Pereira de Lyra Lemos pela coleta e identificação do material vegetal.

A professora Dra. Lúcia Maria Conserva do Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais da UFAL e a toda sua equipe pelo preparo das amostras que foram testadas.

Aos colegas adquiridos nesse curso de pós-graduação, em especial Verônica (amiga para toda hora), Cris, Beth, Maria, Danielma (que me persegue desde a graduação!).

Aos amigos Rafael Vital e Ana Rúbia por toda ajuda prestada em meus momentos de dúvidas, pela paciência comigo, pelos momentos de alegrias que terminavam sempre em gargalhadas e pela inesquecível amizade.

As professoras Patrícia Sarmiento e Regina Sales por disponibilizarem seu tempo na hora da realização do teste in vivo.

As mestrandas em Química e Biotecnologia Patrícia Vasconcelos e Ana Soraya pela amizade, pela dedicação, pelos momentos de discussão sobre qual metodologia adotar, pela fé em tudo que faz.

A todos do Laboratório de Tratamento de Feridas da UFAL: Raíssa, Isabelle, Isis, Lidiane, Jeferson – e todos os outros que indiretamente contribuíram com essa conquista – por toda ajuda e pela grande amizade, que certamente será para a vida toda.

Aos órgãos de fomentos, FAPEAL, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte dessa valiosa conquista.

Não trazer a fé conosco é como ser apenas uma casca sem árvores, um rio sem água, uma casa sem chão, um céu sem estrelas.

Ivan Teorilang.

RESUMO

As infecções causadas por microrganismos são um sério problema de saúde pública, principalmente devido emergência de bactérias e fungos multiresistentes. Portanto, permanece a necessidade da busca de novas alternativas de tratamento, objetivo de vários grupos de pesquisa no mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o valor e incentiva o aproveitamento do conhecimento tradicional. O Brasil possui um grande acervo vegetal, e muitas plantas são consideradas medicinais. No entanto, apesar de várias delas serem utilizadas popularmente ainda não foram validadas cientificamente. A região Nordeste abriga uma vasta flora nativa com muitas espécies com propriedades terapêuticas, porém a maior parte ainda sem comprovação científica. Como exemplo, citam-se representantes das famílias Polygonaceae e Rubiaceae, sendo esta última a quarta família de maior diversidade entre as angiospermas. Na flora Alagoana encontram espécies destas duas famílias, como a *Coccoloba mollis* Casaretto (1844) (Polygonaceae), *Triplaris americana* Linnaeus (Polygonaceae) e *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae), cujos gêneros possuem espécies com registros sobre seu uso etnomedicinal. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos e frações obtidas destas espécies vegetais. Os testes foram conduzidos em placas de Petri pelo método de difusão em disco para avaliar o potencial antimicrobiano das amostras testadas, pela formação de halo de inibição frente à cultivos de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo BHI (infusão de cérebro e coração). As espécies vegetais foram também testadas para avaliação preliminar de sua toxicidade aguda, frente a larvas de *Artemia salina*. Das 69 amostras testadas, 17 delas apresentaram atividade contra *S. aureus*, a fração em metanol proveniente de extrato em diclorometano da raiz de *C. hexandra* foi considerada a mais promissora por ter apresentado maior percentual de inibição do crescimento bacteriano. Submetidas a determinação da CIM todas foram ativas com valores entre 125 e 500 µg/mL. Nenhuma das espécies vegetais apresentou atividade contra *P. aeruginosa*, ou contra *C. albicans*. Com relação à toxicidade frente *A. salina*, das 69 amostras submetidas ao teste preliminar 32 foram atóxicas. As demais foram submetidas ao teste quantitativo sendo 10 atóxicas. Entre as amostras que apresentaram toxicidade os valores de CL₅₀ variaram de 2,68 a 953,9 µg/mL. As três espécies vegetais apresentaram atividade antibacteriana frente *S. aureus*, com relação a toxicidade frente *A. salina*, das 27 amostras tóxicas, 17 são das espécies da família Polygonaceae, e as demais da espécie *C. hexandra* foram tóxicas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Polygonaceae. Rubiaceae. Toxicidade frente *Artemia salina*.

ABSTRACT

Infections caused by microorganisms are a serious public health problem, mainly due to the emergence of multi drug resistant bacteria and fungi. Thus, the search for new alternative therapeutic approaches remains, being the goal of several research groups worldwide. The World Health Organization (WHO) recognizes the value and encourages the use of traditional medicine knowledge. Brazil has a large number of plant species and many of them are considered medicinal. However, despite quite a lot of them are popularly used they were not scientifically validated yet. The Northeast region hosts an extensive native flora with many species showing therapeutic properties, but most of them scientifically unproven. As an example, there were representatives of the families Rubiaceae and Polygonaceae, the latter being the fourth largest family between angiosperms. Amongst Alagoas flora there are species of these two families, such as *Coccoloba mollis* Casaretto (1844) (Polygonaceae), *Triplaris americana* Linnaeus (Polygonaceae) and *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae), which genera have species cited by its ethnomedicinal uses. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of crude extracts and fraction obtained from these plant species. Tests were carried out in Petri dishes by the disk diffusion method to evaluate relative effectiveness of tested samples as antimicrobial agents, by measuring zones of inhibition on culture of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Candida albicans* (ATCC 10231). The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by microdilution in BHI broth (Brain Heart Infusion). Plant species were also tested against *Artemia salina* larvae for preliminary evaluation of its acute toxicity. Of the 69 samples tested, 17 were effective against *S. aureus*. The methanol fraction from the dichloromethane extract of the roots of *C. hexandra* was considered the most promising because it presented the highest percentage bacterial growth inhibition. Of the samples subjected to MIC determination all were active with values ranging from 125 to 500 µg/mL. None of the tested species were active against *P. aeruginosa* or *C. albicans*. Regarding the toxicity on *A. salina*, in preliminary tests 32 of the 69 tested samples were non-toxic. The others were submitted to quantitative test 10 of them exhibited non-toxic effects. Among the samples that showed toxicity LC50 values ranged from 2.68 to 953.9 µg/mL. The three plant species showed antibacterial activity against *S. aureus*. For toxicity against *A. salina*, the 27 toxic samples, 17 are species of the family Polygonaceae, and the rest of the species *C. hexandra* were toxic

Key words: Antimicrobial activity. Polygonaceae. Rubiaceae. Toxicity against *Artemia salina*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Coffea arabica</i> L.	20
Figura 2 - Mapa da distribuição dos Biomas no Brasil. Destaque para os biomas encontrados no Estado de Alagoas.	23
Figura 3 - <i>Polygonum punctatum</i> . Popularmente utilizada no tratamento de úlceras varicosas.	24
Figura 4 - Folha de <i>Coccoloba mollis</i> .	26
Figura 5 - <i>Triplaris americana</i> . A) Árvore com copa florada; B) Flores	28
Figura 6 - A) Flores de <i>Coutarea hexandra</i> ; B) Produto proveniente de cascas de <i>Coutarea hexandra</i> , comercializado para preparação em forma de chá.	30
Figura 7 - <i>Staphylococcus aureus</i> . A- Corado pelo método de Gram; B- Micrografia eletrônica.	33
Figura 8 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . A- Corada pelo método de Gram; B- Micrografia eletrônica; C- Placa de Petri contendo colônias de <i>P. aeruginosa</i> , evidenciando a pigmentação produzida por esta bactéria	35
Figura 9 - <i>Candida albicans</i> . A- Microscopia óptica; B- Micrografia eletrônica	36
Figura 10 - Esquema geral da obtenção das amostras testadas	38
Figura 11 - Escala de MacFarland. Destaque do tubo 5, equivalente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL	41
Figura 12 - Placa de Difusão em Disco. Destaque para os halos da amostra teste (seta vermelha) e do controle positivo (seta verde).	42
Figura 13 - Placa de microdiluição. Em destaque as linhas reservadas para os controles do experimento	44
Figura 14 - a) Cistos de <i>Artemia salina</i> em cubas de cor opaca e mantidas sob luz artificial. b) Placas contendo larvas de primeiro ínstar mantidas sob iluminação	45
Figura 15 - a) Placa utilizada na realização do teste preliminar. b) Placa de 12 poços usada no teste quantitativo	46
Figura 16 – Halos de inibição dos extratos de: A) <i>Coutarea hexandra</i> , B) <i>Triplaris americana</i> e C) <i>Coccoloba mollis</i> frente a <i>S. aureus</i> . Controle positivo (CP) – gentamicina (10 μ g) e controle negativo (CN) – Metanol.	51
Figura 17 - A) <i>P. aeruginosa</i> e B) <i>C. albicans</i> . Controles positivos (CP) – Ciprofloxacina (5 μ g) e Miconazol (50 μ g), para <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> , respectivamente. Controle Negativo (CN) – Metanol.	52
Figura 18: Esquema de redução do TTC.	55
Figura 19 - Placa de microdiluição na qual foi utilizado DMSO a 10% como solvente. Poços com coloração vermelha, indicando a presença de microrganismo. Nas setas verde, vermelha e preta estão o controle de crescimento, o controle negativo e o controle positivo, respectivamente.	57
Figura 20 - Placa de microdiluição das amostras solubilizadas em metanol. Poços com amostras (A). Ausência de vermelho não há crescimento de	58

S. aureus. Nas setas verde, vermelha e preta estão o controle de crescimento, o controle negativo e positivo, respectivamente.

- Figura 21: A) Extrato bruto em EtOH das folhas de *C. mollis*; B) Extrato bruto em EtOH da casca do caule de *C. mollis*; C) Fração CHCl₃ oriunda do extrato em MeOH do fruto fresco de *T. americana*; D) Fração CH₂Cl₂ oriunda do extrato em acetona da folha de *C. mollis*. * p < 0,05. 65
- Figura 22: A) Fração AcOEt oriunda do extrato em EtOH do caule com cupim de *C. mollis*; B) Fração MeOH/H₂O oriunda de extrato bruto em EtOH da casca do caule de *C. mollis*; C) Subfração CH₂Cl₂ oriunda da fração em CHCl₃ do extrato em Acetona das folhas de *T. americana*; D) Subfração C₆H₁₄ proveniente de Fração em C₆H₁₄ neutra oriundo do extrato em acetona das folhas de *T. americana*. * p < 0,05. 66
- Figura 23: A) Subfração MeOH proveniente de fração em CHCl₃ oriunda do extrato em MeOH do fruto de *T. americana*; B) Subfração AcOEt:MeOH (1:1) proveniente de fração em MeOH/H₂O oriunda de extrato bruto em MeOH do fruto fresco de *T. americana*; C) Extrato bruto em EtOH da casca do caule de *C. hexandra*; D) Fração CHCl₃ oriundo de extrato bruto em AcOEt da folha de *C. hexandra*. * p < 0,05. 67
- Figura 24: A) Fração AcOEt:MeOH (1:1) oriunda do extrato em AcOEt da folha de *C. hexandra*; B) Fração MeOH oriunda de extrato bruto em CH₂Cl₂ da raiz de *C. hexandra*; C) Fração AcOEt:MeOH (1:1) oriundo do extrato bruto em AcOEt da raiz de *C. hexandra*; D) Fração C₆H₁₄ oriunda do extrato bruto em C₆H₁₄ da raiz de *C. hexandra*; E) Subfração CH₂Cl₂ oriundo do extrato em CH₂Cl₂ da raiz de *T. americana*. * p < 0,05. 68
- Figura 25: A) Extrato bruto em EtOH da casca do caule de *T. americana*; B) Fração C₆H₁₄ oriunda do caule com cupim de *C. mollis*; C) Extrato bruto em EtOH da folha de *C. hexandra*. * p > 0,05. 69
- Figura 26: A) Fração C₆H₁₄ oriunda de extrato bruto em EtOH da folha de *C. hexandra*; B) Fração C₆H₁₄:MeOH (1:1) oriunda do extrato bruto em CH₂Cl₂ da raiz de *C. hexandra*; C) Fração MeOH proveniente de extrato bruto em AcOEt da raiz de *C. hexandra*. * p > 0,05. 69
- Figura 27: A) Fração MeOH/H₂O oriunda de extrato em MeOH de fruto fresco de *T. americana*; B) Subfração AcOEt:MeOH proveniente da fração em AcOEt do extrato bruto em MeOH de fruto fresco de *T. americana*; C) Filtração C₆H₁₄:AcOEt (1:1) proveniente da fração em AcOEt do extrato da folha em acetona de *T. americana*; D) Filtração AcEot proveniente de fração em AcOEt do caule com cupim de *C. mollis*. *p > 0,05. 70

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Extratos, frações e subfrações oriundas da espécie vegetal <i>Coccoloba mollis</i>	47
Quadro 2 - Extratos brutos, frações e filtrações oriundas da espécie vegetal <i>Triplaris americana</i>	48
Quadro 3 - Extratos brutos, frações e filtrações obtidas da espécie vegetal <i>Coutarea hexandra</i> .	49
Quadro 4: Amostras de <i>C. mollis</i> e <i>T. americana</i> atóxicas quando submetidas ao teste preliminar de toxicidade frente <i>Artemia salina</i> (TAS).	61
Tabela 1: Média dos halos e % de inibição das amostras oriundas das três espécies vegetais ativas contra <i>S. aureus</i> (100 µg/disco).	50
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) obtida pela técnica de microdiluição em caldo BHI, de frações e subfrações ativas contra <i>S. aureus</i>	56
Tabela 3 - Resultado quantitativo do TAS e valores de CL ₅₀ e IC ₉₅ das amostras de <i>C. mollis</i> , <i>T. americana</i> e <i>C. hexandra</i> .	63

LISTA DE SIGLAS

AcOEt - Acetato de etila

AMH - Ágar Müller Hinton

ASD - Ágar Sabouroud Dextrose

ATCC - American Type Cell Collection

BHI - Brain-Heart Infusion

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CL₅₀ - Concentração letal 50%

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMH - Caldo Müller Hinton

CTT - cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio

DMSO - Dimetilsulfóxido

EtOH –Etanol;

IC₉₅ - Intervalo de Confiança 95%

MeOH – metanol

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5-difeniltetrazólio

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS – Organização Mundial de Saúde

q.s.p. – quantidade suficiente para

SST - Solução Salina Tamponada

TAS – Toxicidade frente *Artemia salina*

UFAL – Universidade Federal de Alagoas

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

C₃H₆O – Acetona

C₄H₁₀O – Éter

C₆H₁₄ – Hexano

CH₂Cl₂ - Diclorometano

CHCl₃ – Clorofórmio

C₁₉H₁₅N₄Cl - cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Plantas Medicinais	20
3.2 Família Polygonaceae	23
3.2.1 Gênero <i>Coccoloba</i> P. Browne	24
3.2.2 Espécie <i>C. mollis</i> Casaretto (1844)	25
3.2.3 Gênero <i>Triplaris</i> Loefl	26
3.2.4 Espécie <i>Triplaris americana</i> Linnaeus	27
3.3 Família Rubiaceae	28
3.3.1 Gênero <i>Coutarea</i> Aublet	29
3.3.2 Espécie <i>C. hexandra</i> (Jacq.) K. Schum	29
3.4 Atividade Antimicrobiana	30
3.4.1 Microrganismos Estudados	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal	37
4.2 Preparação das Amostras	37
4.3 Difusão em Disco	39
4.3.1 Preparação dos Extratos e dos Discos Teste	39
4.3.2 Meios e Reagentes Utilizados	39
4.3.3 Preparo dos Microrganismos	41
4.3.4 Bioensaio	42
4.4 Microdiluição em caldo BHI	43
4.4.1 Preparo das Amostras e Material Utilizado	43
4.4.2 Microdiluição (Adaptada de Ayres <i>et al.</i> , 2008)	43
4.5 Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	44
4.5.1 Teste Preliminar	44
4.5.2 Teste Quantitativo	45
4.6 Análise Estatística	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47

5.1 Difusão em Disco.	47
5.2 Microdiluição em Caldo BHI	54
5.3 Teste de Toxicidade Frente <i>Artemia salina</i> Leach (TAS).	59
6. CONCLUSÕES	71
7. PERSPECTIVAS	72
REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

Medicina popular é um termo amplo utilizado quando se quer referir ao saber tradicional com base no conhecimento empírico, que passa de indivíduo para indivíduo por meios predominantemente orais (RODRIGUES, 2001). Abrange terapias com medicação à base de ervas, partes de animais ou minerais, e terapias sem medicação, como a acupuntura, as terapias manuais e as terapias espirituais (WHO, 2002). Em países nos quais os medicamentos alopáticos são dominantes, é comum referir-se a medicina tradicional como complementar, alternativa ou não-convencional (ALVES;SILVA, 2003).

A fitoterapia, ou seja, o uso de ervas medicinais *in natura* ou na forma de preparações farmacêuticas, é parte importante das muitas abordagens da medicina popular. As antigas civilizações, antes mesmo da invenção da escrita, utilizavam as plantas como fonte de alimentos, vestuário e habitação, assim como para tratamento e cura de suas enfermidades (LIMA *et al.*, 2001; TOMAZZONI *et al.*, 2006). Acredita-se, inclusive, que o primeiro terapeuta teria sido um agricultor ou pajé, fazendo uso tradicional ou ritual de chás, linimentos, inalações e fumigações para o alívio dos males de seus semelhantes (VALE, 2002).

O Brasil possui uma ampla diversidade genética vegetal, considerada das maiores do mundo. Apesar disto, menos de 10% das espécies foram avaliadas quanto a sua atividade biológica, e menos de 5% das espécies foram submetidas a estudos fitoquímicos (LUNA *et al.*, 2005). O Nordeste do Brasil possui uma variada flora nativa, com muitas espécies com propriedades terapêuticas de uso rotineiro, o que tem contribuído para sua conservação. Porém é necessária a aplicação de métodos controlados cientificamente na investigação do potencial fitoterápico para sua validação e aproveitamento racional (SANTOS *et al.*, 2006).

As infecções são um sério problema de saúde pública, particularmente porque muitas delas são causadas, por cepas de microrganismos resistentes ao arsenal terapêutico disponível (KUETE *et al.*, 2009). No ambiente hospitalar, local em que os antibióticos são utilizados por cerca de 30% dos pacientes internados, há ainda uma grande necessidade de fármacos com ação antimicrobiana, pela facilidade com a qual os microrganismos estão apresentando multirresistência (CHAMBERS; SANDE, 1996). A evolução dos antibióticos tem reduzido a incidência de doenças infecciosas, porém devido ao poder de mutação ou conjugação de certos

microrganismos surge a resistência a antibióticos anteriormente eficazes (YASUNAKA *et al.*, 2005). De acordo com a terminologia estabelecida, incluem na categoria de resistentes, os isolados bacterianos com crescimento *in vitro* em presença de concentrações plasmáticas de antimicrobianos, correspondentes aquelas obtidas com a dose terapêutica do medicamento (Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2009).

O acelerado processo de metabolismo e de reprodução das bactérias associado ao mecanismo de troca de material genético podem permitir que, ao longo do tempo, microrganismos sejam capazes de desenvolver formas de resistência intrínsecas à estrutura física celular, relacionadas à mutações, bem como à transferência para outras bactérias de genes de resistência aos antimicrobianos (OLIVEIRA; SILVA, 2008). Existem quatro mecanismos básicos que conferem resistência bacteriana aos antibióticos, quais sejam: a) degradação enzimática do medicamento; b) alteração do sítio de ação; c) diminuição da concentração intracelular do antimicrobiano (diminuição da permeabilidade – perda de porinas, alteração de sistemas de transporte na célula, afluxo ativo – eliminação do medicamento por bombas dependentes de energia); d) vias metabólicas alternativas (PINHATI *et al.*, 2010).

Neste início de século, a indústria farmacêutica tem focado sua atenção nas terapias à base de produtos naturais, como por exemplo, espécies vegetais relatadas pela medicina tradicional, com altos investimentos financeiros, em decorrência do aumento da multirresistência microbiana (SALAMA; MARRAIKI, 2010).

As plantas têm sido usadas ao longo da história, no tratamento de enfermidades que acometem o ser humano, dentre elas as doenças infecciosas. No entanto, ainda é modesto o volume de pesquisas científicas que comprovem tais propriedades. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece este valor terapêutico e incentiva o aproveitamento do conhecimento tradicional. Para a utilização de uma espécie vegetal com finalidade terapêutica, é fundamental o estabelecimento de segurança, eficácia e garantia de qualidade nas preparações (RATES, 2001; WHO, 2002; LAPA *et al.*, 2003).

A biodiversidade vegetal brasileira ainda é pouco conhecida e carente de comprovação científica com relação às suas propriedades medicinais. Atrelado a isso, persiste a necessidade de novas alternativas para o tratamento de

microrganismos resistentes, o que torna imperativo avaliar o potencial farmacológico de espécies vegetais nativas, para fins de validação do conhecimento popular.

Calcula-se que existam cerca de 650 espécies e 407 gêneros, distribuídos em 111 famílias, de uso etnomedicinal no nordeste do Brasil. Das 650 espécies 126 são consideradas tóxicas (AGRA *et al.*, 2008). Entre as já avaliadas quanto à atividade antibimicrobiana estão *Copaifera* spp. (Fabaceae), *Carpotroche brasiliensis* Endl. (Flacourtiaceae), *Rumex crispus*, *Polygonum persicaria*, *Rumex hastatus*, *Polygonum plebejum* (Polygonaceae) e as espécies vegetais *Gonzalagunia rosea* Standl e *Mitragyna Speciosa* pertencentes à família Rubiaceae (LIMA *et al.*, 2006; NIÑO *et al.*, 2006; BORCHARDT *et al.*, 2008; PARTHASARATHY *et al.*, 2009; HUSSAIN *et al.*, 2010a).

Espécies vegetais das famílias Polygonaceae e Rubiaceae estão presentes na flora alagoana. A primeira inclui mais de 800 espécies distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo. No Brasil, cerca de sete gêneros apresentam ocorrência espontânea, sendo *Coccoloba* o que apresenta maior número de espécies (MELO, 2000). A família Rubiaceae é composta por cerca de 640 gêneros e aproximadamente 10.700 espécies sendo incluída como a quarta família de maior diversidade das angiospermas (PEREIRA; BARBOSA, 2004).

Se de um lado a resistência aos antimicrobianos usados para tratamento de infecções, tem sido um problema de saúde pública, do outro a imensa variedade de espécies vegetais estimula a execução de estudos que possam contribuir para o conhecimento do potencial antimicrobiano de plantas alagoanas. Nesta perspectiva, o presente trabalho consistiu no estudo da avaliação da atividade antimicrobiana e de toxicidade *in vitro* de diferentes partes vegetais de duas espécies da família Polygonaceae [*Coccoloba molis* Cassereto (1844) e *Triplaris americana* L.] e uma da família Rubiaceae [*Couterea hexandra* (Jacq.) K. Schum].

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano de espécies vegetais da flora Alagoana.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e sub-frações das espécies vegetais *C. mollis*, *T. americana* (Polygonaceae) e *C. hexandra* (Rubiaceae);
2. Determinar a concentração inibitória mínima das amostras ativas;
3. Avaliar a toxicidade de extratos, frações e sub-frações utilizando o bioensaio com *Artemia salina* Leach.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais

Desde o início dos tempos o homem utiliza plantas com finalidade terapêutica, com base na observação de suas propriedades tóxicas ou curativas. Esta conduta levou, por exemplo, religiosas a utilizarem o cafeeiro selvagem (*Coffea arabica* L.) (Figura 1, p. 20) em suas atividades de vigília, uma vez que esta planta produzia efeito excitante nos herbívoros que dela se alimentavam (TOMAZZONI *et al.*, 2006).

No Egito, os papiros demonstram que por volta de 2.000 a.C. os médicos utilizavam as plantas como remédio e as doenças já não eram mais consideradas como a presença de espíritos malignos. Cerca de 1.500 a.C. o papiro de Ebers, menciona cerca de 700 diferentes substâncias incluindo, extratos de plantas, metais e venenos de origem animal de várias procedências (ALMEIDA, 1993; TOMAZZONI *et al.*, 2006).

Figura 1 - *Coffea arabica* L.

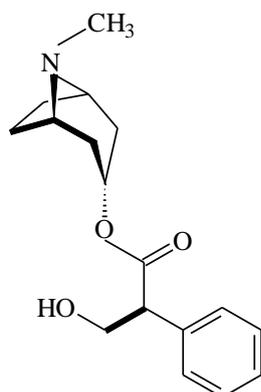
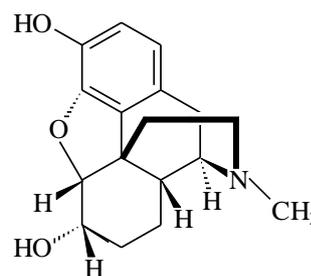
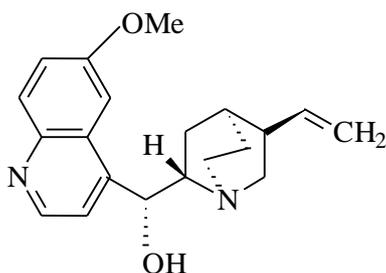
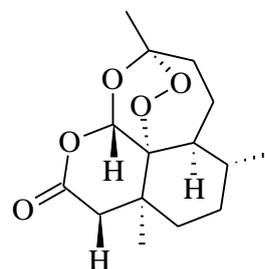


Fonte: URL: <http://www.arara.fr/BBCAFE.html>. Acesso em: 04/10/2010.

Os vegetais usados na forma de chás, emplastos, sucos, dentre outras formas caseiras de apresentação constituíram as principais alternativas terapêuticas, para o tratamento das doenças até a metade do século XX. A partir desta época, as plantas começaram a ser estudadas, com a finalidade de utilização das suas substâncias ativas isoladas, culminando com o surgimento de fármacos como atropina (1) extraída da *Atropa beladonna* L. (Solanaceae), morfina (2) da *Papaver*

somniferum L. (Papaveraceae), quinina (**3**) da *Cinchona* spp. (Rubiaceae), artemisinina (**4**), da *Artemisia annua* L. (Asteraceae).

Na década de 80 pesquisas científicas identificaram 121 compostos oriundos de metabólitos secundários de origem vegetal, provenientes de 95 espécies de plantas (ALVES, 2001; TOMAZZONI *et al.*, 2006).

**1****2****3****4**

A fitoterapia consiste no uso de plantas em seu estado natural ou na forma de medicamentos para o tratamento de uma determinada patologia. Com o advento da alopatia estes medicamentos foram deixados em segundo plano, porém os efeitos colaterais ou até mesmo seu alto custo trouxeram de volta o interesse pela fitoterapia. É importante ressaltar que apesar de apresentarem baixo custo e baixa toxicidade, quando utilizadas de modo incorreto as plantas medicinais podem causar intoxicação. No Brasil, pesquisas realizadas em gestantes da década de 80 demonstraram que 84,6% já haviam utilizado a fitoterapia como tratamento alternativo, até mesmo como abortivo (ALVES; SILVA, 2003).

A chamada medicina tradicional é utilizada em todas as partes do mundo, principalmente em regiões menos desenvolvidas onde os serviços de saúde modernos são limitados e os fitoterápicos são, muitas vezes, a única forma de tratamento. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a razão pela qual em

países desenvolvidos a população recorre ao uso de medicamentos de origem natural para o tratamento de enfermidades, são históricas ou culturais da região, mesmo havendo disponibilidade de recursos da medicina moderna. No entanto, nos países em desenvolvimento cerca de 80% da população dispõem exclusivamente das plantas medicinais no tratamento básico de saúde, como por exemplo, em países da África e da América Latina (WHO, 1999; AGRA *et al.*, 2008).

No ano de 2006 foi aprovada, na forma de decreto nº 5.813 pela Presidência da República, a Política Nacional de Práticas Integrativas e complementares no SUS, que garante à população Brasileira o acesso e uso de plantas medicinais pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006). No Brasil o registro, segurança, eficácia e qualidade dos fitoterápicos são realizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Caso seja comprovada a segurança do produto ele é liberado para comercialização (CARVALHO *et al.*, 2008).

O Brasil é detentor da maior variedade de espécies vegetais do mundo, porém menos de 10% delas foram avaliadas com relação aos seus aspectos biológicos e somente cerca de 5% foi submetida a estudos fitoquímicos detalhados (LUNA *et al.*, 2005). A flora brasileira possui cerca 55 mil espécies vegetais, que corresponde a aproximadamente 22% das espécies conhecidas no mundo. O potencial biológico da flora brasileira já havia sido observado pelos portugueses na ocasião do descobrimento do Brasil (CARVALHO, 2009).

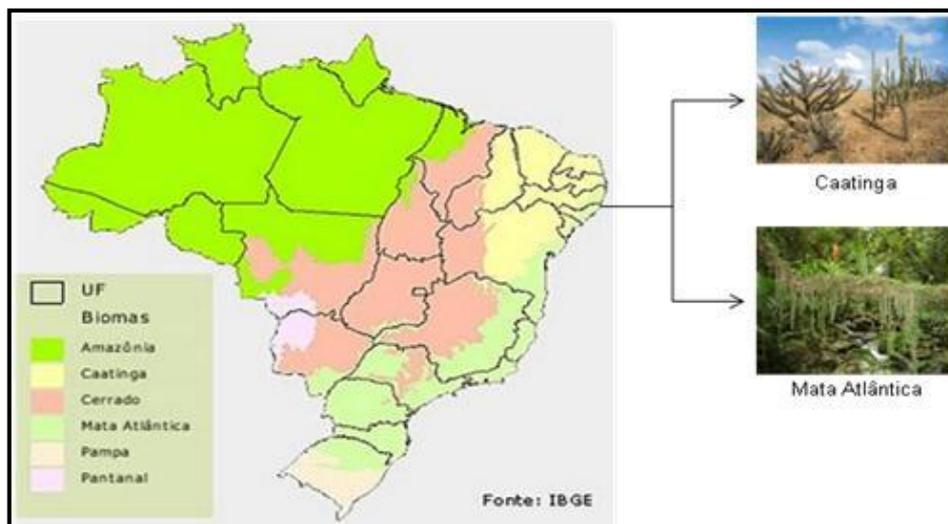
Das 650 espécies de uso etnomedicinal, cerca de 20% (126) são consideradas como exóticas e cultivadas em jardins, locais públicos entre outros, com fins ornamentais (AGRA *et al.*, 2008).

O estado de Alagoas abriga dois dos sete biomas encontrados no Brasil: a caatinga e a mata atlântica (Figura 2, p. 23). A caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro, com espécies vegetais que apresentam características adaptadas às condições adversas de clima quente e irregularidade pluvial (TROVÃO *et al.*, 2004).

A mata atlântica é um dos biomas mundiais mais representativos da biodiversidade do planeta, com múltiplos *habitats* onde ocorrem espécies vegetais endêmicas, normalmente ameaçadas de extinção (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

No presente estudo foram utilizadas espécies vegetais da Mata Atlântica alagoana, das famílias Polygonaceae e Rubiaceae. As espécies vegetais foram selecionadas por apresentarem, na literatura, diversas atividades biológicas que serão descritas a seguir (MANI; PARTHASARATHY, 2009).

Figura 2 - Mapa da distribuição dos Biomas no Brasil. Destaque para os biomas encontrados no Estado de Alagoas.



Fonte: URL: http://biodiversidadecpe.blogspot.com/2010/08/mapa-dos-biomas-brasileiros_05.html. Acesso em: 04/10/2010

3.2 Família Polygonaceae

A família Polygonaceae possui mais de 800 espécies incluídas em 40 gêneros distribuídos pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. No Brasil cerca de sete gêneros apresentam ocorrência espontânea, sendo *Coccoloba* o que apresenta maior número de espécies (MELO, 2000).

São plantas herbáceas ou lenhosas, facilmente reconhecidas pelos seus caules articulados, com nós e internós bem marcados, folhas simples e alternas com ócreas. Os caules articulados frequentemente são ocos e abrigam formigas de diferentes espécies. As inflorescências são formadas em cachos e perfumadas. A família apresenta frutos vistosos e em geral coloridos (MELO; FRANÇA, 2007).

As plantas pertencentes a esta família geralmente são utilizadas em ornamentação. Algumas espécies dos gêneros *Coccoloba* e *Triplaris* apresentam formigas em associação ao seu caule, porém esta relação ecológica ainda não se encontra bem definida (MELO; FRANÇA, 2007).

Existem relatos do uso popular de espécies da família Polygonaceae como anti-inflamatórios, anti-hemorroidais, antidermatogênicos, e em casos de feridas de

pele e diarreia com sangue (OLIVEIRA *et al.*, 1991; GUPTA, 1995; ONG; NORZALINA, 1999; HAMEED *et al.*, 2008, OLIVEIRA *et al.*, 2008b).

Nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil a espécie *Polygonum punctatum* (erva-de-bicho) (Figura 3, p. 24) é utilizada na fabricação de pomadas contra úlceras varicosas. No entanto, nem todas as espécies são aproveitadas na medicina popular, pois apresentam potencial de toxicidade (MELO; FRANÇA, 2007).

Figura 3 - *Polygonum punctatum*. Popularmente utilizada no tratamento de úlceras varicosas.



Fonte: URL: <http://www.earth-cards.com/smartweed.htm>. Acesso em: 05/10/2010.

3.2.1 Gênero *Coccoloba* P. Browne

Segundo a taxonomia descrita por Jaretzki (1925), o gênero *Coccoloba* encontra-se incluído na subfamília Polygonoideae, tribo Coccolobeae e tem como características folhas alternas com ócreas e frutos carnosos. São lenhosas, arbóreo-arbustiva e com caules articulados.

O gênero *Coccoloba* possui aproximadamente 400 espécies espalhadas principalmente pela região Neotropical. No Brasil existem 44 espécies (MELO, 2000). O gênero tem grande interesse florístico por ocorrer em diferentes formações vegetais, e algumas espécies são indicadas como marcadores fitogeográficos (MELO, 2004). Na composição química deste gênero são encontrados ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos, antraquinonas, benzenóides, terpenos, fitoesteróides e flavonoídes (DAN; DAN, 1986; SHAW *et al.*, 1992; LI *et al.*, 1999; BUCKLEY, 2001).

Dentre as atividades biológicas de algumas espécies do gênero podem-se citar atividade antibacteriana, antifúngica, antimutagênica, antimalárica,

hipoglicêmica, moluscicida e como inibidor da topoisomerase II (COTA *et al.*, 2003; LI *et al.* 1999; ANTOUN *et al.*, 1993; PEREZ *et al.* 2001; LUCAS *et al.* 1951; WALL *et al.* 1988; SOUSA; ROUQUAYROL, 1974).

3.2.2 Espécie *C. mollis* Casaretto (1844)

A espécie *C. mollis* (Figura 4, p. 26), conhecida popularmente como “folha-de-bolo” ou “falso-novateiro”, apresenta ampla distribuição na Costa Rica, Panamá, Colômbia, Venezuela, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Bolívia e Brasil. No Brasil a espécie se encontra presente nos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Mato Grosso, Acre, Rondônia, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro (MELO, 2004).

A planta possui 4 a 12 metros, de altura, copa reduzida e irregular, tronco tortuoso, revestido por uma casca fina. Quando sofre processos de queimada há rebrotamento na base dando origem a vários caules. Cresce de preferência em terrenos arenosos bem drenados, pode florescer por quase todo ano, porém, nos meses de setembro a dezembro a floração é mais evidente. Possui madeira de baixa qualidade e muito susceptível a decomposição. No caule pode-se evidenciar a presença de formigas. As flores são pequenas e bem perfumadas e o fruto quando maduro apresenta uma coloração arroxeadada. Suas folhas servem de alimento para bovinos (LORENZI, 1998a).

Com relação aos aspectos químicos dessa espécie há ocorrência de hidrocarbonetos e triterpenos nas folhas, e antraquinonas nas raízes (FERREIRA *et al.*, 2006; BARROS *et al.*, 2007). Oliveira e colaboradores (2008c) evidenciaram a presença de um triterpeno pentacíclico, diterpenos, fitoesteróis e benzenóides nas folhas e caule.

Tem sido relatado que esta espécie é popularmente utilizada em casos de perda da memória, e por isto em alguns lugares do Brasil é conhecida como “erva da memória”, além de ser utilizada em casos de estresse, insônia, anemia e impotência sexual (TSUBOY *et al.*, 2010).

Figura 4 - Folha de *Coccoloba mollis*.



Fonte: URL:<http://tudolevaapericia.blogspot.com/2009/11/maior-folha-do-mundo-coccoloba.html>.
Acesso em: 07/10/2010.

3.2.3 Gênero *Triplaris* Loefl

As espécies deste gênero podem alcançar de 2-20 metros, as folhas podem ser lanceoladas, glabras ou pubescentes, as flores são estaminadas, e pode apresentar fruto pseudosâmara, perianto frutífero e membranáceo (MELO, 2000).

Pertencente à subfamília Polygonoideae e a tribo Triplareae, o gênero *Triplaris* engloba cerca de 20 espécies espalhadas nas Américas Central e Latina (HUSSEIN *et al.*, 2005). As espécies deste gênero possuem uma relação mutualística com formigas arruivadas do grupo *Pseudomyrmex*. As formigas ocupam o ramo oco e tronco das árvores, e a planta recebe em troca proteção contra predadores uma vez que estes insetos possuem comportamento agressivo e a picada é muito dolorosa (WARD, 1999).

O gênero possui importância madeireira, em especial *Triplaris pachau* Mart., pois possui alto teor de celulose e lignina caracterizando uma madeira de boa qualidade, economicamente viável para geração de energia. Já *T. brasiliiana* Cham. é utilizada na produção de caixotaria e em embalagens leves, além de ser uma árvore ornamental (SILVA-BRAMBILLA; MOSCHETA, 2001).

Os registros sobre o uso etnomedicinal de espécies do gênero *Triplaris* são oriundos apenas da Bolívia e do Peru. As folhas e a casca são utilizadas para fins alucinógenos, como excitante energético, contra diarreia, disenterias, dores de estômago, enterite, febre, feridas, inflamações na garganta, lesões na pele

provocadas por leishmaniose, sarampo, tosse e verminoses (CORRÊA, 1984; LUNA, 1984; DUKE; VASQUEZ, 1994; DESMACHELIER *et al.*, 1996).

O conhecimento dos constituintes químicos do gênero ainda é pequeno, sendo relatada a presença de flavonóides glicosilados em *T. cumingiana* (HUSSEIN *et al.*, 2005). Oliveira e colaboradores (2008d) verificaram a presença de flavonóides glicosilados e ácido gálico em *T. americana*.

3.2.4 Espécie *Triplaris americana* Linnaeus

A espécie *Triplaris americana* L. (Figura 5A, p. 28) é popularmente conhecida como pau-formiga, pau-de-novato, novateiro-do-mato-grosso, formigueiro, novateiro e pau-de-formiga. Botanicamente tem como sinonímia *T. noli-tangere* Wedd e *T. formicosa* S. Moore (LORENZI, 1998b).

É uma espécie arbórea que pode atingir até 20 metros de altura e seu tronco pode variar de 30 a 40 centímetros de diâmetro. A sua madeira é utilizada em tabuado em geral e na confecção de caixotaria. A árvore é ornamental, tanto pela beleza de sua copa como pela sua floração (Figura 5B, p. 28). Tem preferência por solos úmidos e até mesmo alagados. Ocorre em matas da floresta latifoliada semidecídua (LORENZI, 1998b).

Possui atividade antioxidante, e antimalárica *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum* e *P. vinkei petteri* (MUÑOZ *et al.*, 2000). Na Bolívia existem relatos do uso etnomedicinal das folhas e cascas de *T. americana* no tratamento de infecções da garganta (VARGAS; QUINTANA, 1995 apud MUÑOZ *et al.*, 2000). Deharo e colaboradores (2004) comprovaram a inibição da agregação plaquetária da casca do caule de *T. americana* corroborando com o uso etnomedicinal desta em casos de metrorragia.

Figura 5 - *Triplaris americana*. A) Árvore com copa florada; B) Flores.



Fonte: URL: <http://www.tropicsphere.com/main/forums/viewtopic.php?f=2&t=8801>. Acesso em: 11/10/2010.

3.3 Família Rubiaceae

Inclui representantes de diferentes hábitos tais como árvores, arbustos subarbustos e ervas. Possui distribuição tropical principalmente na América do Sul. No Brasil a mata atlântica possui maior número de espécies. A família Rubiaceae é composta de aproximadamente 637 gêneros e 10.700 espécies sendo incluída como a quarta família de maior diversidade das angiospermas (PEREIRA; BARBOSA, 2004).

Muitos gêneros são endêmicos da região neotropical com cerca de 4.555 espécies (ANDERSSON, 1992). O maior gênero da família é *Psychotria* L. representado pelo mundo todo por aproximadamente 1.650 espécies (HAMILTON, 1989). Estima-se que no Brasil existam 96 gêneros (BARROSO *et al.*, 1986) e a região Nordeste pode ter 277 espécies distribuídas em 66 gêneros (BARBOSA *et al.*, 1996).

A família Rubiaceae possui grande número de espécies com importância econômica, ornamental, medicinal e alimentícia (MENDONZA *et al.*, 2004), incluindo: *Coffea arabica* L., fonte da cafeína (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), *Cinchona calisaya* Wedd. e *C. succirubra* Pav. ex Klotzsch usadas no tratamento da malária, *Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) Rich. como emética (PORTO *et al.*, 1997), *Uncaria tomentosa* D.C. útil no tratamento de câncer, alergias, artrites e infecções por vírus (WURM *et al.*, 1998), *Mitragyna ciliata* Aubrév & Pellegr., para doenças pulmonares,

disenteria, reumatismo e gonorréia, além de atividade antiinflamatória e analgésica (DONGMO *et al.*, 2006).

Alguns gêneros possuem relação com a fauna, sendo os frutos de representantes da tribo Gardenieae consumidos por muitos mamíferos e pássaros. A variedade nos tamanhos, formas e cores das flores são atrativos para polinizadores como abelhas, beija-flores, borboletas por suas características nectaríferas e odoríferas (GOMES, 1996).

Os compostos presentes na família são alcalóides (PHUONG *et al.*, 1999), antraquinonas (LING *et al.*, 2002), cumarinas (KOHLENER, *et al.*, 2001), saponinas (SAHPAZ *et al.*, 2000), e lignanas (CARBONEZI *et al.*, 1999).

3.3.1 Gênero *Coutarea* Aublet

O gênero conta com seis espécies espalhadas na América Latina do México até a Argentina. A *C. latiflora* e a *C. hexandra* são as únicas espécies do gênero com menções na medicina popular. São utilizadas como abortivas (RAO *et al.*, 1988), antimaláricas (BRANDÃO *et al.*, 1992), antidiabéticas (ALMEIDA *et al.*, 1991), contra febre tifóide, antidiarréicas, contra dermatites, nefrites e como tônicos (PEREZ *et al.*, 1984), antiinflamatórias (REHER *et al.*, 1983; ALMEIDA *et al.*, 1991), antidiuréticas (LOZYA, 1977), contra problemas de vesícula (WINKELMAN, 1986; BYE, 1986), hepatite (WINKELMAN, 1986) e enfermidades gastrointestinais (BYE, 1986).

Com relação aos estudos químicos deste gênero foram descritos flavonóides (REHER *et al.*, 1983; IINUMA *et al.*, 1987; DELLE MONACHE *et al.*, 1989), e 4-fenilcumarinas (AQUINO *et al.*, 1988; D'AGOSTINO *et al.*, 1989; 1990; DELLE MONACHE *et al.*, 1983; 1984; 1990).

3.3.2 Espécie *C. hexandra* (Jacq.) K. Schum

C. hexandra (Figura 6A, p. 30) tem distribuição neotropical sendo encontrada no México, América Central e do Sul (ANDERSSON, 1992). No Brasil é amplamente distribuída, nos estados do Rio de Janeiro, Amazonas, Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Mato Grosso, entre outros (PEREIRA; BARBOSA, 2004). Barbosa e colaboradores (1996) citaram a presença desta espécie no Nordeste Brasileiro em

vários ecossistemas desde o litoral ao semi-árido, e na Paraíba foi registrada numa área remanescente de Mata Atlântica.

Esta espécie possui entre 3 a 5 metros de altura, com ramos lisos a parcialmente estriados, folhas pecioladas, e inflorescências terminais. Floresce nos meses de fevereiro, março, abril, maio e novembro e frutifica nos meses de fevereiro, maio e junho (PEREIRA; BARBOSA, 2004)

No Nordeste é conhecida como “quina-quina”, na região Sudeste é chamada de “murta-do-mato”, “quina-quina-branca”, “quina-do-Pará”, “quina-do-Piauí” e “amora-do-mato” (PEREIRA, 2007).

Esta espécie encontra-se comercializada para ser usada no tratamento de anemias, febres e inflamações, em formulações para loções, xampus e chás (Figura 6B, p. 30). No estado de Sergipe o chá da entrecasca de *C. hexandra* é utilizado como diurético, abortivo, antinociceptivo e antiinflamatório (LUCENA *et al.*, 2006).

Figura 6 - A) Flores de *Coutarea hexandra*; B) Produto proveniente de cascas de *Coutarea hexandra*, comercializado para preparação em forma de chá.



Fonte: URL: A) <http://bosque-santa.blogspot.com/2008/09/coutarea-hexandra.html>. B): <http://shopping.tray.com.br/oferta/quina-quina-murta-do-mato-coutarea-hexandra-100-grm/id:257253>.

3.4 Atividade antimicrobiana

Denominam-se antimicrobianos aqueles fármacos capazes de inibir o crescimento e proliferação de bactérias e fungos. Este termo foi introduzido com a descoberta da penicilina por Fleming no ano de 1928, sendo o primeiro antibiótico produzido em escala mundial (PEREIRA; PITA, 2005).

Os antimicrobianos contribuíram para a diminuição da morbidade e mortalidade das doenças infecciosas de origem bacteriana. Com o surgimento da

penicilina e das sulfonamidas houve aumento no isolamento e desenvolvimento de fármacos para o tratamento e profilaxia de patologias de origem microbiana (SILVA, 2006).

O uso de plantas medicinais na terapia antimicrobiana tem sido observado desde os tempos antes de Cristo quando os Babilônios usavam cataplasmas de alho (*Allium sativum* L.) para o tratamento de feridas contaminadas. Isto acontece graças à atividade da alicina presente no alho, que lhe confere ação antimicrobiana (CAVALLITO; BAILEY, 1944). Saravanan e colaboradores (2010) estudaram a atividade antimicrobiana do *A. sativum* e constataram o alto poder antimicrobiano para várias bactérias.

Devido à resistência bacteriana aos antibióticos padrões disponíveis no mercado, surge a necessidade de pesquisas para obtenção de novos produtos, inclusive naturais, com propriedades antibióticas (OLIVEIRA *et al.*, 2008d). A procura de novos fármacos com ação antimicrobiana tem levado os cientistas a investigar a interação do microrganismo com o medicamento, visto que desde a década de 80 o número de antibióticos em desenvolvimento tem diminuído, enquanto a resistência dos microrganismos tem crescido (FILE Jr, 2000). Estes estudos são conduzidos com microrganismos epidemiologicamente importantes como o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos leveduriformes como *Candida albicans* (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os microrganismos podem escapar da ação dos antimicrobianos por vários caminhos entre eles: alteração na estrutura molecular dos antimicrobianos, produção de enzimas que inativam o princípio ativo, alteração das proteínas ligadoras da penicilina, alvos modificados da DNA-girase, mutações de permeabilidade e modificações cromossômicas (FILE Jr., 2000)

Extratos, infusões ou emplastos são as formas de uso de plantas medicinais mais comuns no Brasil para o tratamento de infecções, sem nenhuma comprovação científica. Estudos farmacológicos realizados com óleos essenciais de 15 espécies aromáticas do Nordeste brasileiro demonstraram atividade coerente com o uso destas plantas na medicina popular com efeitos na contração muscular, analgésico, antiinflamatório, anticonvulsivante e antibacteriano (HOLETZ *et al.*, 2002).

Pesquisas com a finalidade de encontrar novos agentes antimicrobianos entre a flora nativa são de particular interesse principalmente em um país que detém uma grande biodiversidade a exemplo do Brasil (MENG *et al.*, 2000). Existem diversas

técnicas de triagem para avaliar se um extrato vegetal tem ou não atividade antimicrobiana, porém poucos são os estudos que determinam qual o melhor método a ser usado. Os dois métodos mais utilizados são o de difusão em ágar através das técnicas do disco, poço ou *template* e diluição em caldo, conforme recomendação do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003).

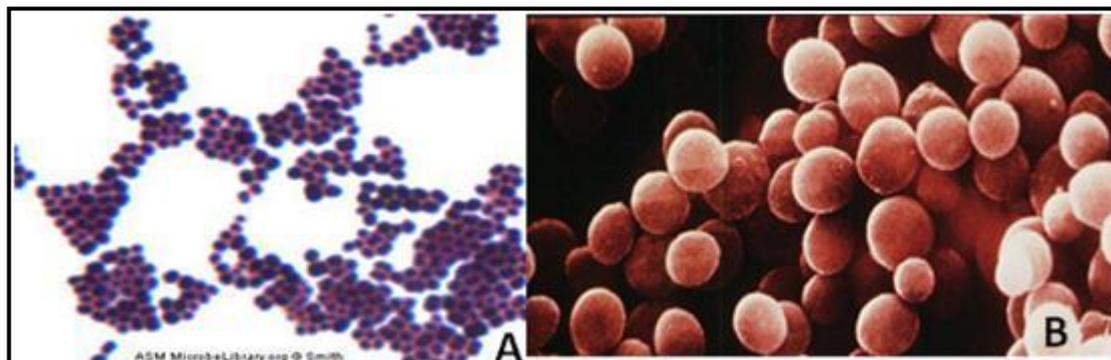
O teste de difusão em ágar é um método no qual o microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa num meio de cultura sólido. A atividade é avaliada através da relação entre o tamanho da zona de inibição de crescimento com a concentração da substância testada (PINTO *et al.*, 2003). A aplicação da substância em análise pode ser por meio de discos, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração do meio. Este método é utilizado para microrganismos de crescimento rápido e para alguns de crescimento difícil. O método padronizado recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009) baseia-se no descrito por Bauer e colaboradores (1966).

A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de origem vegetal é feita através da determinação da menor quantidade de substância capaz de inibir o crescimento do microrganismo em estudo, denominada Concentração Inibitória Mínima (CIM) (PINTO *et al.*, 2003). Este valor pode ser determinado através do método das diluições sucessivas realizadas tanto em caldo como em ágar (ALVES *et al.*, 2008).

3.4.1 Microrganismos estudados

O *Staphylococcus aureus* (Figura 7, p. 33) é uma bactéria Gram-positiva da família. Staphylococcaceae, que apesar de fazer parte da microbiota normal do corpo humano é um patógeno de grande importância visto que atua numa ampla gama de infecções. As doenças causadas por este microrganismo podem ser classificadas como superficiais, invasivas ou tóxicas. É uma bactéria capaz de causar infecção em feridas cirúrgicas, sendo mais grave em indivíduos com a imunidade comprometida (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Figura 7 - *Staphylococcus aureus*. A- Corado pelo método de Gram; B- Micrografia eletrônica.



Fonte: A) URL: <http://www.life.umd.edu/cbm/faculty/asmith/smith2.html>
 B) URL: <http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html>

As bactérias do gênero *Staphylococcus* podem ser divididas em coagulase positivas e negativas, devido à capacidade de coagular plasma, considerado importante marcador de patogenicidade. Das espécies coagulase positiva a principal responsável por infecções é o *S. aureus*. Já as coagulase negativas, como por exemplo, o *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus* sp coagulase negativo, também são causas de infecções especialmente no ambiente hospitalar em pacientes imunocomprometidos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

S. aureus é responsável por infecções na pele e no tecido subcutâneo, infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardite e bacteremia (LOWY, 1998). As infecções podem ser causadas por bactérias que colonizam o próprio indivíduo, por amostras provenientes de outros pacientes ou de portadores saudáveis. As infecções podem ser graves em recém-nascidos, pacientes cirúrgicos portadores de câncer, e diabéticos, sendo as cepas de *S. aureus* mais resistentes aquelas provenientes de ambiente hospitalar (TEIXEIRA *et al.*, 2008).

Segundo o Comitê de Doenças Infecciosas e Imunização da Sociedade de Pediatria Canadense (CPS-IDIC), são incomuns as transmissões ambientais e por vias aéreas, exceto em unidades de queimados e unidades de terapia intensiva, onde podem ocorrer casos de pacientes traqueostomizados com pneumonia por *S. aureus* (CPS-IDIC, 1999). O portador exerce papel importante na epidemiologia e na patogênese da infecção, sendo a maioria das infecções por este microrganismo endógenas (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

Até a década de 1960 o *S. aureus* era sensível à penicilina porém, por meio de seleção, cepas resistentes a este antibiótico tornaram-se um problema de saúde

pública uma vez que o referido antibiótico não surtia efeito. A criação do beta-lactâmico sintético (metecilina) foi a solução encontrada. Porém, surgiram evidências de que este microrganismo era também resistente a metecilina. Essas cepas foram então denominadas *S. aureus* resistentes a metecilina (MRSA), apresentando igualmente resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos (LOWY, 1998). A vancomicina passou a ser utilizada em portadores de MRSA, porém em 1996 foi registrada no Japão uma resistência reduzida e, em 2002, surgiram os primeiros registros de resistência plena de *S. aureus* frente à vancomicina (MIMICA; MENDES, 2007).

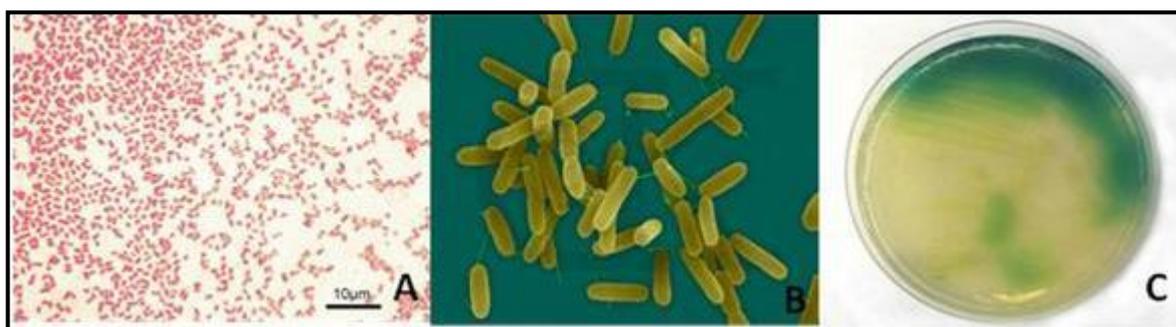
Pseudomonas aeruginosa (Figura 8, p. 35) é um bacilo Gram-negativo não fermentador encontrado no solo, água, vegetais, animais, alimentos e ambientes hospitalares. É um dos principais agentes causadores de infecções em pacientes imunocomprometidos, apesar de também provocar danos em pacientes imunocompetentes. É considerado um dos mais importantes patógenos de infecção hospitalar (LINCONPAN; TRABULSI, 2008). Este microrganismo foi isolado pela primeira vez em 1882 e recebeu o nome de *Bacillus pyocyaneus*, devido ao pigmento piocianina produzido por ele (FERRAREZE *et al.*, 2007). Pertencente a família Pseudomonadaceae, é uma bactéria aeróbia, porém pode crescer em meio anaeróbico desde que haja nitrato com acceptor terminal de elétrons. São capazes de produzir pigmentos solúveis em água, que se difundem em meios de cultivo como a piocianina (azul), pioverdina (verde), piomelanina (marrom), e piorrubina (vermelho) (LINCONPAN; TRABULSI, 2008). Esses pigmentos são facilmente visíveis a olho nu (Figura 8C, p. 35).

P. aeruginosa permanece como um dos microrganismos mais prevalentes como causadores de infecção hospitalar. Graças as suas características naturais de resistência ocupa lugar de destaque quando se trata de terapêutica (ARRUDA, 1998). Vários tipos de resistência foram identificados com relação à *P. aeruginosa*, como hiper-expressão de bombas de efluxo, produção de β -lactamases, perda ou pouca expressão das proteínas de membrana. Podem ser resistentes a diferentes antimicrobianos como cefalosporina de terceira e quarta geração e carbapenêmicos, por isto infecções causadas por cepas multirresistentes são um desafio na terapia antimicrobiana (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008).

Para transmissão de *P. aeruginosa* há necessidade de alterações das barreiras cutâneas e mucosas como traumas, cirurgias, queimaduras, transplante, e

imunodepressão fisiológica, terapêutica ou clínica (LINCONPAN; TRABULSI, 2008). Esta bactéria está frequentemente associada a infecção pulmonar em indivíduos com fibrose cística. É considerada a maior causa de morbidade e mortalidade para este grupo de pacientes, permanecendo nas vias respiratórias e contribuindo para casos de insuficiência pulmonar (STEHLING *et al.*, 2008).

Figura 8 - *Pseudomonas aeruginosa*. A- Corada pelo método de Gram; B- Micrografia eletrônica; C- Placa de Petri contendo colônias de *P. aeruginosa*, evidenciando a pigmentação produzida por esta bactéria



Fonte: A) URL: <http://www.pseudomonasaeruginosa.net/wp-content/uploads/2010/08/Pseudomonas-aeruginosa1.jpg>; B) URL: http://www.pseudomonas.com/p_aerug.jsp; C) URL: <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-03-2007.html>.

O fungo *Candida albicans* (Figura 9, p. 36), pertence à família das Saccharomycetaceae, é polimorfo, e pode ser oportunista ou patogênico (NOBRE *et al.*, 2002). Esta espécie pode causar infecções superficiais variando de doenças da pele e mucosas aos tecidos profundos, sendo responsável por 85% dos casos de candidíase (VAL; ALMEIDA FILHO, 2001; CROCCO *et al.*, 2004).

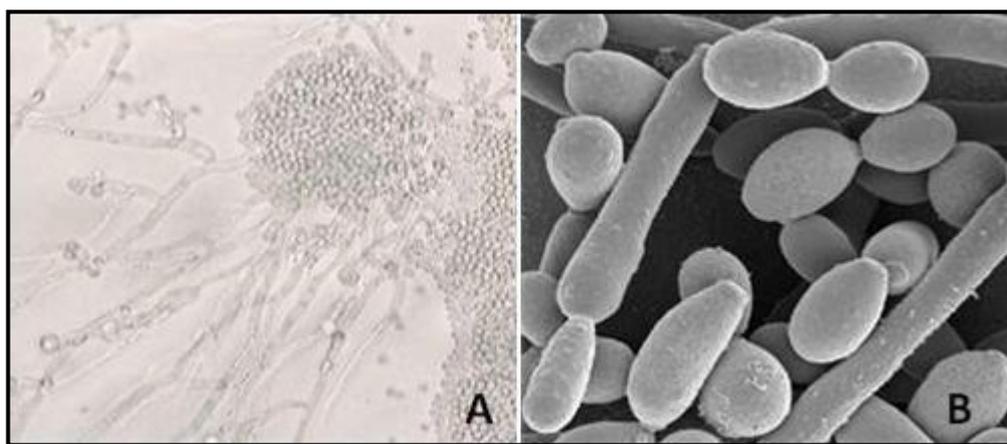
A candidíase expressa a variedade de relações que ocorrem entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, ou seja, do comensalismo à doença. Estas leveduras são responsáveis pela colonização, infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e sistêmicas em imunodeprimidos. A infecção do tecido subcutâneo provocada por *C. albicans* pode ser por contato direto, lesão ou disseminação hematogênica. Em alguns pacientes as lesões de pele podem ser o único sinal de infecção fúngica sistêmica (TUON; NICODEMO, 2006).

Segundo Menezes e colaboradores (2004), a candidíase pode apresentar-se: a) na forma cutânea, presente principalmente nas dobras do corpo humano, nos espaços interdigitais, nas pregas axilares, na nuca, na região interglútea e inguinal; b) na forma mucosa, sendo a mais comum a pseudomembranosa, caracterizada por

placas brancas removíveis, chamadas de aftas, ou vermelhas, lisas, pruriginosas e ardentes, que atingem principalmente a genitália feminina; e c) na forma sistêmica, com manifestações clínicas como candidíase pulmonar, endocardite, nefrite e fungemia, que podem levar o portador a óbito.

Por apresentar-se de várias formas essa doença necessita de utilização de diferentes métodos terapêuticos (CROCCO *et al.*, 2004). Apesar da contínua introdução de novos medicamentos com atividade antifúngica, estes ainda são em número limitado. Portanto, a demanda por novos antifúngicos justifica a busca por compostos mais eficazes e menos tóxicos do que aqueles já em uso (ZENG *et al.*, 2011).

Figura 9 - *Candida albicans*. A- Microscopia óptica; B- Micrografia eletrônica.



Fonte: A) URL: <http://naturalhealthbites.com/tag/candida/>;

B) URL: <http://medicineworld.org/news/news-archives/infectious-disease-news/787685315-Feb-14-2008.html>

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e Identificação do Material Vegetal

O material vegetal proveniente de *Coccoloba mollis* foi coletado no município de São Miguel dos Campos–AL em março de 2003. A espécie *Triplaris americana* foi coletada na Área de Proteção Ambiental de Santa Rita, na cidade de Marechal Deodoro–AL, e a *Coutarea hexandra* nas proximidades da Usina Coruripe, no município de Coruripe–AL, ambas em abril de 2005. Todo material vegetal foi coletado e identificado pela botânica Rosângela Pereira de Lyra Lemos do Instituto de Meio Ambiente (IMA-AL) onde as exsiccatas foram depositadas sob os números MAC-17274, MAC-22953 e MAC-22943 para *C. mollis*, *T. americana* e *C. hexandra*, respectivamente.

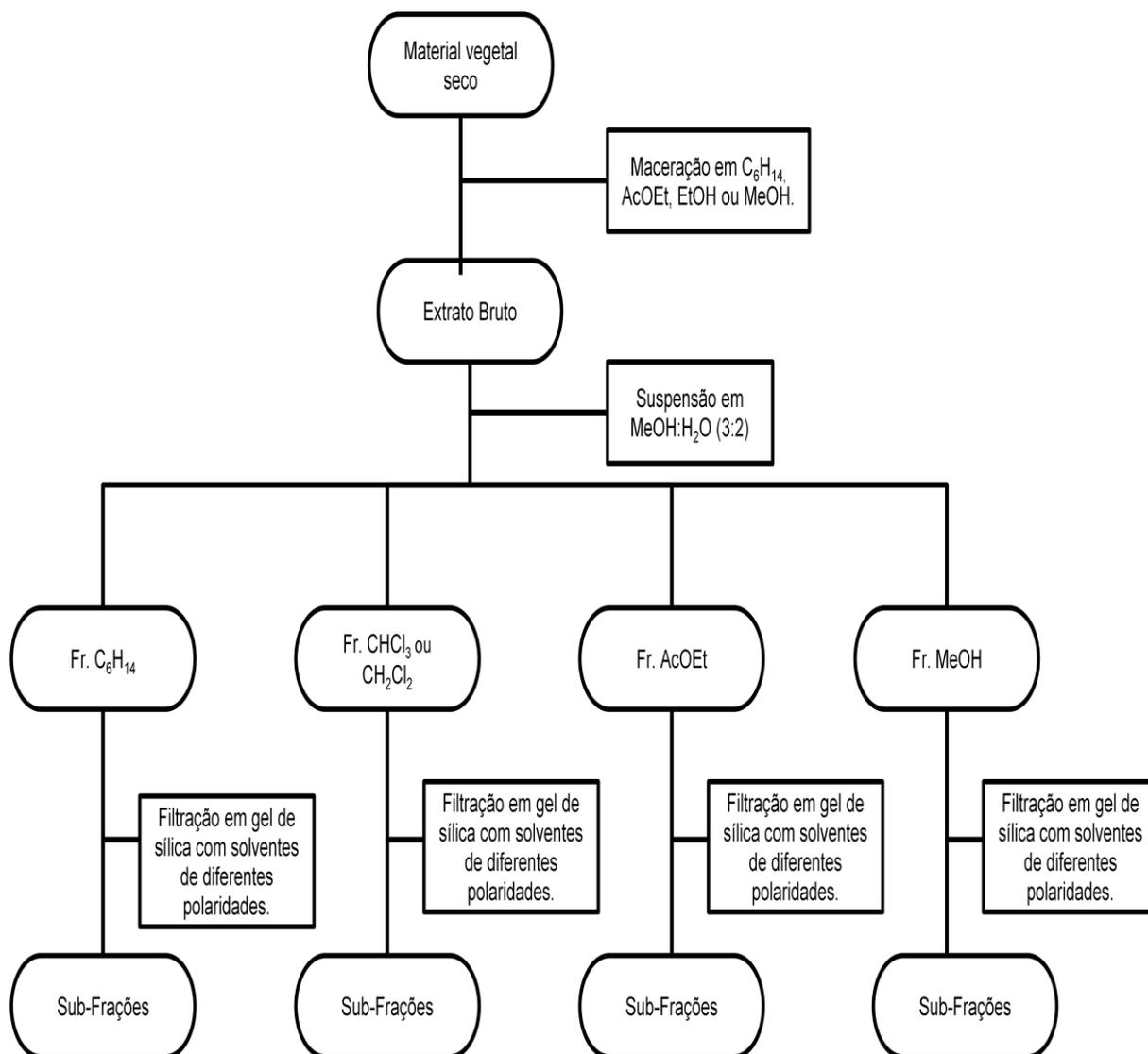
4.2 Preparação das Amostras

As diferentes partes das plantas após secagem à temperatura ambiente foram trituradas e individualmente maceradas com acetona e/ou etanol a 90%, exceto os frutos frescos e pedúnculo de frutos de *T. americana* que foram extraídos em hexano (C₆H₁₄) seguido de metanol (MeOH).

Os extratos brutos obtidos, após eliminação do solvente em evaporador rotatório foram suspensos numa solução de MeOH:H₂O (3:2) e extraídos em C₆H₁₄, diclorometano (CH₂Cl₂) ou clorofórmio (CHCl₃) e acetato de etila (AcOEt). Em alguns casos as frações foram tratadas com base e/ou filtradas em gel de sílica com solventes de diferentes polaridades (Figura 10, p 38).

Os extratos, frações e filtrações obtidos foram testados quanto ao seu potencial antimicrobiano frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Todo processo de preparação das amostras foi realizado pela equipe do Laboratório de Pesquisa Química de Produtos Naturais do Instituto de Química de Biotecnologia da UFAL sob supervisão da Professora Dra. Lúcia Maria Conserva.

Figura 10 - Esquema geral da obtenção das amostras testadas.



4.3 Difusão em Disco

A técnica de difusão em disco descrita por Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966), foi realizada para triagem com todas as amostras, para avaliação da atividade antimicrobiana.

4.3.1 Preparação das Amostras e dos Discos Teste

À 50 mg do extrato, fração ou subfração adicionou-se 1 mL de MeOH para obtenção de uma solução estoque de 5000 µg/mL. Quando necessário, para facilitar a solubilização, a mistura era deixada alguns minutos em sonicador (banho Maria de ultra-som). Discos de papel de filtro Whatman nº 1 de 6 mm foram confeccionados com auxílio de perfurador de papel e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Posteriormente, os discos foram colocados um a um, com auxílio de uma pinça estéril, em placas de poliestireno com 96 orifícios. Adicionou-se em cada poço 20 µL da solução estoque em triplicata (1000 µg/mL). Os discos foram mantidos na capela de fluxo laminar e, após secagem, eram tampados e levados a geladeira até o momento do uso.

4.3.2 Meios e Reagentes Utilizados

a) Brain-Heart Infusion (BHI): Utilizou-se 37g do pó dissolvido em 1 litro de água destilada. O meio era esterilizado em autoclave por 15 min. a 121 °C e posteriormente mantido em de geladeira até o momento do uso.

b) Ágar Müller Hinton (AMH): Este meio foi utilizado para os testes com as bactérias. Para prepará-lo utilizou-se 38 g do pó solubilizados em 1 litro de água destilada e esterilizado em autoclave por 15 min. a 121 °C. Em seguida, o meio era vertido em placas de Petri descartáveis de 90x15 mm em capela de fluxo laminar, onde permanecia por 24 horas para verificação da esterilidade. Após esse período as placas eram identificadas e guardadas em geladeira para serem usadas nos ensaios biológicos.

c) Ágar Sabouroud Dextrose (ASD): Este meio foi utilizado nos testes com fungo. Em seu preparo utilizou-se 65 g do pó dissolvido em 1 litro de água destilada. Após esterilização em autoclave por 15 min. a 121 °C, o meio era depositado em placas

de Petri descartáveis de 90x15 mm na capela de fluxo laminar, e deixado por 24h para verificação de sua esterilidade. Após este período as placas eram identificadas e levadas à geladeira até momento do uso.

d) Solução Salina Tamponada (SST): No preparo da SST utilizou-se 5,61 g de Cloreto de Sódio, 0,11 g de Cloreto de Potássio, 1,0 g de Fosfato de Potássio Monobásico e 2,0 g de Fosfato de Sódio Dibásico, solubilizados em 1 litro de água destilada e levados à autoclave a 121°C por 15 min. A SST era mantida em geladeira até o momento do uso.

e) Solução de Sulfato de Bário da Escala de McFarland: Foram utilizadas soluções padrões de turbidez, conhecida como Escala de McFarland (Figura 11, p 41), para padronização do inóculo dos microrganismos nos testes *in vitro*. Esta escala foi preparada utilizando-se 10 tubos de ensaio com tampa rosqueável, os quais receberam quantidades sequenciais de solução de Sulfato de Bário (BaSO_4) a 1% (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 mL) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) a 1% q.s.p. 10 mL. A turbidez de cada tubo corresponde respectivamente às seguintes densidades do inóculo (Unidades Formadoras de Colônias-UFC):

Tubo 1 – $1,5 \times 10^5$ UFC/mL	Tubo 6 – $3,0 \times 10^6$ UFC/mL
Tubo 2 – $3,0 \times 10^5$ UFC/mL	Tubo 7 – $6,0 \times 10^6$ UFC/mL
Tubo 3 – $6,0 \times 10^5$ UFC/mL	Tubo 8 – $9,0 \times 10^6$ UFC/mL
Tubo 4 – $9,0 \times 10^5$ UFC/mL	Tubo 9 – $1,5 \times 10^7$ UFC/mL
Tubo 5 - $1,5 \times 10^6$ UFC/mL	Tubo 10 – $3,0 \times 10^7$ UFC/mL

Nos testes utilizou-se o tubo nº 5 como referência para a densidade de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL (SILVA, 1999).

Figura 11 - Escala de McFarland. Destaque do tubo 5, equivalente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.



Foto original gentilmente cedida por Maria Lysete de Assis Bastos

4.3.3 Preparo dos Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos ensaios, oriundos do American Type Cell Collection (ATCC), foram as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e o fungo *Candida albicans* (ATCC 10231). A seleção dos microrganismos foi baseada na dificuldade em tratar as infecções causadas pelos mesmos, em decorrência da resistência aos antimicrobianos padrões.

Para ativação dos microrganismos foram colocados 10 a 15 mL de BHI em dois tubos de ensaio. Em cada tubo adicionava-se um disco do microrganismo, que era incubado por 24h a 35 °C para as bactérias, e durante 48h a 28 °C para o fungo. Após esse período o BHI assumia uma coloração turva, característica da presença do microrganismo ativado.

Com auxílio de uma alça de platina, os inóculos eram repicados em duas placas de Petri, contendo o meio apropriado para cada microrganismo. Após incubação em estufa por 24h a 35 °C para as bactérias, e durante 48h a 28 °C para o fungo, as placas com os microrganismos estavam prontas para a realização dos bioensaios.

4.3.4 Bioensaio

Com auxílio de uma alça de platina os microrganismos eram colocados em um Erlenmeyer contendo SST de modo a se obter uma densidade correspondente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, determinada por comparação com a escala de McFarland. Com ajuda de *swab* estéril as placas eram semeadas com esta suspensão microbiana.

Em cada placa eram depositados três discos testes impregnados com 20 μ L da amostra a ser testada, um disco de controle negativo impregnado com 20 μ L de metanol, e um disco controle positivo. Como controles positivos foram utilizados discos de gentamicina (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g) e miconazol (50 μ g) para os testes com *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, respectivamente. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata.

As placas com as bactérias eram incubadas por 24h a 35 °C, e com o fungo durante 48h a 28 °C. Os halos de inibição dos controles positivos e dos testes, quando presentes, eram medidos utilizando paquímetro (Figura 12, p 42). O percentual de inibição das amostras foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Média do halo de inibição das amostras testes}}{\text{Média do halo de inibição do controle}} \times 100$$

Figura 12 - Placa de Difusão em Disco. Destaque para os halos da amostra teste (seta vermelha) e do controle positivo (seta verde).



A avaliação da atividade antimicrobiana das amostras foi realizada levando em consideração os critérios adotados por Caceres *et al.* (1998), no qual amostras

com zona de inibição $\geq 75\%$ são considerados ativas, $\geq 25\%$ e $< 75\%$ moderadamente ativas e $< 25\%$ inativas.

4.4 Microdiluição em Caldo BHI

As amostras que no teste de difusão em disco apresentaram zona de inibição $\geq 25\%$ foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

4.4.1 Preparo das Amostras e Material Utilizado

Para preparo de uma solução estoque de 4.400 $\mu\text{g/mL}$, utilizou-se 4,4 mg da amostra em 1 mL de metanol, deixada em sonicador para auxiliar a solubilização.

Para realização deste teste utilizou-se BHI duas vezes concentrado (BHI 2x), obtido usando-se 74g do pó solubilizado em 1L de água destilada, esterilizado em autoclave por 15 min a 121 °C e mantido em geladeira até o momento do uso. Utilizou-se como revelador cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazolio (CTT) ($\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{Cl}$) a 0,02%. A preparação da SST bem como os microrganismos foi conduzida da mesma maneira que no teste de difusão em disco.

4.4.2 Microdiluição (Adaptada de Ayres *et al.*, 2008)

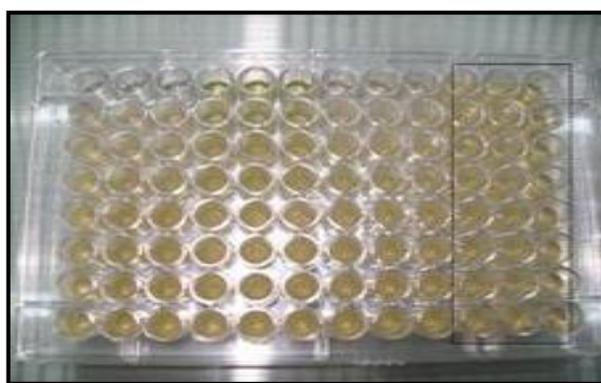
O teste foi realizado em placas estéreis de poliestireno com 96 poços. Todos os poços foram preenchidos com 100 μL de meio de cultura. Uma alíquota de 100 μL do extrato, fração ou subfração foram adicionados aos poços da primeira fileira. Após homogeneização foi realizada a diluição em série nos poços seguintes, e ao final o excedente era descartado. Em todos os poços foram adicionados mais 100 μL de meio para obtenção, ao final, das concentrações teste de 1000 $\mu\text{g/mL}$ até 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra teste. Posteriormente, adicionou-se 20 μL do inóculo solubilizado em SST ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL).

Três colunas foram reservadas para os controles. No controle de crescimento utilizou-se 150 μL de BHI duas vezes concentrado, 50 μL de solução salina e 20 μL do inóculo bacteriano. Para o controle negativo usou-se 150 μL de meio, 20 μL de inóculo e 50 μL do solvente utilizado para solubilização da amostra, e finalmente no

controle positivo 150 μ L de meio, 20 μ L de inóculo, e 50 μ L do antibiótico específico para cada microrganismo, na forma líquida. Ao final todos os poços continham o volume de 220 μ L (Figura 13, p 44).

As placas eram então levadas à estufa, e após 24 horas adicionavam-se 20 μ L do revelador CTT. Depois de nova incubação por mais três horas, procedia-se a leitura. O revelador confere a coloração vermelha na presença do microrganismo. A ausência de coloração foi interpretada como atividade da amostra avaliada.

Figura 13 - Placa de microdiluição. Em destaque as linhas reservadas para os controles do experimento



4.5 Toxicidade Frente à *Artemia salina* Leach

4.5.1 Teste Preliminar

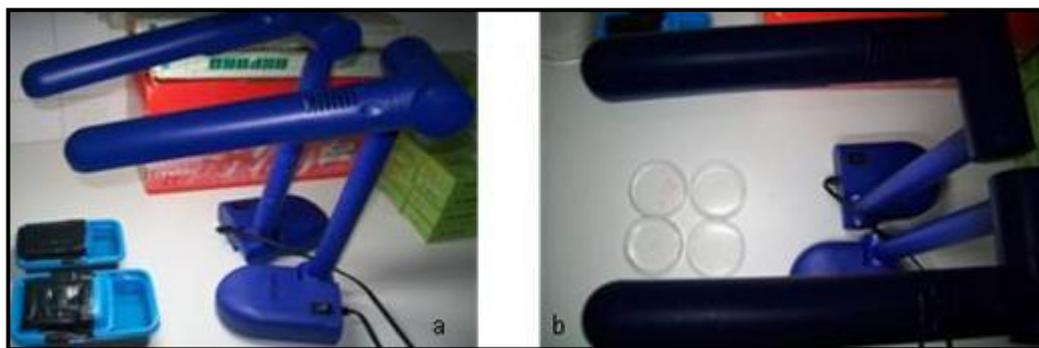
Utilizou-se 7,5 mg das amostras solubilizadas em 2,5 mL de água do mar com Dimetilsulfóxido (DMSO) a 1%, levadas ao banho de ultrassom para auxílio na solubilização. A solução estoque continha 3.000 μ g/mL da amostra.

Para realização do teste cistos de *Artemia* eram deixados em água do mar. Após um período de 24 a 48 horas as larvas eclodidas eram recolhidas para realização dos testes de toxicidade (CARBALLO *et al.*, 2002).

No presente trabalho, os cistos foram colocados para eclosão em uma cuba plástica artesanal opaca, contendo água do mar filtrada, tampadas até a metade (Figura 14a, p 45). Após um período de 24 horas sob a luz artificial as larvas de primeiro ínstar que eclodiram (náuplios) eram transferidas para placas de Petri e mantidas por mais 24 horas sob luz artificial para o desenvolvimento de larvas de

segundo ínstar (metanúplios), apropriadas para a realização do teste de toxicidade (MOLINA-SALINAS; SAID-FERNÁNDEZ, 2006) (Figura 14b, p 45).

Figura 14 - a) Cistos de *Artemia salina* em cubas de cor opaca e mantidas sob luz artificial. b) Placas contendo larvas de primeiro ínstar mantidas sob iluminação.



O teste foi realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços (Figura 15a, p. 46). Cada poço recebeu 100 μL de água do mar com 10 a 15 larvas. Foram testadas as concentrações de 1000, 100, 10 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Uma alíquota de 50 μL da solução estoque foi colocada nos três primeiros poços para obtenção da concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para as demais concentrações retirava-se 50 μL da solução anterior e adicionava-se a 450 μL de água do mar com DMSO a 1%. Esta mistura foi então homogeneizada e transferida aos três poços seguintes, procedimento este repetido até obtenção da menor concentração.

Como controle negativo foi usado 50 μL de água do mar com DMSO 1% e como controle positivo Timol 0,01%. As placas foram tampadas e mantidas sob luz artificial durante 24 horas. Após este tempo realizava-se a contagem das artemias com ajuda de microscópio estereoscópico. Os testes foram realizados em triplicata. A mortalidade das larvas foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de mortalidade} = \frac{\text{Número de artemias mortas por poço}}{\text{Número de artemias vivas por poço}} \times 100$$

4.5.2 Teste Quantitativo

As amostras que apresentaram no ensaio preliminar mortalidade maior ou igual a 30% na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram consideradas tóxicas. Estas amostras foram submetidas ao teste biológico quantitativo, a fim de determinar a

concentração atóxica.

O teste foi conduzido em triplicata em placas de poliestireno contendo 12 orifícios (Figura 15b, p 46). Em cada um foram depositados 1 mL de água do mar contendo 10 larvas de *Artemia salina*, amostras em diferentes diluições (1000, 500, 250, 125, 100, 50, 25, 12,5, 10, 5, 2,5, 1,25 e 1 $\mu\text{g/mL}$), completando o volume total para 5 mL/poço de água do mar com 1% de DMSO. Como controle negativo usou-se 1 mL de água do mar com 10 larvas e 4 mL de água do mar com DMSO a 1%. As placas foram mantidas sob luz artificial por 24 horas e lidas ao microscópio estereoscópico para verificar a mortalidade.

Os valores de CL_{50} (concentração que causa 50% de mortalidade), e os respectivos intervalos de confiança (IC_{95}), foram calculados e analisados usando o método de Probit (FINNEY, 1972).

Figura 15 - a) Placa utilizada na realização do teste preliminar. b) Placa de 12 poços usada no teste quantitativo.



4.6 Análise Estatística

O método estatístico de Finney (1972) de análise Probit (Probit analysis) foi utilizado para calcular os valores de CL_{50} e IC_{95} . A CL_{50} e IC_{95} das amostras que foram tóxicas em concentração $< 1\mu\text{g/mL}$ foram calculadas pelo pacote estatístico SAEG - *Software Analysis and Experimentation Group*, da Universidade Federal de Viçosa–MG. A análise de regressão foi realizada pelo programa GraphPad Prism versão 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Difusão em Disco

Das 69 amostras (extratos brutos, frações e subfrações) avaliadas pelo método de difusão em disco contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, 21 foram obtidas da espécie *Coccoloba mollis* (Quadro 1, p. 47), 38 da espécie *Triplaris americana* (Quadro 2, p. 48), e dez amostras da espécie *Coutarea hexandra* (Quadro 3, p. 49).

Quadro 1 - Extratos, frações e subfrações oriundas da espécie vegetal *Coccoloba mollis*

Parte da Planta	Extrato Bruto	Fração	Subfração
Folha	EtOH	-	-
	C ₃ H ₆ O	CH ₂ Cl ₂	-
	C ₃ H ₆ O	AcOEt	-
	C ₃ H ₆ O	MeOH/H ₂ O	-
Casca do caule	EtOH	-	-
	CH ₂ Cl ₂	-	-
	EtOH	MeOH/H ₂ O	-
	EtOH	C ₆ H ₁₄	-
	EtOH	AcOEt	-
	-	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt 1:1
	-	C ₆ H ₁₄ Neutra	MeOH
-	CH ₂ Cl ₂	MeOH	
Caule com cupim	EtOH	-	-
	EtOH	C ₆ H ₁₄	-
	EtOH	AcOEt	-
	-	C ₆ H ₁₄	-
	-	AcOEt	AcOEt:MeOH
	-	AcOEt	MeOH
	-	AcOEt	AcOEt
Caule	EtOH	MeOH/H ₂ O	-
	EtOH	AcOEt	MeOH

Quadro 2 - Extratos brutos, frações e filtrações oriundas da espécie vegetal *Triplaris americana*.

Parte da Planta	Extrato Bruto	Fração	Subfração
Pedúnculo dos frutos	MeOH	-	-
	MeOH	C ₆ H ₁₄	-
Folha	C ₃ H ₆ O	-	-
	EtOH	-	-
	C ₆ H ₁₄	EtOH	-
	C ₃ H ₆ O	MeOH/H ₂ O	-
	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ Ácida	-
	C ₃ H ₆ O	CHCl ₃	-
	C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄	-
	C ₃ H ₆ O	AcOEt	C ₆ H ₁₄ :AcOEt (1:1)
	C ₃ H ₆ O	CHCl ₃	AcOEt
	C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ Ácida	AcOEt
	C ₃ H ₆ O	CHCl ₃	CH ₂ Cl ₂
	C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ :AcOEt (1:1)
	C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ :AcOEt (8:2)
	C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄	MeOH
	C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ Neutra	AcOEt
	C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ Neutra	C ₆ H ₁₄
Casca do Caule	EtOH	-	-
	EtOH	CH ₂ Cl ₂	-
	EtOH	C ₆ H ₁₄	-
Raiz	EtOH	-	-
	EtOH	CHCl ₃	-
	-	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂
Caule	EtOH	MeOH/H ₂ O	-
	EtOH	CHCl ₃	-
	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ Ácida	-
	EtOH	CHCl ₃	MeOH
	EtOH	CHCl ₃	AcOEt:MeOH (1:1)
Fruto	-	C ₆ H ₁₄	-
	MeOH	AcOEt	MeOH
	MeOH	CHCl ₃	MeOH
	MeOH	CHCl ₃	CHCl ₃ :AcOEt(1:1)
Fruto Fresco	MeOH	CHCl ₃	-
	MeOH	MeOH/H ₂ O	-
	MeOH	AcOEt	AcOEt:MeOH (1:1)
	MeOH	MeOH/H ₂ O	MeOH
	MeOH	MeOH/H ₂ O	AcOEt:MeOH (1:1)

Quadro 3 - Extratos brutos, frações e filtrações obtidas da espécie vegetal *Coutarea hexandra*.

Parte da Planta	Extrato Bruto	Fração	Subfração
Casca do caule	EtOH	-	-
Raiz	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ MeOH (1:1)	-
	CH ₂ Cl ₂	MeOH	-
	AcOEt	MeOH	-
	AcOEt	AcOEt-MeOH (1:1)	-
	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄	-
Folha	EtOH	-	-
	EtOH	C ₆ H ₁₄	-
	EtOH	CHCl ₃	-
	AcOEt	AcOEt-MeOH (8:2)	-

Das 69 amostras testadas na concentração de 1000 µg/disco, 17 (24,6%) apresentaram halo de inibição frente a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (Tabela 1, p. 50). A média dos halos do controle positivo (gentamicina 10 µg/disco) foi de 27,4 mm e a média dos halos das amostras com atividade foi de 11,6 mm (Tabela 1, p. 50; Figura 16, p. 51).

Dentre as 17 amostras que apresentaram algum grau de inibição do crescimento microbiano, sete (41,2%) foram oriundas de frações e dez (58,8%) de subfrações. Nenhum extrato bruto apresentou atividade microbicida. A maior atividade biológica das frações e principalmente das subfrações pode ser explicada pelo fato de se tratar de misturas menos complexas, em comparação ao extrato bruto. Segundo Andrade e colaboradores (2004), os extratos brutos são constituídos de misturas complexas de substâncias e pigmento que podem causar efeito antagonista, podendo interferir no resultado final do experimento.

De acordo com os parâmetros adotados por Cáceres e colaboradores (1998) (descritos no item 4.3.4), das 17 amostras, uma (5,9%) pode ser considerada ativa (halo de inibição ≥75%), 15 (88,2%) moderadamente ativas (inibição ≥25% e < 75%) e uma (5,9%) inativa (inibição <25%). O percentual de inibição variou entre 10,9% a 123,1% (Tabela 1, p. 50).

Tabela 1 - Média dos halos e % de inibição das amostras oriundas das três espécies vegetais ativas contra *S. aureus* (100 µg/disco).

Espécie vegetal	Parte planta	Extrato bruto	Fração	Subfração	Média do halo (mm)	% de inibição	
<i>C. mollis</i>	Casca do caule	-	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (1:1)	3,0	10,9	
		-	C ₆ H ₁₄ Neutra	MeOH	7,0	25,6	
	Caule com cupim	-	AcOEt	AcOEt	9,3	34,1	
<i>T. americana</i>	Folha	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ Ácida	-	13,7	49,9	
		C ₃ H ₆ O	CHCl ₃	-	8,3	30,5	
		C ₃ H ₆ O	AcOEt	C ₆ H ₁₄ :AcOEt (1:1)	11,7	42,7	
		C ₃ H ₆ O	CHCl ₃	AcOEt	9,7	35,3	
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ ácida	AcOEt	13,7	49,9	
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ Neutra	AcOEt	19,0	69,5	
	Casca do caule	EtOH	CH ₂ Cl ₂	-	9,0	32,9	
	Raiz	-	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂	10,0	36,6	
	Caule	EtOH	CHCl ₃	-	8,3	30,5	
		C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ Ácida	-	8,0	29,3	
	Fruto	MeOH	CHCl ₃	CHCl ₃ :AcOEt (1:1)	12,0	43,9	
	Fruto fresco	MeOH	MeOH/H ₂ O	-	8,7	31,7	
		MeOH	AcOEt	AcOEt:MeOH	12,3	45,1	
	<i>C. hexandra</i>	Raiz	CH ₂ Cl ₂	MeOH	-	33,7	123,1
	Controle positivo	Gentamicina 10 µg/disco				27,4	100

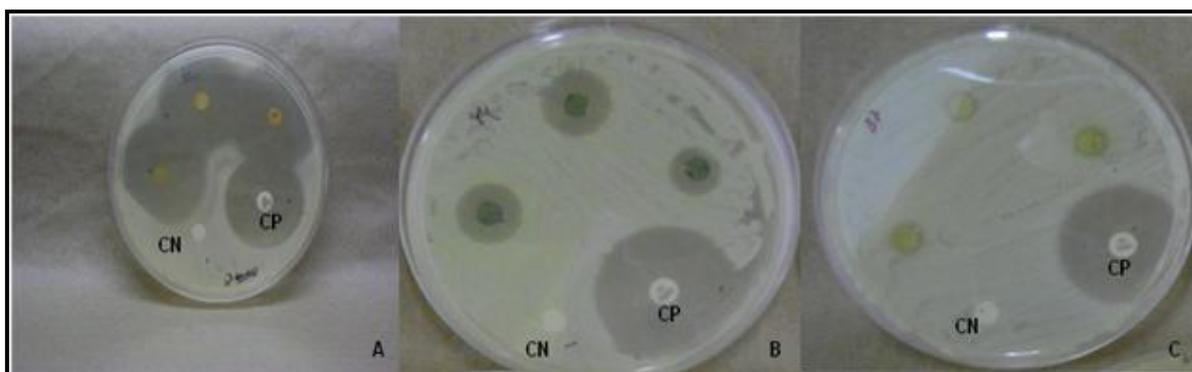
As espécies estudadas não apresentaram atividade contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Como controles positivos foram utilizados os antimicrobianos: ciprofloxacina (5 µg/disco) para *P. aeruginosa* e miconazol (50 µg/disco) para *C. albicans*. A média dos halos dos antimicrobianos foi de 28,3 mm e 21,1 mm para ciprofloxacina e miconazol, respectivamente (Figura 17, p. 52).

Das duas amostras com atividade antibacteriana provenientes da espécie *C. mollis*, a mais promissora foi a subfração em acetato de etila oriunda da fração em acetato de etila do caule com cupim (Tabela 1, p. 50). Oliveira (2007) avaliou os constituintes químicos por meio da cromatografia em camada delgada do caule da espécie *C. mollis* e verificou não haver diferença entre os compostos químicos mesmo quando havia associação com cupim em seu caule, portanto a atividade antibacteriana encontrada não sofreu interferência do inseto.

Com relação às amostras provenientes da espécie *T. americana* a mais ativa foi a subfração em acetato de etila oriunda da fração hexânica neutra do extrato da folha em acetona com percentual de inibição de 69,5%. A subfração em acetato de etila proveniente de fração hexânica ácida do extrato em acetona da folha de *T. americana* também apresentou atividade frente *S. aureus*, com percentual de inibição de 49,9%. Pode-se observar que a amostra oriunda da fração neutra foi mais promissora do que a de fração ácida (Tabela 1, p. 50).

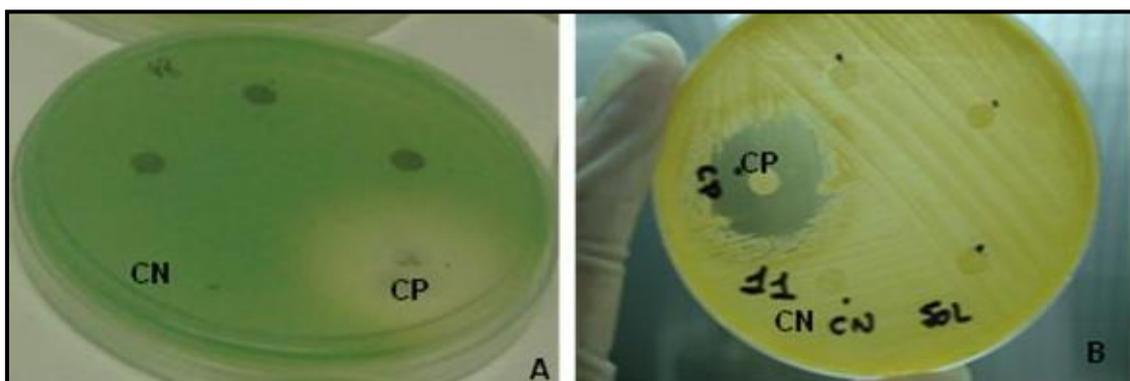
Dentre todas as espécies avaliadas a mais promissora foi a fração em metanol proveniente de extrato em diclorometano da raiz de *C. hexandra* com média de halo de inibição de 33,7 mm e percentual de inibição de 123,1% (Tabela 1, p. 50), portanto, superior ao halo da gentamicina que foi de 27,4 mm.

Figura 16 – Halos de inibição dos extratos de: A) *Coutarea hexandra*, B) *Triplaris americana* e C) *Coccoloba mollis* frente a *S. aureus*. Controle positivo (CP) – gentamicina (10µg) e controle negativo (CN) – Metanol.



De acordo com os parâmetros de Cáceres e colaboradores (1998), esta amostra pode ser considerada ativa contra *S. aureus*, sendo a mais promissora para a produção de um medicamento fitoterápico de ação bactericida.

Figura 17 - A) *P. aeruginosa* e B) *C. albicans*. Controles positivos (CP) – Ciprofloxacina (5 μ g) e Miconazol (50 μ g), para *P. aeruginosa* e *C. albicans*, respectivamente. Controle Negativo (CN) – Metanol.



Oliveira e colaboradores (2008b) avaliaram o potencial antimicrobiano *in vitro* do látex *in natura* seco, e extratos brutos de *Croton urucurana* (Euphorbiaceae) contra *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*, pela técnica de difusão em disco utilizando $1,0 \times 10^7$ UFC/mL nas concentrações de 0,062; 0,125; 0,250; 0,5 e 1,0 mg/disco. Os autores verificaram que todas as amostras avaliadas apresentaram potencial antimicrobiano contra pelo menos um dos microrganismos testados, exceto o extrato em acetato de etila que foi inativo. Observaram também que a ação antimicrobiana sofria variação na zona de inibição entre os extratos polares e apolares. Resultado semelhante foi encontrado no presente trabalho, uma vez que, grande parte das amostras que tiveram atividade frente *S. aureus* foi oriunda de extratos polares. Apesar das amostras oriundas de frações neutras serem menos polares que as ácidas, por serem ricas em ácidos graxos, e as ácidas em esteróides, no presente estudo a subfração em acetato de etila, oriunda da fração hexânica neutra do extrato da folha de *T. americana* em acetona, foi a mais promissora desta espécie quando comparada com a fração ácida.

Segundo Virtuoso e colaboradores (2005) o tamanho do halo de inibição é influenciado pela velocidade de difusão da amostra no meio. Portanto, as amostras apolares são mais lentas neste processo, o que pode contribuir para que apresentem pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana.

Caetano e colaboradores (2002) avaliaram extratos de plantas popularmente utilizadas como antiinflamatórias, quanto ao seu poder antimicrobiano frente cepas de *S. aureus* ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). Extratos provenientes do babaçu (*Orbignya martiana*, Arecaceae), na concentração de 30 mg/mL, apresentaram halo de inibição de 14 a 18 mm, sendo que a atividade antiinflamatória desta planta já havia sido descrita. A planta conhecida como cardo santo (*Argemone mexicana*, Papaveraceae) na concentração de 24,8 mg/mL apresentou tamanho médio do halo de inibição de 18 mm, e o extrato bruto de terramicina (*Alternanthera brasiliiana*, Amaranthaceae) na concentração de 65 mg/mL apresentou diâmetro médio do halo igual a 22 mm.

Neste estudo a média da zona de inibição foi de 11,6 mm, valor inferior aos descritos acima. Provavelmente a concentração da amostra avaliada deve influenciar no tamanho do halo uma vez que a concentração testada no presente trabalho foi de 1000 µg/mL (1 mg/mL). É possível que, se as amostras submetidas a análise fossem testadas em concentrações maiores, a média dos halos seriam superiores às encontradas.

Ulukanli e colaboradores (2005) avaliaram extratos de raiz e parte aérea de *Rumex crispus* (Polygonaceae), quanto ao potencial antimicrobiano pelo método de difusão em poço, frente a diversos microrganismos entre eles *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, alvos do presente estudo. Os extratos hexânicos e em acetato de raiz apresentaram atividade antimicrobiana frente *P. aeruginosa* com zona de inibição de 18 e 16 mm, respectivamente. Os extratos em acetona e metanol apresentaram atividade contra *S. aureus* com halos de 23 e 17 mm cada, mas apenas o extrato em acetona foi ativo frente *C. albicans* com halo de inibição de 17 mm. O extrato hexânico da parte aérea foi inativo contra esses microrganismos.

As amostras provenientes da família Polygonaceae mostraram atividade apenas contra *S. aureus*. Ulukanli e colaboradores (2005) observaram maior atividade de extratos vegetais frente a bactérias Gram-positivas em comparação à bactérias Gram-negativas. Resultado semelhante foi encontrado no presente estudo.

Segundo Essawi e Srour (2000) isto pode ser explicado pela complexidade da parede celular das bactérias Gram-negativas.

Duarte e colaboradores (2002) ao avaliarem o potencial antimicrobiano de *Polygonum hispidum*, também da família Polygonaceae, verificaram que tanto a decocção como a infusão do vegetal foram inativos contra *S. aureus*. No entanto, apresentaram atividade frente a *P. aeruginosa*. Embora a espécie *P. hispidum* pertença a mesma família de duas das espécies estudadas, os resultados encontrados por esses autores contrastam com os resultados da presente pesquisa.

Niño e colaboradores (2006) ao avaliarem *Dioicidendron diocum* e *Gonzalagunia rosea*, ambas da família Rubiaceae, contra vários microrganismos, inclusive os utilizados no presente estudo, verificaram que as amostras em diclorometano e metanol apresentaram atividade apenas contra *C. albicans* e *Fusarium solani*.

Neste estudo a fração metanólica oriunda de extrato em diclorometano da raiz de *Coutarea hexandra*, também da família Rubiaceae, apresentou-se ativa contra *S. aureus* com halo de inibição de 33,7 mm (Tabela 1, p. 50).

5.2 Microdiluição em Caldo BHI

As amostras ativas ou moderadamente ativas no teste de difusão em disco foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo BHI para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM é a menor concentração capaz de inibir satisfatoriamente o crescimento microbiano. O método de diluição em caldo permite fazer relação entre a proporção do crescimento do microrganismo no meio líquido e a concentração da substância testada comparado com um padrão biológico de referência.

Como controle positivo utiliza-se o quimioterápico padrão juntamente com a suspensão bacteriana em teste, e no controle negativo usa-se o meio de cultura, o reagente utilizado na solubilização da amostra, e a suspensão bacteriana (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Segundo Silva Junior e colaboradores (2009), a microdiluição é uma das técnicas mais utilizadas quando se deseja realizar uma triagem. Além de apresentar boa reprodutibilidade e possibilitar a avaliação da atividade antimicrobiana, proporciona a determinação da CIM dos extratos ativos.

A diluição em microplacas é uma técnica barata, 30 vezes mais sensível que outros métodos utilizados na literatura, e permite a avaliação de um grande número de amostras já que a quantidade necessária para o ensaio é menor se comparada a outros testes (OSTROSKY *et al.*, 2008).

O cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (CTT) é um reagente comumente utilizado na detecção de metabólitos de células eucarióticas. Ele produz hidrônio (H^+) na sua forma reduzida formando o trifenil formazan que possui coloração vermelha, indicador de atividade bacteriana (Figura 18, p. 55). Na ausência de um espectrofotômetro de microplacas, costuma-se utilizar este revelador na avaliação dos resultados do ensaio de microdiluição. Segundo Venzke e colaboradores (2008), o uso de CTT é eficiente na detecção do crescimento bacteriano pelo método de diluição em microplacas.

Das 16 amostras que apresentaram atividade contra *S. aureus*, 14 foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo. A fração em clorofórmio proveniente de extrato de caule em etanol e a fração em MeOH/H₂O oriunda de extrato bruto de fruto fresco em MeOH, ambas da espécie vegetal *T. americana*, embora tenham apresentado resultado satisfatório na técnica de difusão em disco (percentual de inibição maior que 30%), foram descartadas devido a contaminação por fungo. O resultado das amostras submetidas a avaliação da CIM está apresentado na Tabela 2, p. 56.

Figura 18: Esquema de redução do TTC. (Adaptado de VIEIRA, 2008).

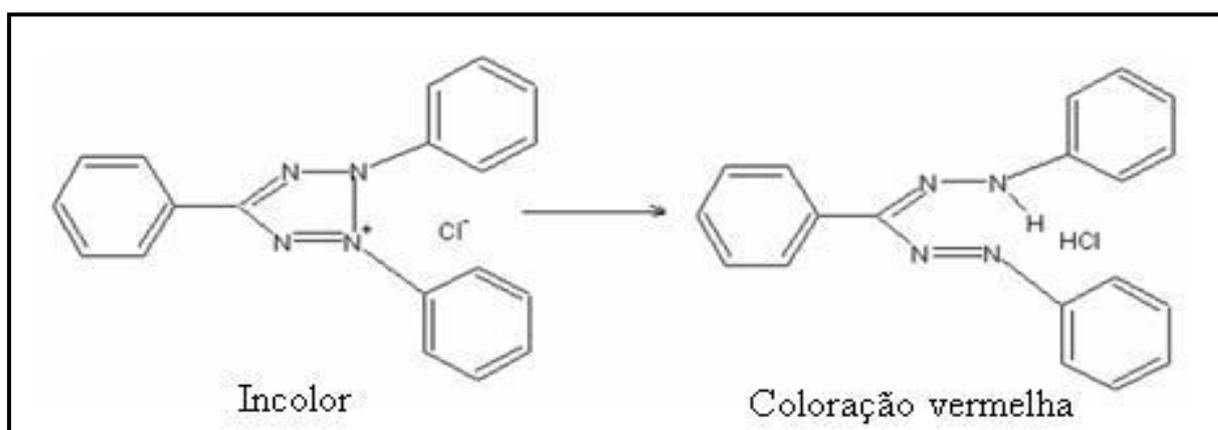


Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) obtida pela técnica de microdiluição em caldo BHI, de frações e subfrações ativas contra *S. aureus*.

Espécie vegetal	Parte da planta	Extrato bruto	Fração	Subfração	CIM (µg/mL)	
<i>C. mollis</i>	Casca do caule	-	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (1:1)	500	
		-	C ₆ H ₁₄ Neutra	MeOH	500	
	Caulo com cupim	-	AcOEt	AcOEt	500	
<i>T. americana</i>	Folha	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ ácida	-	125	
		C ₃ H ₆ O	CHCl ₃	-	500	
		C ₃ H ₆ O	AcOEt	C ₆ H ₁₄ :AcOEt (1:1)	250	
	Folha	C ₃ H ₆ O	CHCl ₃	AcOEt	500	
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ ácida	AcOEt	500	
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ Neutra	AcOEt	125	
	Casca do caule	EtOH	CH ₂ Cl ₂	-	500	
		Raiz	-	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂	500
		Caule	EtOH	CHCl ₃	-	SR**
C ₆ H ₁₄			C ₆ H ₁₄ ácida	-	250	
Fruto		MeOH	CHCl ₃	CHCl ₃ :AcOEt (1:1)	250	
Fruto fresco		MeOH	MeOH/H ₂ O	-	SR**	
	MeOH	AcOEt	AcOEt:MeOH	500		
<i>C. hexandra</i>	Raiz	CH ₂ Cl ₂	MeOH	-	250	

** SR: Sem Resultado.

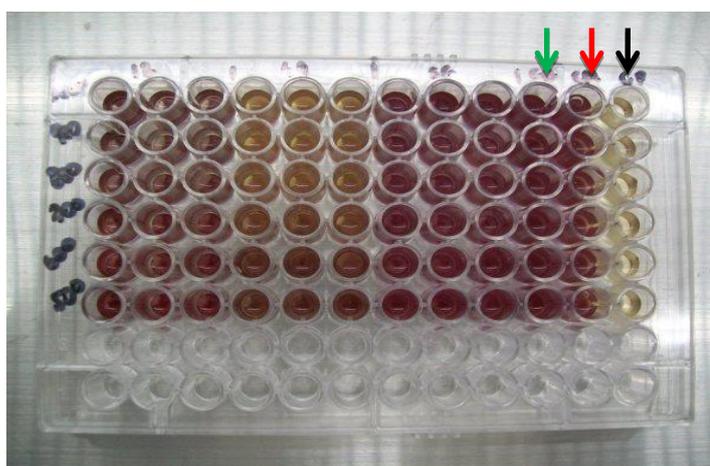
As amostras de plantas que apresentam valor de CIM até 0,5 mg/mL são consideradas ativas, entre 600 a 1.500 mg/mL são moderadamente ativas, e as que apresentam CIM maior que 1.600 mg/mL são consideradas fracamente ativas (Aligiannis *et al.*, 2001; Barbosa, 2008). De acordo com este critério todas as amostras submetidas a CIM no presente estudo podem ser consideradas ativas uma vez que a inibição mínima variou entre 500 a 125 µg/mL (0,5 a 0,125 mg/mL). Apesar da fração em MeOH oriunda de extrato bruto em diclorometano da raiz de *C. hexandra* ter apresentado percentual de inibição elevado na técnica de difusão em disco, a CIM encontrada foi de 250 µg/mL. Esperava-se encontrar um valor menor de CIM, uma vez que quanto menor o valor da CIM mais ativo é o extrato.

O DMSO é o solvente utilizado pela maioria dos autores na solubilização de suas amostras, por não interferir no crescimento do microrganismo em baixas

concentrações. Zgoda & Porter (2001) e Karaman *et al.* (2003), utilizaram em seus trabalhos com microdiluição, DMSO como solvente e controle negativo. O primeiro utilizou o DMSO a 2,5%, uma vez que concentrações maiores poderiam inibir o crescimento de microrganismos como o fungo *Cryptococcus albidus*. O segundo adaptou a técnica desenvolvida por Zgoda & Porter (2001), utilizando DMSO a 10%.

No presente estudo foram realizados testes utilizando como solvente o DMSO a 10%, que não resultou em uma boa solubilização das amostras, sendo os resultados da microdiluição contraditórios aos de difusão em disco (Figura 19, p 57).

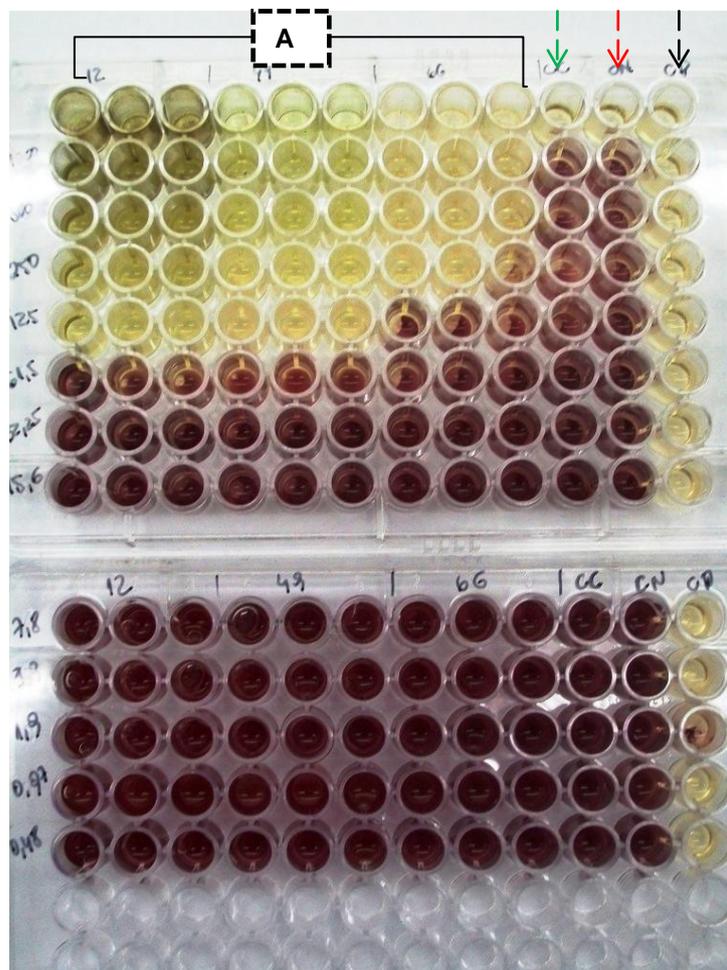
Figura 19 - Placa de microdiluição na qual foi utilizado DMSO a 10% como solvente. Poços com coloração vermelha, indicando a presença de microrganismo. Nas setas verde, vermelha e preta estão o controle de crescimento, o controle negativo e o controle positivo, respectivamente



Optou-se, portanto, pelo uso do metanol uma vez que esse solvente foi o mesmo utilizado na difusão em disco. As amostras foram totalmente solubilizadas e os resultados do teste corroboraram com os apresentados na difusão em disco. Apesar de ser considerado tóxico o metanol na quantidade utilizada não foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, levando a conclusão que a ação antimicrobiana apresentada nos resultados encontrados foi devido a amostra teste e não ao solvente (Figura 20, p. 58).

Originalmente a técnica é realizada utilizando como meio de cultivo Caldo Müller Hinton (CMH), porém ao adaptá-la optou-se por utilizar o meio BHI duas vezes concentrado, tanto pelo fato deste meio ser utilizado na ativação dos microrganismos como pela disponibilidade do mesmo no laboratório.

Figura 20 - Placa de microdiluição das amostras solubilizadas em metanol. Poços com amostras (**A**). Ausência de vermelho não há crescimento de *S. aureus*. Nas setas verde, vermelha e preta estão o controle de crescimento, o controle negativo e positivo, respectivamente.



Serpa e colaboradores (2006) avaliaram o potencial antimicrobiano de *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) utilizando a microdiluição em caldo com o BHI como meio de cultivo e observaram que o óleo oriundo desse vegetal apresentou-se ativo quando testado contra cepas hospitalares da bactéria *Escherichia coli* e contra as bactérias *E. coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117), além de cepas isoladas de alimentos, como *E. coli*, *S. aureus*, *Shigella flexneri*, e *Salmonella* spp.

Bretanha e colaboradores (2008) investigaram o potencial antimicrobiano de *Achillea millefolium* (Asteraceae) pela técnica de microdiluição em BHI e verificaram que o extrato hexânico desta espécie foi ativo contra *S. aureus* apresentando uma

CIM de 1,25 mg/mL (1.250 µg/mL). Os autores concluíram que este extrato apresentou ação antibacteriana satisfatória contra o microrganismo alvo. No presente estudo a fração hexânica ácida oriunda de extrato em hexano e a filtração em acetato proveniente da fração hexânica neutra do extrato em acetona, ambos obtidos da folha de *T. americana*, apresentaram para *S. aureus* CIM de 125 µg/mL, valor muito menor do encontrado por Bretanha e colaboradores (2008), indicando uma melhor atividade antimicrobiana.

Barbosa (2008) mostrou a atividade do óleo de jenipapo (*Genipa americana*, Rubiaceae) contra *S. aureus*, pela técnica de microdiluição utilizando BHI, com valor da CIM igual a 3,12 µg/mL. No presente estudo a CIM da fração em MeOH oriunda de extrato bruto em diclorometano da raiz de *C. hexandra* (Rubiaceae), foi de 250 µg/mL contra a mesma bactéria.

Ruiz-Bustos e colaboradores (2009) avaliaram o potencial antimicrobiano e antifúngico de *Coutarea latiflora* (Rubiaceae) pela técnica de microdiluição utilizando CMH e verificaram que a CIM do extrato em metanol para *S. aureus* ficou entre 500 a 700 µg/mL. No presente estudo a fração em metanol oriunda de extrato da raiz em diclorometano de *C. hexandra* apresentou CIM de 250 µg/mL, mostrando que apesar de pertencerem ao mesmo gênero, a espécie aqui avaliada possui atividade microbicida maior do que *C. latiflora*.

5.3 Teste de Toxicidade Frente *Artemia salina* Leach (TAS).

Popularmente conhecido como camarão de água salgada, *Artemia salina* (Artemiidae) é um microcrustáceo usado em ensaios de letalidade para avaliação preliminar de toxicidade geral. Ensaios de toxicidade com *A. salina* demonstram uma boa correlação com atividade citotóxica de alguns tumores e como pesticida (LUNA *et al.*, 2005). Esses microcrustáceos, facilmente obtidos comercialmente, são utilizados para alimentação de peixes.

Esse método tem o objetivo de avaliar ou prever o efeito de substâncias tóxicas e averiguar toxicidade relativa das substâncias consideradas biologicamente ativas (Barbosa *et al.*, 2003). A utilização de *A. salina* se deve pela capacidade de formar cistos dormentes de fácil manuseio e cultivo. O ensaio com esta espécie de crustáceo é de baixo custo e rápido, e pode servir como indicador de toxicidade pré-clínica. É um método utilizado por diferentes pesquisadores, com o intuito de avaliar

a toxicidade, que tem sido relacionada aos estudos farmacológicos realizados para diferentes compostos químicos como um método de triagem, principalmente para produtos de origem vegetal (BARBIERI *et al.*, 1980).

Atualmente há uma tendência em substituir a utilização de animais de laboratório nos testes de toxicidade, tanto pelo custo como pelo sofrimento aos quais estes animais são submetidos. É um método alternativo e preliminar com o intuito de Reducir a quantidade de animais utilizados nos testes de toxicidade *in vivo*, Refinar metodologia já existente, e Reducir o estresse, de acordo com a política dos 3 Rs (KANWAR, 2007). Espécies de invertebrados são utilizadas como organismos sentinela com base na sua abundância, facilidade de amostragem, amplo espectro de características ecológicas e sensibilidade a substâncias químicas (CALLEJA; PERSONE, 1992).

Parra e colaboradores (2001), ao avaliarem métodos de investigação de toxicidade em extratos de plantas, verificaram que o TAS é tão eficaz quanto o teste de citotoxicidade aguda em ratos, sendo um importante indicador na condução de experimentos pré-clínicos.

O timol é utilizado como controle positivo do TAS por apresentar a capacidade de romper a membrana citoplasmática, matar por desidratação as larvas de *A. salina*, apresentando boa atividade artemicida (ELLIS; BAXENDALE, 1997).

Após serem submetidas aos testes antimicrobianos as amostras foram testadas quanto a sua toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach. Inicialmente foi feito o teste preliminar, no qual das 69 amostras avaliadas 32 (46,4%) foram atóxicas (Quadro 4, p. 61) e 37 (53,6%) apresentaram mortalidade $\geq 30\%$ na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Estas amostras foram então submetidas ao teste quantitativo para determinação do grau de toxicidade e da CL_{50} , concentração capaz de matar 50% da população de *A. salina*.

Quadro 4 - Amostras de *C. mollis* e *T. americana* atóxicas quando submetidas ao teste preliminar de toxicidade frente *Artemia salina* (TAS).

Espécie Vegetal	Parte da Planta	Extrato Bruto	Fração	Subfração
<i>C. mollis</i>	Folha	C ₃ H ₆ O	MeOH/H ₂ O	-
	Casca do caule	CH ₂ Cl ₂	-	-
		EtOH	C ₆ H ₁₄	-
		EtOH	AcOEt	-
		-	CH ₂ Cl ₂	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt** 1:1
		-	C ₆ H ₁₄ Neutra	MeOH**
		-	CH ₂ Cl ₂	MeOH
	Caule com cupim	EtOH	-	-
		-	AcOEt	AcOEt:MeOH
			AcOEt	MeOH
	Caule	EtOH	MeOH/H ₂ O	-
EtOH		AcOEt	MeOH	
<i>T. americana</i>	Pedúnculo dos frutos	MeOH	-	-
		MeOH	C ₆ H ₁₄	-
	Folha	C ₃ H ₆ O	MeOH/H ₂ O	-
		C ₃ H ₆ O	CHCl ₃ **	-
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄	-
		C ₃ H ₆ O	CHCl ₃	AcOEt**
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ ácida	AcOEt**
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ :AcOEt (1:1)
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ :AcOEt (8:2)
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄	MeOH
		C ₃ H ₆ O	C ₆ H ₁₄ Neutra	AcOEt**
		EtOH	CH ₂ Cl ₂ **	-
	Raiz	EtOH	-	-
		EtOH	CHCl ₃	-
	Caule	EtOH	MeOH/H ₂ O	-
		C ₆ H ₁₄	C ₆ H ₁₄ ácida**	-
		EtOH	CHCl ₃	MeOH
		MeOH	AcOEt	MeOH
		MeOH	CHCl ₃	CHCl ₃ :AcOEt(1:1))**
		MeOH	MeOH/H ₂ O	MeOH

**Amostras ativas frente *S. aureus*.

O critério usado para avaliação foi o de Déciga-Campos e colaboradores (2007), que considera atóxicas as amostras que apresentam $CL_{50} \geq 1000 \mu\text{g/mL}$, baixa toxicidade as que apresentam $CL_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$ e $< 1000 \mu\text{g/mL}$, e tóxicas aquelas cujo $CL_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$. De acordo com os critérios acima descritos, das 37 amostras submetidas ao teste quantitativo, 27,03% (10/37) foram atóxicas, 72,97% (27/37) apresentaram algum grau de toxicidade. Os valores de CL_{50} variaram entre 2,68 a 953,9 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3, p. 63).

Observou-se que a toxicidade para as larvas de *A. salina* foi independente da polaridade do solvente utilizado na amostra. Esta toxicidade pode estar relacionada com os metabólitos secundários presentes nos extratos, frações e subfrações testados. Desmarchelier e colaboradores (1996) avaliaram a toxicidade de *T. americana* frente a *A. salina* e verificaram que tanto o extrato da casca em metanol como em diclorometano apresentaram $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ sendo considerados, portanto, atóxicos.

No presente estudo a fração em diclorometano oriunda de extrato da casca do caule em etanol foi atóxica. Apesar das frações serem uma parte mais refinada do extrato este resultado corrobora com o encontrado por Desmarchelier e colaboradores (1996).

Krishnaraju e colaboradores (2006) verificaram que amostras oriundas de raízes de *Polygonum cuspidatum*, *Rheum emodi* e *Rumex crispus*, plantas da família Polygonaceae, apresentaram CL_{50} de 13,5 $\mu\text{g/mL}$, 1.152 $\mu\text{g/mL}$ e 1.125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A espécie *P. cuspidatum*, que apresentou alta toxicidade, é usada como antitumoral. No presente estudo das 27 amostras tóxicas, 17 foram de espécies da família Polygonaceae, cinco delas inclusive tiveram atividade bactericida frente *S. aureus*. Estas amostras tóxicas poderão futuramente ser testadas quanto ao seu potencial antitumoral.

Tabela 3 - Resultado quantitativo do TAS e valores de CL₅₀ e IC₉₅ das amostras de *C. mollis*, *T. americana* e *C. hexandra*.

Espécie vegetal	Parte da planta	Amostra ^{a,b,c}	Grau de Toxicidad ^e	CL ₅₀ (µg/mL)	IC ₉₅ (µg/mL)
<i>C. mollis</i>	Folha	^a EtOH	Alto	7,7	4,7 – 21,7
		^b CH ₂ Cl ₂	Alto	3,3	2,1 – 6,9
	Casca do caule	^a EtOH	Alto	23,0	9,0 – 37,0
		^b MeOH/H ₂ O	Alto	203,0	140,4 – 276,0
	Caule com cupim	^c AcOEt	Alto**	3,6	2,1 – 10,1
		^b AcOEt	Alto	5,3	4,1 – 7,3
		^b C ₆ H ₁₄	Alto	5,8	2,8 – 32,2
<i>T. americana</i>	Folha	^c C ₆ H ₁₄ :AcOEt (1:1)	Alto**	9,2	3,8 – 91,0
		^c CH ₂ Cl ₂	Alto	383,0	142,0 – 624,0
		^c C ₆ H ₁₄	Alto	58,0	47,4 – 74,5
	Casca do caule	EtOH ^a	Alto	4,8	2,7 – 16,2
	Raiz	^c CH ₂ Cl ₂	Alto**	264,1	99,5 – 358,6
	Fruto	^c MeOH	Alto	2,7	1,84 – 5,2
Fruto fresco	^b MeOH/H ₂ O	Alto**	5,85	2,8 – 32,21	
	^b CHCl ₃	Alto	3,69	2,2 – 9,9	
	^c AcOEt:MeOH	Alto**	5,05	2,7 – 18,5	
	^c AcOEt: C ₆ H ₁₄ (1:1)	Alto	100,4	52,6 – 931,0	
<i>C. hexandra</i>	Raiz	^b C ₆ H ₁₄ :MeOH (1:1)	Alto	259,0	172,9 – 529,5
		^b MeOH	Baixo**	954,0	612,0 – 2.577,0
		^b MeOH	Alto	3,4	2,7 – 7,9
	Casca do caule	^b AcOEt:MeOH (1:1)	Alto	473,6	290,9 – 1260,9
		^b C ₆ H ₁₄	Alto	18,0	12,6 – 23,8
	Folha	^a EtOH	Alto	2,7	1,8 – 5,2
Folha	^a EtOH	Alto	2,7	1,8 – 5,2	
	^b C ₆ H ₁₄	Alto	5,9	2,7 – 44,8	
	^b CHCl ₃	Alto	12,2	4,2 – 302,1	
	^b AcOEt:MeOH (8:2)	Alto	12,2	4,2 – 302,1	

**Amostras ativas frente *S. aureus*. ^aExtrato bruto, ^bFração, ^cSubfração.

Pesquisa realizada com as espécies *Cinchona spp*, *Gardenia gummifera*, *Paedaria foetida* e *Rubia cordifolia*, da família Rubiaceae, a primeira e a última foram tóxicas com CL₅₀ de 47 µg/mL e 370 µg/mL. A *Cinchona* é utilizada como estimulante do apetite, e a *Rubia cordifolia* como antibacteriana (KRISHNARAJU *et al.*, 2006).

Todas as amostras da espécie *C. hexandra*, também pertencente à família Rubiaceae apresentaram toxicidade. A fração em MeOH oriunda do extrato da raiz em CH₂Cl₂ apresentou baixo grau de toxicidade e foi à espécie que apresentou maior zona de inibição contra *S. aureus* no teste de difusão em disco.

Barros (2009) também observou toxicidade em extratos provenientes de *C. mollis*, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

Wanyoike e colaboradores (2004) ao avaliarem extratos da folha e raiz de *Penta longiflora* (Rubiaceae) encontraram para *A. salina* valores de CL₅₀ de 12,3 e 6,4 µg/mL para folhas e raiz, respectivamente. Esta espécie também foi avaliada como antimalárica, apresentando potente atividade contra o *Plasmodium falciparum*. Em muitos casos a toxicidade está associada com a propriedade farmacológica, sendo esses resultados significativos.

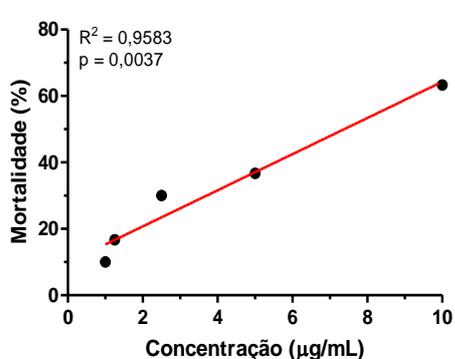
O potencial tóxico de algumas espécies da família Polygonaceae contra *A. salina* foi avaliado por Hussain e colaboradores (2010b). A espécie *Rumex australe* não apresentou atividade citotóxica, mas *R. hastatus*, *R. dentatus*, *R. nepalensis*, *Polygonum plebejum* e *P. persicaria* apresentaram valores de CL₅₀ que variaram entre 1.701 a 11,06 µg/mL. Nesta pesquisa das 59 amostras oriundas da família Polygonaceae 17 foram tóxicas e 42 foram atóxicas.

Já foi observada correlação entre a atividade larvicida de extratos vegetais, contra o mosquito transmissor da dengue *Aedes aegypti*, e a alta toxicidade de *A. salina* (LUNA *et al.*, 2005). Portanto, extratos que apresentem CL₅₀ < 500µg/mL embora sejam considerados tóxicos devem ser avaliados quanto ao seu potencial antitumoral e larvicida. O grupo de Solis e colaboradores (1992) associaram a toxicidade frente *A. salina* com a atividade cercaricida de extratos vegetais.

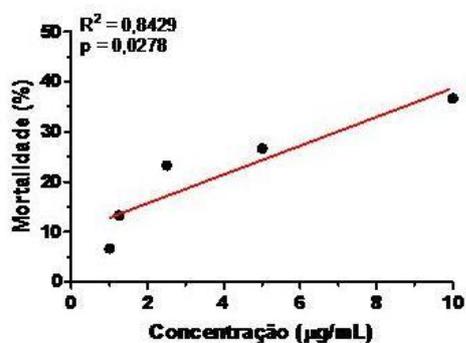
A espécie *Gonzalagunia rosea* citada anteriormente por sua atividade fungicida, apresentou atividade citotóxica, sendo o extrato em metanol o que apresentou maior CL₅₀ (10 µg/mL) (NIÑO *et al.*, 2006). Nos testes com essa amostra foram observados os menores valores de CIM para *C. albicans* (250 µg/mL) e *F. solani* (310 µg/mL).

Das 27 amostras com algum grau de toxicidade, 17 apresentaram valores de CL_{50} estatisticamente significativos ($p < 0,05$) havendo correlação entre a dose e a mortalidade das artemias (Figuras 21-24, pp. 65 - 68). Para as demais os valores de CL_{50} não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$), não havendo correlação dose-resposta (Figuras 25-27, pp. 69 - 70).

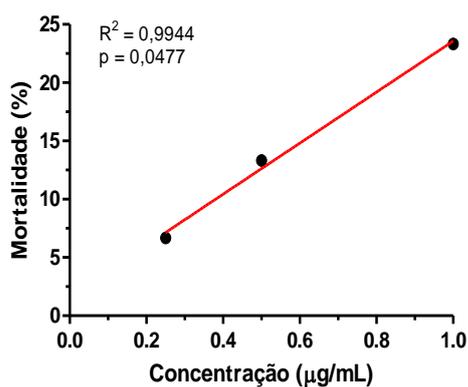
Figura 21 - A) Extrato bruto em EtOH das folhas de *C. mollis*; B) Extrato bruto em EtOH da casca do caule de *C. mollis*; C) Fração $CHCl_3$ oriunda do extrato em MeOH do fruto fresco de *T. americana*; D) Fração CH_2Cl_2 oriunda do extrato em acetona da folha de *C. mollis*. * $p < 0,05$.



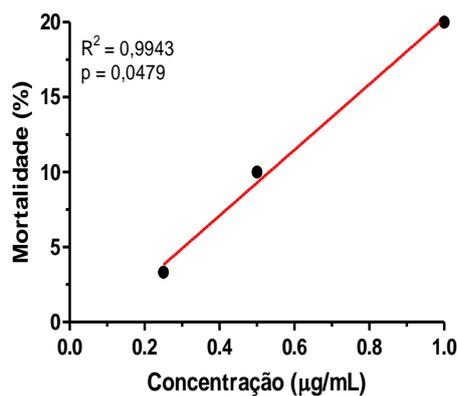
A1



B

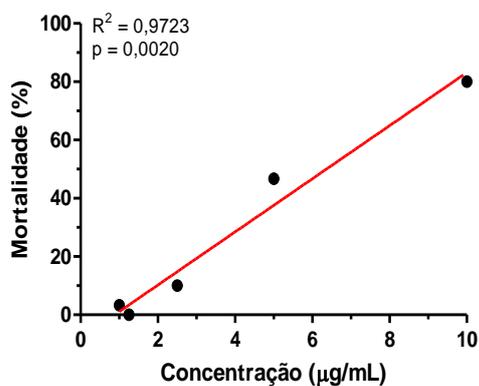


C

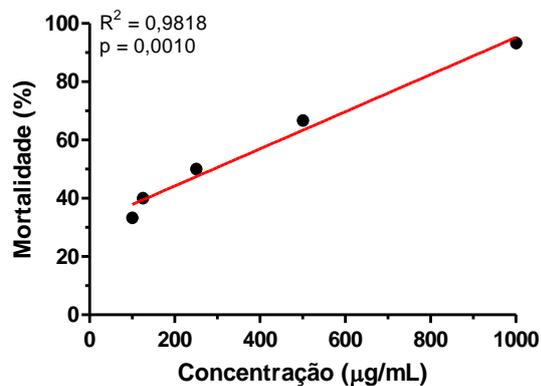


D

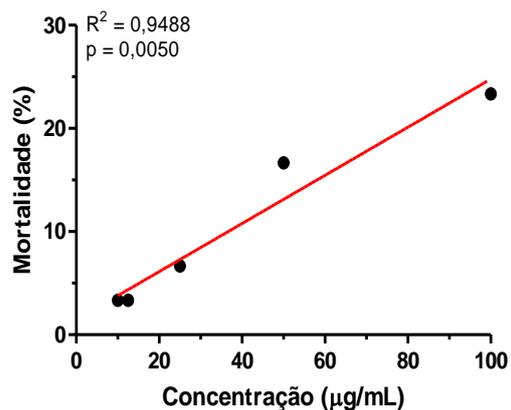
Figura 22 - A) Fração AcOEt oriunda do extrato em EtOH do caule com cupim de *C. mollis*; B) Fração MeOH/H₂O oriunda de extrato bruto em EtOH da casca do caule de *C. mollis*; C) Subfração CH₂Cl₂ oriunda da fração em CHCl₃ do extrato em Acetona das folhas de *T. americana*; D) Subfração C₆H₁₄ proveniente de Fração em C₆H₁₄ neutra oriundo do extrato em acetona das folhas de *T. americana*. * $p < 0,05$.



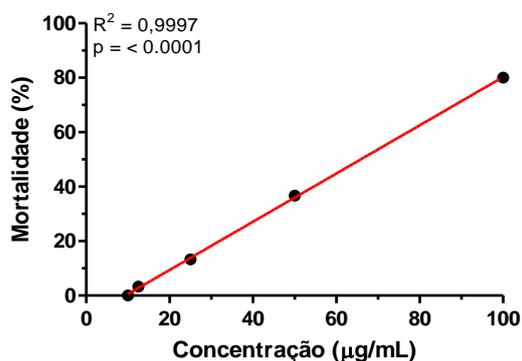
A



B



C



D

Figura 23 - A) Subfração MeOH proveniente de fração em CHCl_3 oriunda do extrato em MeOH do fruto de *T. americana*; B) Subfração AcOEt:MeOH (1:1) proveniente de fração em MeOH/ H_2O oriunda de extrato bruto em MeOH do fruto fresco de *T. americana*; C) Extrato bruto em EtOH da casca do caule de *C. hexandra*; D) Fração CHCl_3 oriundo de extrato bruto em AcOEt da folha de *C. hexandra*. * $p < 0,05$.

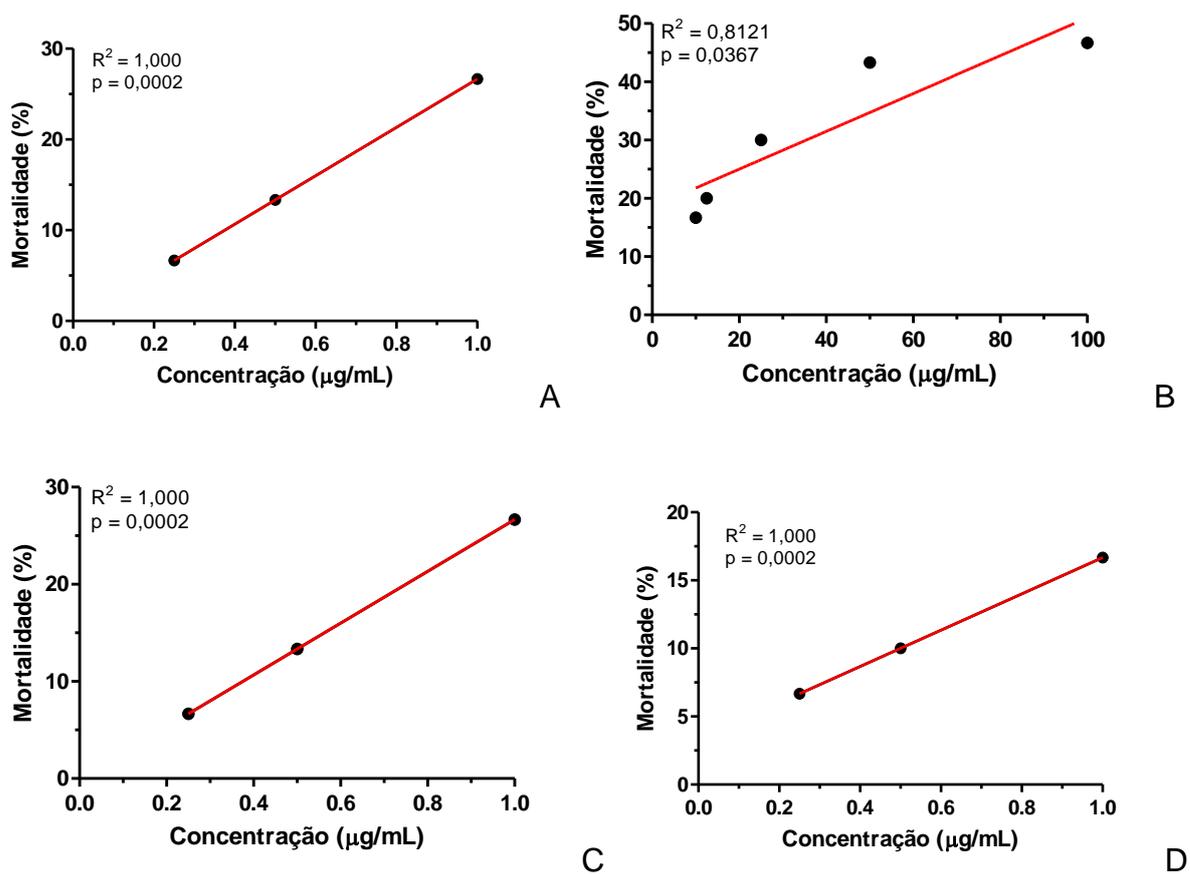


Figura 24 - A) Fração AcOEt:MeOH (1:1) oriunda do extrato em AcOEt da folha de *C. hexandra*; B) Fração MeOH oriunda de extrato bruto em CH₂Cl₂ da raiz de *C. hexandra*; C) Fração AcOEt:MeOH (1:1) oriundo do extrato bruto em AcOEt da raiz de *C. hexandra*; D) Fração C₆H₁₄ oriunda do extrato bruto em C₆H₁₄ da raiz de *C. hexandra*; E) Subfração CH₂Cl₂ oriundo do extrato em CH₂Cl₂ da raiz de *T. americana*. * $p < 0,05$.

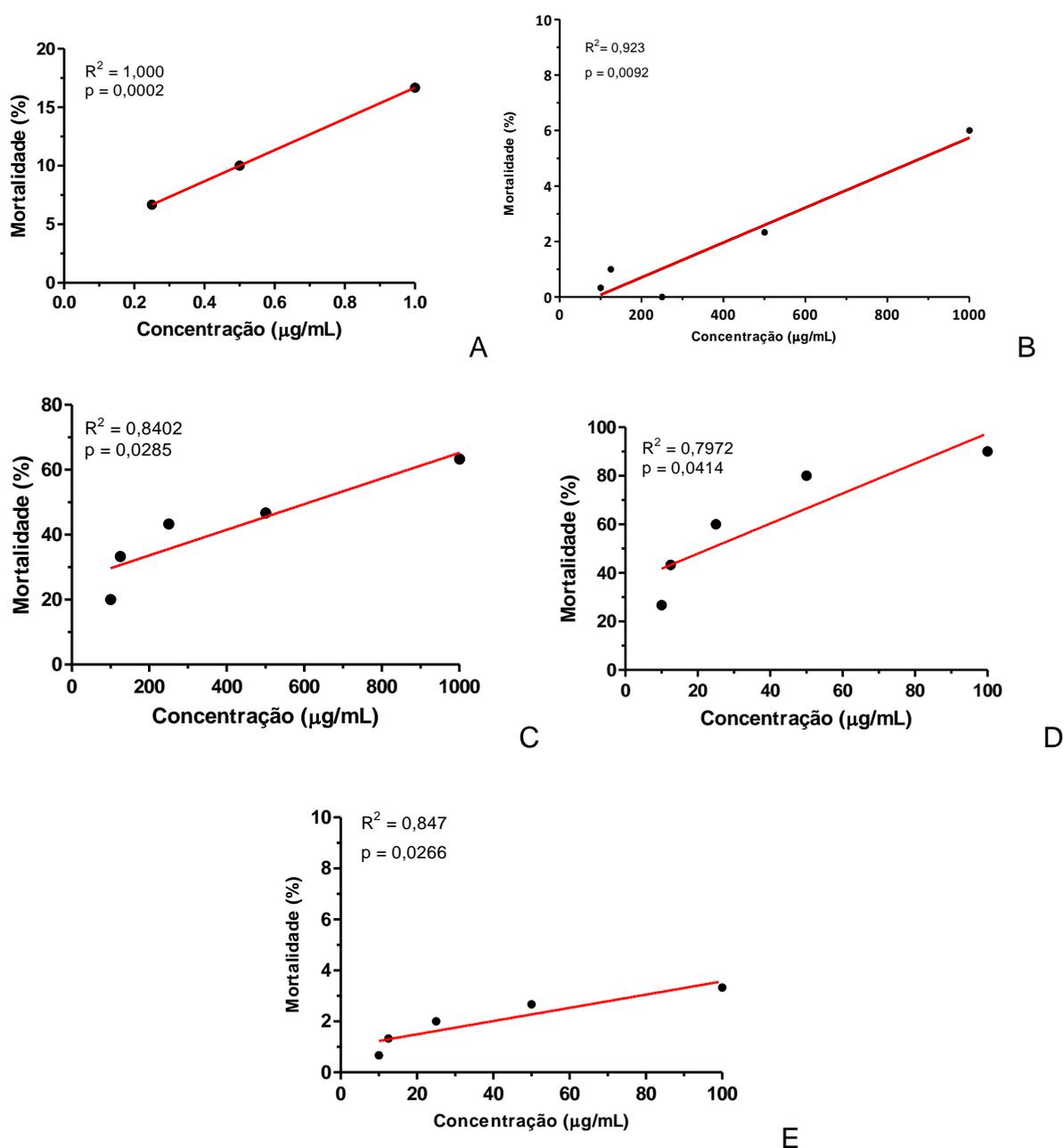


Figura 25 - A) Extrato bruto em EtOH da casca do caule de *T. americana*; B) Fração C_6H_{14} oriunda do caule com cupim de *C. mollis*; C) Extrato bruto em EtOH da folha de *C. hexandra*. * $p > 0,05$.

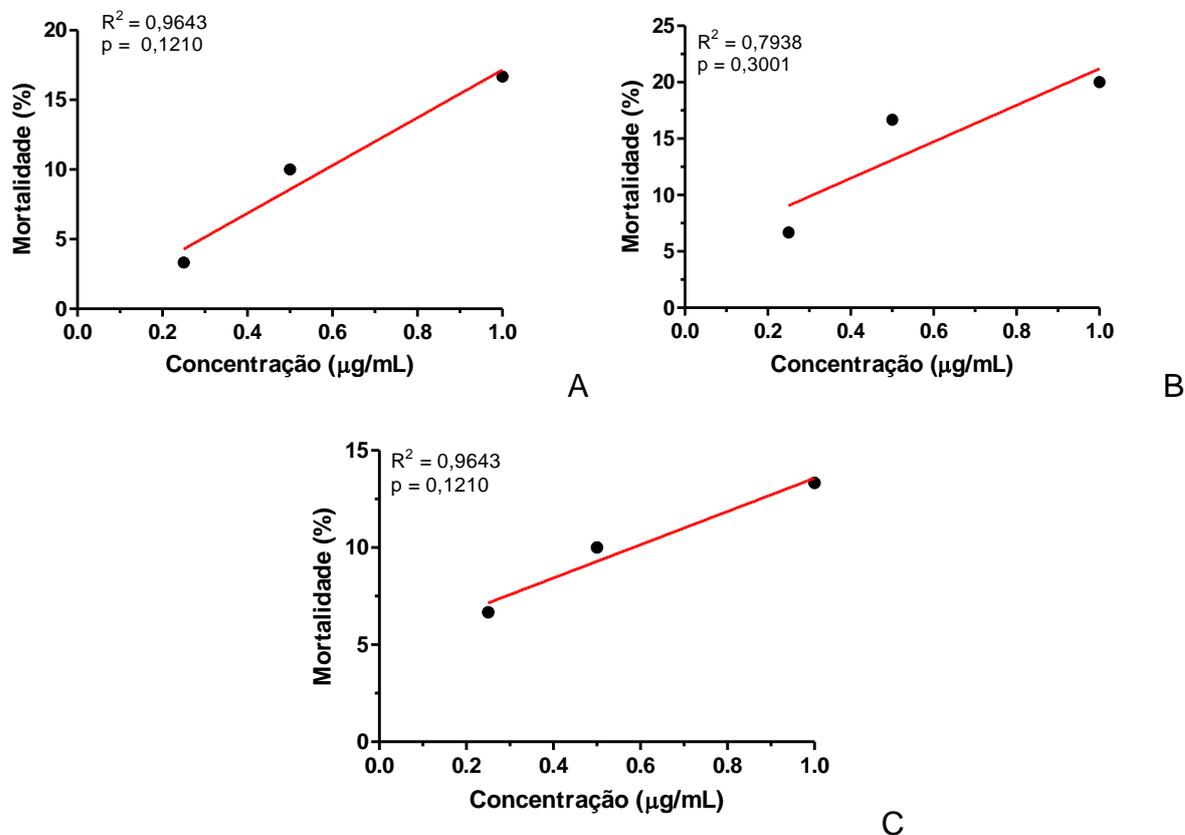
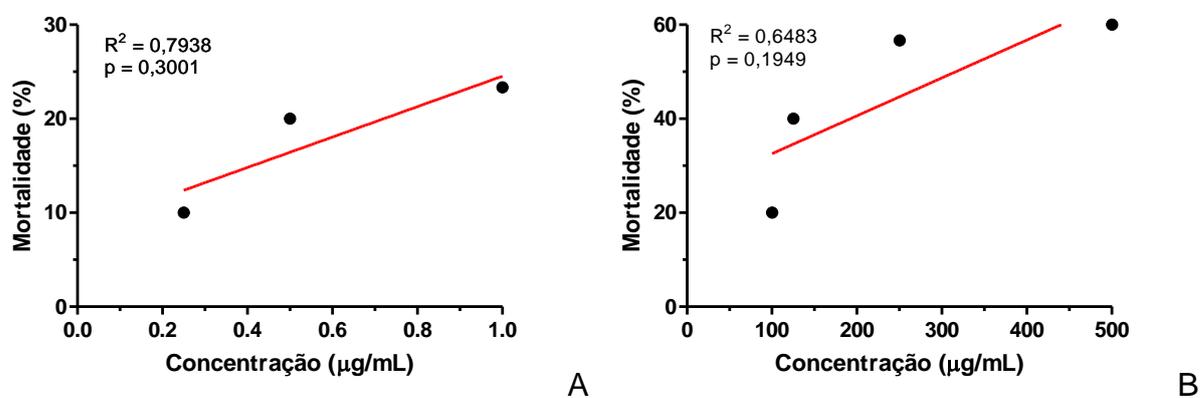
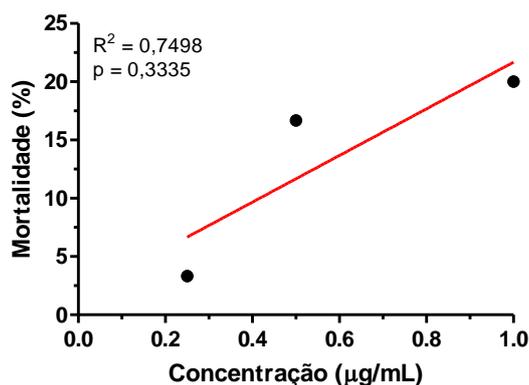


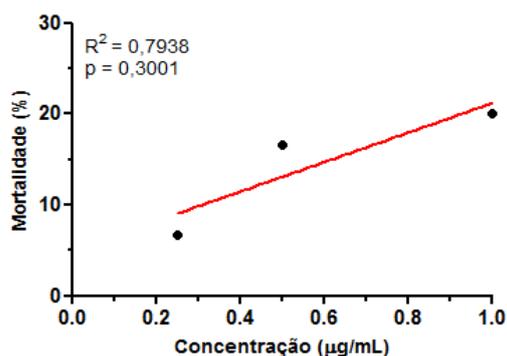
Figura 26 - A) Fração C_6H_{14} oriunda de extrato bruto em EtOH da folha de *C. hexandra*; B) Fração C_6H_{14} :MeOH (1:1) oriunda do extrato bruto em CH_2Cl_2 da raiz de *C. hexandra*; C) Fração MeOH proveniente de extrato bruto em AcOEt da raiz de *C. hexandra*. * $p > 0,05$.



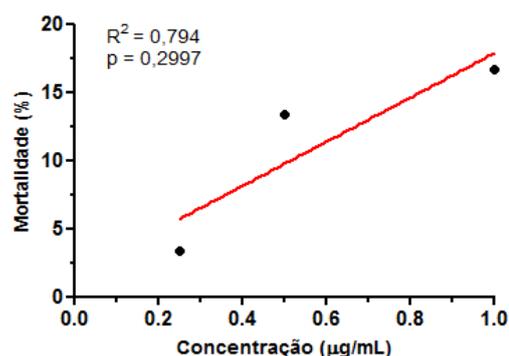


C

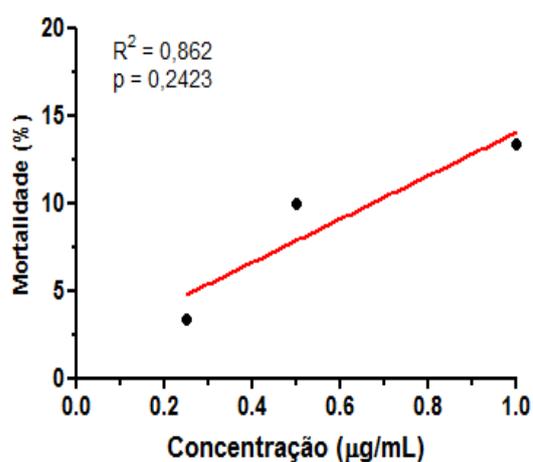
Figura 27 - **A)** Fração MeOH/H₂O oriunda de extrato em MeOH de fruto fresco de *T. americana*; **B)** Subfração AcOEt:MeOH proveniente da fração em AcOEt do extrato bruto em MeOH de fruto fresco de *T. americana*; **C)** Filtração C₆H₁₄:AcOEt (1:1) proveniente da fração em AcOEt do extrato da folha em acetona de *T. americana*; **D)** Filtração AcEOt proveniente de fração em AcOEt do caule com cupim de *C. mollis*. *p > 0,05.



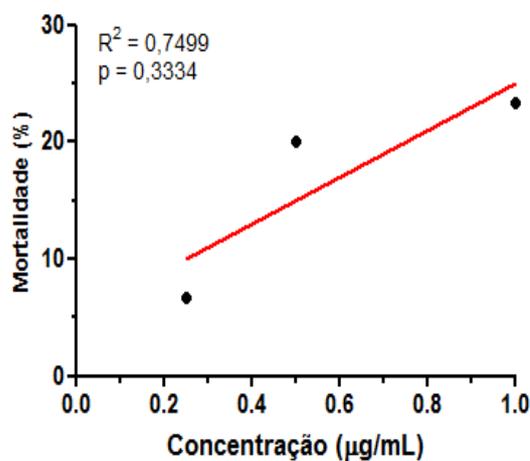
A



B



C



D

6 CONCLUSÕES

- As três espécies vegetais estudadas apresentam potencial antibacteriano, sendo as mais promissoras: a subfração AcOEt oriunda da fração em AcOEt do caule com cupim da espécie *C. mollis*, a subfração AcOEt oriunda da C_6H_{14} neutra do extrato da folha em acetona da espécie *T. americana*, e a fração MeOH proveniente de extrato da raiz em CH_2Cl_2 da espécie *C. hexandra*;
- As três espécies possuem atividade contra a bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus*;
- A amostra com maior potencial frente *Staphylococcus aureus* foi a fração MeOH proveniente de extrato da raiz em CH_2Cl_2 da espécie *C. hexandra*;
- Nenhuma das espécies vegetais apresenta atividade contra a bactéria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* ou contra o fungo *C. albicans*;
- Com relação à toxicidade frente *Artemia salina* 27 das 69 amostras apresentaram algum grau de toxicidade, sendo as demais consideradas atóxicas. Das 27 amostras tóxicas, 17 são das espécies da família Polygonaceae, todas as amostras da espécie *C. hexandra* apresentaram algum grau de toxicidade.

7 PERSPECTIVAS

Pretende-se em estudos posteriores produzir uma pomada para uso em testes *in vivo* com o objetivo de avaliar o potencial cicatrizante e antimicrobiano. A subfração AcOEt oriunda da fração C₆H₁₄ neutra do extrato da folha em acetona de *T. americana* apresentou percentual de inibição com 69,5% e valor de CIM de 125 µg/mL. Esta amostra foi atóxica no teste de toxicidade frente *A. salina*, podendo ser utilizada em experimentos *in vivo*.

A fração MeOH oriunda de extrato bruto em CH₂Cl₂ da raiz de *C. hexandra* foi a mais promissora nos testes antimicrobianos (CIM de 250 µg/mL) apresentou baixa toxicidade frente *Artemia salina*. Este resultado indica que a fração deve ser mais investigada quanto ao potencial citotóxico com outros testes, como o de células da linhagem murina (MTT), com vistas a continuar os estudos antimicrobianos em ensaios pré-clínicos.

REFERÊNCIAS

Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n.3, p. 472-508, 2008.

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n.9, p. 4168-4170. 2001.

Almeida ER, De Santana CF, De Mello JF. Anti-inflammatory action of *Coutarea hexandra*. *Fitoterapia*, v.62, n.5, p.447-448, 1991.

Almeida ER. *Plantas medicinais brasileiras, conhecimentos populares e científicos*. São Paulo: Hemus Editora Ltda, 1993. 341p.

Alves AR, Silva MJP. O uso da fitoterapia no cuidado de crianças com até cinco anos em área central e periférica da cidade de São Paulo. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v.37, n.4, p. 85-91, 2003.

Alves EG, Vinholis AHC, Casemiro LA, Furtado NAJC, Silva MLA, Cunha WR, e Martins CHG. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova*, 31(5), 1224-1229, 2008.

Alves HM. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v.3, p. 1-6, 2001.

Andersson, L. A provisional checklist of neotropical Rubiaceae. *Scripta Botanica Belgica*, v.1, p. 1-199, 1992.

Andrade, K.K., Kone, M., Terreaux, C., Traore, D., Hostettmann, K., Dosso, M. Evaluation of the antimicrobial potential of medicinal plants from the Ivory Coast. *Phytother. Res.*, **16**, 497–502. 2004

Antoun MD, Gerena L, Milhous WK. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactives. *International Journal of Pharmacognosy*, v.3, p.255-258, 1993.

Aquino R, D'agostino M, De Simone F, Pizza C. 4-arylcoumarin glycosides from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v. 27, n.6, p.1827-1830, 1988.

Arruda EAG. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica no HC-FMUSP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 31, n.5, p.503-504, 1998.

Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da

raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.1, p.90-97, 2008.

Barbieri L, Zamboni M, Lorenzoni E, Montanaro L, Sperti S, Stirpe F. Inhibition of protein synthesis in vitro by proteins from the seeds of *Momordica charantia* (bitter melon). *The Biochemical Journal*, v.186, p.443-452, 1980.

Barbosa DA. *Avaliação fitoquímica e farmacológica de Genipa americana L. (Rubiaceae)*. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Barbosa J, Ferreira DA, Fonseca B, Souza I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e ecotoxicologia marinha, 2003.

Barbosa MRV. *Estudo florístico e fitossociológico da Mata do Buraquinho, remanescentes de mata atlântica em João Pessoa, PB*. (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

Barros IB, Fidelis QC, Santos GF, Pinto JP, Faccione M, Tsuboy MSF, Montovani MS, Braz-Filho R, Ferreira DT. Phytochemistry of root and leaf extracts of *Coccoloba mollis*. *1st Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology*. São Pedro, SP, Brasil. 2007.

Barros IB. *Avaliação química e das atividades biológicas de Coccoloba mollis*. (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

Barroso GM, Guimarães EF, Ichaso CLF, Costa CG, Peixoto AL, Lima HC. Rubiaceae.. In: *Sistemática de angiospermas do Brasil*. v.3. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. p.189-229. 1986

Bauer AW, Kirby E, Sherris EM, Turk M. Antibiotic by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p.493-496, 1966.

Borchardt JR, Wyse DL, Sheaffer CC, Kauppi KL, Fulcher RG, Ehlke NJ, Biesboer DD, Bey RF. Antimicrobial activity of native and naturalized plants of Minnesota and Wisconsin. *Journal of Medicinal Plants Research* . 2 (5), 098–110, 2008.

Brandão MGL, Grandi TSM, Rocha EMM, Sawyer DR, Krettli AU. Survey of medicinal plants used as antimalarial in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.36, n.2, p.175-182, 1992.

Brasil 2006. Presidência da República. *Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006*. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de junho 2006.

Bretanha LC, Lima MC, Serpa R, Ribeiro GA, Galho VM, Gouvêa DP, Venzke D, Freitag RA, Amarante L. Técnica de microdiluição: Sensibilidade de espécies bacterianas a extratos vegetais. *XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul)*. FURB, 13 a 15 de novembro de 2008.

Buckley W. Method of controlling blood sugar in diabetic patients using *Coccoloba uvifera*. UK n°GB2355407, 2001.

Bye Jr RA. Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Journal Economic Botany*, v.40, n.1, p.103-124, 1986.

Caceres A., López B., González S., Berger I., Tada I., Maki J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.62, p.195-202, 1998.

Caetano N, Saraiva A, Pereira R, Carvalho D, Pimentel MCB, Maia MBS. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, supl., p.132-135, 2002.

Calleja MC, Persoone G. Cyst-based toxicity tests IV, the potential of ecotoxicological tests for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme. *Alternatives to Laboratory Animals*, v.20, p.396-405, 1992.

Carballo LJ, Hernandez-inda LZ, Perzer P, Gravalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products, *BioMed Central Biotechnology (online)*, 2:17, 2002.

Carbonezi CA, Martins D, Young MCM, Lopes MN, Furlan M, Rodrigues Filhos E, Bolzani VS. Iridoid and seco-iridoid glucosides from *Chioccona alba* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, v.51, p.781-785, 1999.

Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p.314-319, 2008.

Carvalho PL. A proteção da biodiversidade brasileira: o caso das plantas medicinais. 2009. Artigo em Hipertexto. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/Biodiversidade/index.htm. Acesso em: 4/10/2010.

Cavalcanti SMM, França ER, Vilela MA, Montenegro F, Cabral C, Medeiros ACR. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.9, n.4, p. 436-446, 2006.

Cavallito, CJ, Bailey, JH. Allicin the principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antibacterial activity. *Journal of American Chemical Society.*, v.66, p.1950-1954, 1944.

Chambers HF, Sande MA. Fármacos antimicrobianos. In: *As bases da farmacologia terapêutica*. Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P. 9ª ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana,. p.757-776. 1996

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – tenth edition. CLSI document M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.

Corrêa MP. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/ Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. IV, 1984.

Cota BB, Oliveira AB, Souza-Filho JD, Braga FC. Antimicrobial activity and constituents of *Coccoloba acrostichoides*. *Fitoterapia*, v.74, n.7-8, p. 729-731, 2003.

CPS-IDIC. Canadian Paediatric Society-Infectious Diseases and Immunization Committee. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Canadian pediatric institutions is still a worthwhile goal. *Journal of Paediatrics and Child Health*, v.4, n.5, p.337-341, 1999.

Crocco EI, Mímica LMJ, Muramatu LH, Garcia C, Souza VM, Ruiz LRB, Zaitz C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.79, n.6, p.689-697, 2004.

D'agostino M, De Feo V, De Simone F, Vincieri FF, Pizza C. Isolation of 8-hydroxy-5,7,3',4'-tetramethoxy-4-phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Planta Medica*, v.55, n.6, p.578, 1989.

D'agostino M, De Simone F, Dini A, Pizza C. Isolation of 8,3'-dihydroxy-5,7,4'-trimethoxy-4-phenylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Journal Natural Products*, v.53, n.1, p.161-162, 1990.

Dan S, Dan SS. Phytochemical study of *Adansonia digitata*, *Coccoloba excoriate*, *Psychotria adenophylla* and *Schleichera oleosa*. *Fitoterapia*, v. 57, n.6, p.445-446, 1986.

Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, Castañeda-Corral, Angeles-López G G E, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.*, 110, 334-342. 2007

Deharo E, Baelmans R, Gimenez A, Quenevo C, Bourdy G. *In vitro* immunomodulatory activity of plants used by the Tacana ethnic group in Bolivia. *Phytomedicine*, v.11, p.516-522, 2004.

Delle Monache G, Botta B, Alves Lima R. A 4-Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v.23, n.8, p.1813, 1984.

Delle Monache G, Botta B, Neto AS, Delima RA. 4-Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v.22, n.7, p.1657-1658, 1983.

Delle Monache G, Botta B, Viciguerra V, Gacs-baitz E. 4-Arylcoumarin from *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v.29, n.12, p.3984-3986, 1990.

Delle Monache G, Botta B, Viciguerra V, Gacs-baitz E. A neoflavonoid from *Coutarea hexandra*. *Heterocycles*, v.29, n.2, p.335-357, 1989.

Desmarchelier C, Mongelli E, Coussio J, Ciccía G. Studies on the cytotoxicity, antimicrobial and DNA-binding activities of plants used by the Ese'ejás. *Journal of Ethnopharmacology*, v.50, n.2, p.91-96, 1996.

Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: UNESP, v.2, 2002. p. 604.

Dongmo AB, Kamanyi A, Dzikouk G, Nken BCA, Tan PV, Nguenefack T, Nole BM, Wagner H. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extract of *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae) Aubrév. & Pellegr. *Journal of Ethnopharmacology*, v.84, p.17-21, 2006.

Duarte MGR, Soares IAA, Brandão M, Jácome RLRP, Ferreira MD, Silva CRF, Oliveira AB. Perfil fitoquímico e atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas invasoras. *Revista Lecta*, v.20, n.2, p.177-182, 2002.

Duke JA, Vasquez R. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 1994. 181p.

Ellis, M.D.; Baxendale, F.P. Toxicity of seven monoterpenoids to tracheal mites (*Acarí*: Tarsonemidae) and their honey bee (*Hymenoptera*: Apidae) hosts when applied as fumigants. *Journal of Economic Entomology*, v.90, p.1087-1091, 1997.

Essawi T, Srour M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v.70, p.343-349, 2000.

Ferrareze MVG, Leopoldo VC, Andrade D, Silva MFI, Haas VJ. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? *Acta Paulista de Enfermagem*, v.20, n.1, p.7-11, 2007.

Ferreira DT, Pinto JP, Fidelis QC, Santos GF, Braz-Filho R. Antraquinonas farmacologicamente ativas isoladas de *Coccoloba mollis* Casar - Polygonaceae. 30^a *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia/SP, Brasil. 2006.

File Jr TM. Visão geral sobre resistência bacteriana nos anos 90. In: PLE CHEST The Cardiopulmonary and Critical Care Journal, Supl 2, v.1, p.3-9, 2000.

Finney, D.J. *Probit Analyses*. Cambridge: Cambridge University Press, 1972. 350pp.

Fuentefria DB, Ferreira AE, Gräf T, Corção G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, n.5, p.470-473, 2008.

Gomes M. Rubiaceae. In: Lima MPM, Guedes-Bruni RR (Org.). *Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo – RJ: Aspectos Florísticos das espécies vasculares*. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, v.2, 1996. P.345-426.

Gupta MP. 270 *Plantas medicinales iberoamericanas*. Santafé de Bogotá: Editorial Presencia Ltda. 1995. 617 pp.

Hameed I, Dastagir G, Hussain F. Nutritional and elemental analyses of some selected medicinal plants of the family Polygonaceae. *Pakistan Journal of Botany*, v.40, n.6, p.2493-2502, 2008.

Hamilton, CW. A revision of mesoamerican *Psychotria* subgenus *Psychotria* (Rubiaceae), part I: introduction and species 1-16. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 67-111; part II: Species 17-47. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 76: 386-429; part III: Species and apendices 48-61. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v.76, p.886-916, 1989.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

Hussain F, Hameed I, Dastagir G, Shams-un-Nisa, Khan I, Ahmad B. Cytotoxicity and phytotoxicity of some selected medicinal plants of the family Polygonaceae. *African Journal of Biotechnology*, v.9, n.5, p.770-774, 2010b.

Hussain, F, Ahmad B, Hameed I, Dastagir G, Sanallah P, Azam, S. Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of Polygonaceae. *Afr. J. Biotechnol*, v. 9, n. 31, p. 5032-5036, 2010a.

Hussein AA, Barberena I, Correa M, Coley PD, Solis PN, Gupta MP. Cytotoxic Flavonol Glycosides from *Triplaris cumingiana* J. Nat. Prod., 68, 231-233. 2005.

Iinuma M, Tanaka T, Hamada K, Mizuno M, Asai F, Reher G, Kraus L. Revised structure of neoflavone in *Coutarea hexandra*. *Phytochemistry*, v.26, p.3096-3097, 1987.

Jaretski R. Beiträge zur systematic der Polygonaceae unter berücksichtigung des oxymethylantrachinon-vorkommens. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*, v.22, p.1-83, 1925.

Kanwar AS. Brine shrimp (*Artemia salina*) - a marine animal for simple and rapid biological assays. *Journal of Chinese Clinical Medicine*, v. 2,n.4, p. 236-240, 2007.

Karaman I, Sahin F, Güllüce M, Ögütçü H, Şengül M, Adigüzel A.. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 85, p.231-235, 2003.

Kohler I, Siems KJ, Mockenhaupt FP, Siems K, Jakupovic J, González JC, Hernández MA, Ibarra RA, Berendsohn WG, Bienzle U, Eich E. *In vitro*

antiplasmodial activity of 4-phenylcoumarins from *Exostema mexicanum*. *Planta Medica*, v.67, p.89-91, 2001.

Krishnaraju AV, Rao TVN, Sundararaju D, Vanisree M, Tsay HS, Subbaraju GV. Biological Screening of Medicinal Plants Collected from Eastern Ghats of India Using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *International Journal of Applied Science and Engineering*, v. 4, p.115-125, 2006.

Kuete V, Nana F, Ngameni B, Mbaveng AT, Keumedjio F, Ngadjui BT. Antimicrobial activity of the crude extract, fractions and compounds from stem bark of *Ficus ovata* (Moraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.124, p. 556-561, 2009.

Lapa AJ, Souccar C, Lima-Landman MTR, Godinho RO, Nogueira TCML. Farmacologia e Toxicologia de produtos naturais. In: Simões CMO, Shenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick, PR. (org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p.247-262. 2003.

Li XC, Elsohly HN, Nimrod AC, Clark AM. Antifungal activity of (-)-epigallocatechin gallate from *Coccoloba dugandiana*. *Planta Medica*, v.65, n.8, p.780, 1999.

Lima MRF, Luna JS, Santos AF, Caño MCA, Sant'Ana AEG, Genet JP, Marquez B, Neuville L, Moreau N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p. 137–147, 2006.

Lima, L.R.P., Oliveira, T.T., Nagem, T.J., Pinto, A.S., Stringheta, P.C., Tinoco, A.L.A., Silva, J. F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.38, p.196-200, 2001.

Linconpan N, Trabulsi LR. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Trabulsi, LR, Alterthum F. (Org.). *Microbiologia*. 5 ed., São Paulo: Atheneu, 2008. p. 369-381.

Ling SK, Komorita A, Tanaka T, Fujioka T, Mihashi K, Kuono I. Iridoids and anthraquinones from the Malaysian medicinal plant *Saprosma scortechinii* (Rubiaceae). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.50, p.1035-1040, 2002.

Lorenzi H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*. 2 ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, v. 2, 1998a. p.277.

Lorenzi H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*. 2 ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, v.1, 1998b. p.294.

Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*, v.339, p.520-532, 1998.

Lozya X. Balance between man and nature. World health 1997 Folklore. *Ethnomedicinal*, 11, p.8, 1977.

Lucas EH, Lickfeldt A, Gottshall RY, Jennings JC. The occurrence of antibacterial substances in seed plants with special reference to *Mycobacterium tuberculosis*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, v.78, n.4, p.310-321, 1951.

Lucena JEX, Bispo MD, Nunes RS, Cavalcanti SCH, Teixeira-Silva F, Marçal RM, Antonioli ÂR. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.1, p.67-72, 2006.

Luna JS, Santos AF, Lima MRF, Omena MC, Mendonça FAC, Bieber LW, Sant'Ana AEG. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97, p.199–206, 2005.

Luna LE. The healing practices of peruvian shaman. *Journal of Ethnopharmacology*, v.11, n.2, p.123-133, 1984.

Mani, S.; Parthasarathy, N. Tree population and above-ground biomass changes in two disturbed tropical dry evergreen forests of peninsular India. *Tropical Ecology* v. 50, n. 2: p. 249-258, 2009.

Melo E, França F. Polygonaceae do semi-árido brasileiro. *In: Rumo ao amplo conhecimento da Biodiversidade do semi-árido Brasileiro*. 2007. Disponível em: <http://www.uefs.br/ppbio/cd/portugues/capitulo12.htm>. Acesso em: 05/10/2010.

Melo E. As espécies de *Coccoloba* P. Browne (Polygonaceae) da Amazônia brasileira. *Acta Amazonica*, v.34, n.4, p.525-551, 2004.

Melo E. Polygonaceae da cadeia do espinhaço, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.14, n.3, p.273-300, 2000.

Mendonza H, Bernardo R, Ramírez P, Jiménez LC. Rubiaceae de Colômbia: guía ilustrada de géneros. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexandre Von Humboldt, 2004. p.351.

Menezes, E.A., Sá, K.M., Cunha, F.A., Ângelo, M.R.F., Oliveira, F.R.N., Salviano, M.N.C. Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos gram negativos não fermentadores isolados no Lab. De Pat. Clin. Dr. Edílson Gurgel, Fortaleza/CE. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, v.36, p.209-212, 2004.

Meng JC, Zhu QX, Than RX. New antimicrobial mono and sesquiterpenes from *Soroiseris hookeriana* subsp. *Erysimoides*. *Planta Medica*, v.66, p.541-544, 2000.

Mimica MJ, Mendes CMF. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. *J Bras Patol Med Lab*. 43 (6) 399-406. 2007.

Molina-Salinas, G.M., Said-Fernández, S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacology online*, v.3, p.633-638, 2006.

Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deharo E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in

Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v.69, p.139-155, 2000.

NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 6th ed. NCCLS document M7-A6. NCCLS, Wayne, Pa. 2003.

Niño J, Narváez DM, Mosquera OM, Correa YM. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p.566-570, 2006.

Nobre, M.O., Nascente, P.S., Meireles, M.C., Ferreira, L. Antifungal drugs for small and large animals. *Ciência Rural*, v.32, p.175-184, 2002.

Oliveira AC, Silva RS. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. *Rev. Eletrônica de Enfermagem* [Internet], v. 10, n.1, p.189-197, 2008a.

Oliveira CF, Diel EE, Henriques AT, Schapoval EES, Zettler C. Estudo farmacológico do extrato total de *Polygonum hydropiperoides* Michaux. *Caderno de Farmácia*, v.7, (Supl.), p.30-32, 1991.

Oliveira IS, Lima JCS, Silva RM, Martins DTO. Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.4, p.587-593, 2008b.

Oliveira PES. *Estudo químico e biológico de Coccoloba mollis Casaretto (1844) e Triplaris americana Linnaeus (Polygonaceae)*. Tese de doutorado. Instituto de química e biotecnologia – IQB. Universidade Federal de Alagoas – UFAL. 2007.

Oliveira PES, Conserva LM, Lemos RPL. Chemical constituents from *Triplaris americana*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.36, p.134-137, 2008d.

Oliveira PES, Santos WS, Conserva LM, Lemos RPL. Constituintes químicos das folhas e do caule de *Coccoloba mollis* Casaretto (Polygonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18 (Supl.), p.713-717, 2008c.

Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.1, p.77-82, 2006.

Oliveira, TD, Ribeiro, MC, Costa, ILL, Farias, FS, Figueira, JEC. Estabelecimento de espécies vegetais em um *inselberg* granítico de mata atlântica. *Estudos de Biologia*, v.26, p.17-24, 2004.

Ong HC, Norzalina J. Malay herbal medicine in Gemencheh, Negri Sembilan, Malaysia. *Fitoterapia*, v.70, p.10-14, 1999.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da

concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

Parra, AL, Yhebra, RS, Sardinias, IG, Buela, LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the Medium Lethal Dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, v.8, p.395-400, 2001.

Pereira GF. *A Família Rubiaceae JUSS. na vegetação ripária de um trecho do alto rio Paraná, Brasil, com ênfase na tribo Spermacoceae*. (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais), Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Maringá - Maringá, 2007.

Pereira MS, Barbosa MRV. A família Rubiaceae na Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. Subfamílias Antirheoideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. *Acta Botanica Brasílica*, v.18, n.2, p.305-318, 2004.

Pereira, A.L., Pita, J.R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). *Revista da Faculdade de Letras de Coimbra/Portugal*, v.6, p.129-151, 2005.

Perez RM, Ocegueda GA, Munoz JL, Avila JG, Morrow WW. A study of the hypoglucemic effect of some Mexican plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.12, n.3, p.253-262, 1984.

Perez S, Zavala MA, Arias L, Perez C, Perez RM. Antimicrobial study of bark from five tree species. *Phytotherapy Research*, v.15, p.356-359. 2001.

Phuong NM, Sung TV, Porzel A, Schmidt J, Merzweiler K, Adam G. β -Carboline alkaloids from *Hedyotis capitellata*. *Phytochemistry*, v.52, p.1725-1729, 1999.

Pinhati HMS, Moura EB, Damasceno CMG. Bactérias multirresistentes: enfoque sobre os gram-negativos hospitalares. *Brasília Med*; v. 47, n.4, p.460-464, 2010.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003. 325 pp.

Porto ML, Callegari Jacques SM, Sfogiamiotto ST, Waechter JL, Detoni M. tribo Spermacoceae. Rubiaceae I. In: Homrich MH (Coord.). Flora ilustrada do Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto Central de Biociências*, v.35, p. 114, 1977.

Rao VSN, Menezes AMS, Gadelha MGT. Antifertility Screening of some indigenous plants of Brazil. *Fitoterapia*, v.59, n.1, p.17-20, 1988.

Rates, SMK. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de farmacognosia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.11, p.15-19, 2001.

Reher G, Kraus LJ, Sinnwell V, König WA. A neoflavonoid from *Coutarea hexandra* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, v.22, n.6, p.1524-1525, 1983.

Rodrigues AG. Buscando Raízes. *Horizontes Antropológicos* [online], v.7, n.16, p. 131-144, 2001.

Ruiz-Bustos E, Velazquez C, Garibay-Escobar A, García Z, Plascencia-Jatomea M, Cortez-Rocha MO, Hernandez-Martínez J, Robles-Zepeda RE Antibacterial and antifungal activities of some Mexican medicinal plants. *Journal of Medicinal Food*, v.12, n.6, p.1398–1402, 2009.

Sahpaz S, Gupta MP, Hostettmann K. Triterpene saponins from *Randia Formosa*. *Phytochemistry*, v.54, p.77-84, 2000.

Salama HMH, Marraiki N. Antimicrobial activity and phytochemical analyses of *Polygonum aviculare* L. (Polygonaceae), naturally growing in Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*. v.17, p.57–63, 2010.

Santos MFS, Czezko NG, Nassif PAN, Ribas-Filho JM, Alencar BLF, Malafaia O, Ribas CAPM, Trautwein VM, Henriques GS, Maia JMA, Bittencourt RCA. Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.21 (Supl. 3), p.2-7, 2006.

Saravanan P, Ramya V, Sridhar H, Balamurugan V, Umamaheswari S. Antibacterial activity of *Allium sativum* L. on pathogenic bacterial strains. *Global Veterinaria*, v. 4, n. 5, p. 519-522, 2010.

Serpa R, Castelli RM, Bobrowski VL, Ribeiro GA. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. sobre patógenos veiculados por alimentos. *XVI Congresso de iniciação científica, VIII Encontro de Pós graduação. Universidade Federal de Pelotas*. 2006.

Shaw PE, Moshonas MG, Baldwin EA. Volatile constituents of *Coccoloba uvifera*. *Phytochemistry*, v.31, n.10, p.3495-3497, 1992.

Silva Junior, I F, Cechinel Filho V, Zacchino SA, Lima JCS, Martins DTO. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p. 242-248, 2009.

Silva, P. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1398pp. 2006.

Silva-Brambilla MG, Moscheta IS. Anatomia foliar de Polygonaceae (Angiospermae) da planície de inundação do alto rio Paraná. *Acta Scientiarum*, v.23, n.2, p.571-585, 2001.

Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, D. A microwell cytotoxicity using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.*, **59**, 250-252. 1992.

Sousa MP, Rouquayrol MZ. Molluscicidal activity of plants from Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, v. 7, n. 4, p. 389-393, 1974.

Stehling EG, Silveira WD, Leite DS. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.12, n.1, p. 86-88, 2008.

Teixeira LM, Santos KRN, Bueris V, Trabulsi LR. *Staphylococcus aureus*. In: Trabulsi, LR, Alterthum F. (Org.). *Microbiologia*. 5 ed., São Paulo: Atheneu, 2008. p. 175-182.

Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto e Contexto de Enfermagem*, v.15, n.1, p.115-21, 2006.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 780pp.

Trovão, DMBM, Silva, SC, Silva, AB, Vieira Jr. RL. Estudo comparativo entre três fisionomias de Caatinga no estado da Paraíba e análise do uso das espécies vegetais pelo homem nas áreas de estudo. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.4, n.2, p.1-5, 2004.

Tsuboy MS, Marcarini JC, Ferreira DT, Ferraz ERA, Chequer FMD, Oliveira DP, Ribeiro LR, Mantovani MS. Evaluation of extracts from *Coccoloba mollis* using the Salmonella/microsome system and *in vivo* tests. *Genetics and Molecular Biology*, v.33, n.3, p.542-548, 2010.

Tuon FF, Nicodemo AC. *Candida albicans* skin abscess. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 48, n.5, 2006.

Ulukanli Z, Ulukanli S, Ozbay H, Ilcim A, Tuzcu M. Antimicrobial activities of some plants from the Eastern Anatolia region of Turkey. *Pharmaceutical Biology*, v.43, n.4, p.334-339, 2005.

Val, I.C.C., Almeida Filho, G.L. Abordagem atual da candidíase vulvovaginal. *Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis*, v.13, p.3-5, 2001.

Vale, N.B. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.52, p.368-380, 2002.

Vargas Ramirez L; Quintana Peñandra G. 1995 *apud* Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tae A, Deharo E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v.69, p.139-155, 2000.

Venzke D, Serpa R, Lima MC, Ribeiro GA, Freitag RA, Bretanha LC, Gouvêa DP. Eficiência do Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio em teste de atividade antibacteriana "in vitro". XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul). FURB, 13 a 15 de novembro de 2008.

VIEIRA, F. T. Compostos organoestânicos com ação farmacológica. Belo Horizonte, 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais.

Virtuoso S, Davet A, Dias JFG, Cunico MM, Miguel MD, Oliveira AB, Miguel OG. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd, Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, p.137-141, 2005.

Wall ME, Wani MC, Hughes TJ, Taylor H. Plant antimutagenic agents, 1. General bioassay and isolation procedures. *Journal of Natural Products*, v.51, p.866-873, 1988.

Wanyoike GN, Chhabra SC, Lang'at-Thoruwa CC, Omarb SA. Brine shrimp toxicity and antiplasmodial activity of five Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.90, p. 129–133, 2004.

Ward OS. Systematics, biogeography and host plant association of the *Pseudomyrmex viduus* group (Hymenoptera: Formicidae), *Triplaris* – and *Tachigali*-inhabiting ants. *Zoological Journal of the Linnean Society*, p.126, p.451-540, 1999.

WHO – World Health Organization. Monographs on selected medicinal plants. Vol. 1. 1999.

WHO - World Health Organization. Traditional medicine strategy 2002-2005. Geneve: World Health Organization. 2002.

Winkelman M. Frequently used medicinal plants in Baja California Norte. *Journal of Ethnopharmacology*, v.18, n.2, p.109-131, 1986.

Wurm M, Kacani L, Laus G, Keplinger K, Dierich MP. Pentacyclil oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte-proliferation-regulating factors. *Planta Medica*, v.64, p.701-704, 1998.

Yasunaka K, Abe F, Nagayama A, Okabe H, Lozada-Perez L, Lopez-Villafranco E, Muñiz EE, Aguilar A, Reyes-Chilpa R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, v.97, p.293–299, 2005.

Zeng, H.; Tian, J.; Zheng, Y.; Ban, X.; Zeng, J.; Mao, Y.; Wang, Y. ***In vitro*** and ***in vivo*** activities of essential oil from the seed of ***Anethum graveolens*** L. against ***Candida*** spp. Evid Based Complement Alternat Med. V. 2011, Article ID 659704, 8 p., 2011.

Zgoda JR, Porter JR. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. ***Pharmaceutical Biology***, v.39, p. 221-225, 2001.