

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

SANDRA MÁRCIA MAZUTTI DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES
VEGETAIS DO BIOMA CERRADO

BRASÍLIA-DF
2013

SANDRA MÁRCIA MAZUTTI DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES
VEGETAIS DO BIOMA CERRADO

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Faculdade
de Ciências da Saúde, Universidade
de Brasília, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador (a): Prof^a. Dra^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

BRASÍLIA-DF
2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 1013624.

Silva, Sandra Márcia Mazutti da.
S586a Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies
vegetais do bioma Cerrado / Sandra Márcia Mazutti
da Silva. -- 2013.
113 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília,
Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, 2013.
Inclui bibliografia.
Orientação: Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista.

1. Plantas medicinais. 2. Cerrados. 3. Agentes
anti-infecciosos. I. Batista, Pérola de Oliveira Magalhães Dias.
II. Título.

CDU 633.88

SANDRA MÁRCIA MAZUTTI DA SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES VEGETAIS DO
BIOMA CERRADO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em.....dede 2013.

Banca Examinadora

Prof^a. Dra^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dra^a. Yris Maria Fonseca
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dra^a. Eliete Neves da Silva Guerra
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

*Dedico e consagro ao generoso Deus,
que além de pai é minha inspiração e
razão maior da existência da vida,
por ser a fortaleza e conforto presente
em todos os dias do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

Prezado (as),

Não tenho como descrever a satisfação e o grande privilégio em ter feito parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos - UnB. Esta parceria não foi só um agregador de conhecimento mas serviu para tecer laços de relacionamento e de amizade entre os companheiros que encontrei nesta caminhada. E este convívio e momentos prazerosos que desfrutei nesses dias, tornaram-se inesquecíveis e, certamente, agregaram à minha vida um valor especial, representado por algo incalculável: um valor emocional.

A Deus, que além de pai é minha inspiração e razão maior da existência da vida, por ser a fortaleza e conforto presente em todos os dias do meu viver. Senhor meu pai, meu muitíssimo obrigado por estes caminhos percorridos e pessoas que conheci, que com esta convivência me iluminou e proporcionou a chance de participar de sua obra.

À UnB, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado.

À FIOCRUZ - Rio de Janeiro, por ter fornecido as cepas ATCC para o experimento.

À CAPES pelo apoio financeiro recebido.

À minha orientadora, Professora Dr^a Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista, agente transformadora do meu conhecimento, pela possibilidade do meu desenvolvimento pessoal e profissional por intermédio da concretização deste passo adiante, meus sinceros agradecimentos pelo seu diferencial que foi propiciar-me constantemente uma sensação de acolhimento da qual pude desfrutar neste período.

À Professora Dr^a Dâmaris da Silveira do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos - UnB, que com sua cordial atenção e amizade me ajudou, colaborou e contribuiu com seus ensinamentos fitoquímicos para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Professora Dr^a Yris Maria Fonseca do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos - UnB, pela colaboração, pela valiosa amizade e sugestões.

À equipe de Professores e organizadores do mestrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Saúde - UnB, pela dedicação, pelos ensinamentos e competência.

Aos colegas Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos - UnB, pelas contribuições, cooperação, gentilezas e amizade recebidos em todos os momentos que compartilhamos, somando ou dividindo esforços nesta caminhada.

À toda equipe da Secretaria do Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas e de Ciências da Saúde pela colaboração prestada.

Ao Senhor André Guerreiro, FIOCRUZ - Brasília, pelo auxílio do envio e recebimento das cepas advindas da FIOCRUZ - Rio de Janeiro.

À Francielle Pantela, pela atenção.

À Drª Sílvia Elias, pela colaboração com os experimentos realizados no Laboratório de Histopatologia Bucal.

À minha educadora, minha querida mãezinha, Vilma, meu maior exemplo de vivências em prol do empoderamento proposto pelo ilustríssimo e consagrado Paulo Freire, além de ser alguém que inspira-me imenso orgulho.

Ao Magela, meu amado esposo, ser especial que consignou sua vida a minha, preenchendo plenamente de amor e sabedoria no nosso cotidiano e cujo companheirismo tem me inspirado.

Às minhas filhas, Fabyanne e Giovana, que são a luz e a razão do meu viver.

Os meus irmãos Antônio, Sarita, Marita, Nádia, Robson e Joffer, queridos companheiros nesta caminhada de vida permeada de união, carinho, experiências vivenciadas e conhecimentos.

Aos meus sobrinhos Alice e Gabriel; Jeter Filho, João Pedro e Felipe; João Vitor, Francielle, Gabriele, Diego, Roberta, Rafaela e a pequena Rebeca....

Aos meus cunhados Edileusa, Cláudio, Luís, Marcelo, Joelma, Lúcia, Aparecida, Amazeli e Cláudia por serem pessoas que aliaram-se a minha família e fazem a diferença no nosso viver.

Aos demais componentes do grupo familiar, o meu apreço.

À querida e companheira Edinalva, pelo auxílio e compreensão.

A todos, que me ajudaram nesta jornada o meu carinho, reconhecimento e agradecimentos eternos.

*"Se enxerguei mais longe
foi porque subi em ombros de gigantes"*
Isaac Newton

*"Todo conhecimento tem
princípio nos sentimentos"*
Leonardo da Vinci

SILVA, Sandra Márcia Mazutti da. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Espécies Vegetais do Bioma Cerrado**. Brasília, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

RESUMO

Atualmente, os desafios impostos pelas doenças causadas por bactérias resistentes aos fármacos disponíveis são considerados um problema de saúde mundialmente. A expressiva necessidade de descobertas de novos fármacos torna-se imprescindível devido a inerente seleção natural, propiciada em parte pelo uso inadequado de antimicrobianos na medicina ou em plantéis de produção. Em face ao exposto, no presente estudo foi realizado um *screening* buscando avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos e frações de espécies vegetais oriundas do bioma Cerrado do Distrito Federal e arredores. As espécies selecionadas foram *Bauhinia rufa* (Bong) Steud, *Bauhinia variegata* Linn, *Erythroxylum subrotundum* St. Hill., *Erythroxylum daphnites* Mart, *Pouteria torta* Radlk., *Pouteria ramiflora* Radlk. e *Eugenia dysenterica* DC., as quais foram testadas contra *Staphylococcus aureus* (25923), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) e *Escherichia coli* (25922) utilizando o método de disco difusão para predizer a sensibilidade destes. Em sequência foi realizado o biomonitoramento do extrato bruto e das frações desta planta frente a diversos isolados de bactérias Gram-positivas de relevância clínica, sendo preconizado o método de microdiluição em placas. Sobressaiu-se nestes testes a fração acetônica de *E. dysenterica* ao apresentar zona de inibição de 10mm com uma Concentração Inibitória Mínima de 250µg por disco difusão e 83µg/mL por microdiluição, além de modular a ação de agentes β-lactâmicos, demonstrando a sensibilidade de bactérias Gram-positivas à espécie. De todos os extratos testados nenhum apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas Gram-negativas, *P. aeruginosa* e *E. coli*. A prospecção fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada e por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da *E. dysenterica* evidenciou a presença dos flavonóides catequinas e epicatequinas que podem ser os metabólitos secundários responsáveis pela sua efetiva atividade antimicrobiana. Considerando os resultados obtidos, a *E. dysenterica* é uma espécie promissora como insumo brasileiro, para o desenvolvimento de fitoterápicos a cosméticos.

Palavras-chave: Espécies nativas do Cerrado, *Eugenia dysenterica*, atividade antimicrobiana, *Staphylococcus aureus*, Concentração Inibitória Mínima (CIM).

SILVA, Sandra Márcia Mazutti da. **Evaluation of Antimicrobial Activity of Plant Species from the Cerrado biome.** Brasília, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

ABSTRACT

Currently, the challenges posed by diseases caused by bacteria resistant to available drugs are considered a health problem worldwide. The need for significant discoveries of new drugs becomes essential due to inherent natural selection, fostered in part by the inappropriate use of antimicrobials in medicine or in flocks of production. In view of the above, in this study, a screening was performed by assessing the *in vitro* antibacterial activity of crude extracts and fractions derived from plant species of the Cerrado biome of the area Federal District. The species selected were *Bauhinia rufa* (Bong) Steud, *Bauhinia variegata* Linn, *Erythroxylum subrotundum* St. Hill., *Erythroxylum daphnites* Mart., *Pouteria torta* Radlk., *Pouteria ramiflora* Radlk. and *Eugenia dysenterica* DC., which were tested against *Staphylococcus aureus* (25923), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) and *Escherichia coli* (25922) using the disk diffusion method to predict their sensitivity. With a considerably positive response to *E. dysenterica* against *S. aureus*, proceeded a biomonitoring of crude extract and fractions of this plant against various isolates of Gram - positive bacteria of clinical relevance, and the recommended method of microdilution plates. Stood out in these tests acetonic fraction of *E. dysenterica* that presented 10mm inhibition zone with a Minimum Inhibitory Concentration of 250µg for disk diffusion and 83µg/mL in microdilution method, in addition to modulate the action of β-lactam agents, demonstrating the sensitivity of the Gram-positive bacteria species. All the extracts tested showed no antimicrobial activity against Gram-negative strains, *P. aeruginosa* and *E. coli*. The phytochemical screening Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) of *E. dysenterica* revealed the presence of flavonoids catechins and epicatechins, which may be secondary metabolites responsible for effective antimicrobial activity. Considering these results, *E. dysenterica* is a promising species as genuinely national input, coming from the Savannah to the development of herbals and cosmetics.

Key words: Native species of the Cerrado, *Eugenia dysenterica*, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*, Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura das flavanas catequina e seu isômero epicatequina.....	25
Figura 2. <i>Eugenia dysenterica</i> (A) espécime, (B) flores e frutos no Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília UnB Brasil.....	42
Figura 3. Esquema para obtenção dos extratos brutos.....	47
Figura 4. Esquema para obtenção das frações após a extração por lavagem.....	51
Figura 5. Esquema para obtenção das frações por partição entre líquidos imiscíveis.....	53
Figura 6. Esquema para realização do <i>checkerboard</i> ou 'tabuleiro de xadrez'.....	61
Figura 7. Perfil de <i>S. aureus</i> em relação ao extrato aquoso e às frações de <i>E. dysenterica</i> usando o método de microdiluição em caldo.....	74
Figura 8. Perfil da CCD de <i>Eugenia dysenterica</i> . A: Fluorescência sob luz UV do extrato aquoso (1), fração acetônica (2), fração metanólica (3) e fração isopropanólica (4) comparados aos padrões de catequina (5) e epicatequina (6); B: Revelação com solução de Vanilina/Ácido para o extrato aquoso bruto (1), fração acetônica(2), fração metanólica (3) e fração isopropanólica (4) comparados aos padrões de catequina (5) e epicatequina (6).....	81
Figura 9. Perfil cromatográfico da fração acetônica de <i>E. dysenterica</i>	82
Figura 10. Perfil do efeito citotóxico da <i>Eugenia dysenterica</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Espécies vegetais nativas do Cerrado avaliadas quanto à atividade antimicrobiana.....	47
Tabela 2- Obtenção dos extratos brutos das espécies de plantas do Cerrado.....	49
Tabela 3- Rendimento da extração do extrato aquoso de <i>Eugenia dysenterica</i> e de <i>Erythroxylum daphynites</i> por lavagem.....	51
Tabela 4- Rendimento do fracionamento do extrato etanólico de <i>Bauhinia rufa</i> e de <i>Erythroxylum daphynites</i> por partição entre líquidos imiscíveis.....	52
Tabela 5- Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos testados pelo método de difusão em disco ativos frente a <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	67
Tabela 6- Concentração inibitória mínima (CIM) das frações de extratos testados pelo método de difusão em disco ativos frente a <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	69
Tabela 7- Perfil da atividade antimicrobiana, CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extrato aquoso e frações de folhas de <i>E. dysenterica</i> pelo método de microdiluição em caldo para diferentes isolados de patógenos oportunistas.....	72
Tabela 8- Avaliação da atividade moduladora na cepa <i>S. aureus</i> 29213.....	79
Tabela 9- Composição fitoquímica da <i>Eugenia dysenterica</i>	83
Tabela 10- Medidas de diâmetro em (mm) dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidas por difusão em disco utilizando substâncias puras em cepas de bactérias ATCC.....	85
Tabela 11- Concentração inibitória mínima (CIM) $\mu\text{g/mL}$ das substâncias puras em cepas de bactérias ATCC pelo método de microdiluição em caldo.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AMH	Ágar Mueller Hinton
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BMH	Caldo Mueller Hinton
c	caule
CAMHB	Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado
CA-MRSA	<i>S. aureus</i> meticilina resistente comunitário adquirido
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CEME	Central de Medicamentos
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIF	Concentrações Inibitória Fracionada
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOU	Diário Oficial da União
EDA	Extrato aquoso bruto de <i>Eugenia dysenterica</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
f	Folha
FA	Fração acetônica de <i>Eugenia dysenterica</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
MHA	Mueller Hinton Ágar
MHB	Mueller Hinton Caldo
MRSA	<i>S. aureus</i> Resistente a Meticilina
NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucléico
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
PBP	Proteína de Ligação da Penicilina
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PEG	Polietilenoglicol
pf	Peso final
pi	Peso inicial
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
UnB	Universidade de Brasília
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultra violeta
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 ARTE DO CONHECIMENTO DAS PLANTAS MEDICINAIS.....	20
2.2. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	24
2.3 ARCABOUÇO LEGAL DAS POLÍTICAS PÚBLICAS BRASILEIRAS REFERENTES À PLANTAS MEDICINAIS.....	27
2.4 PANORAMA MERCADOLÓGICO DOS FITOTERÁPICOS.....	28
2.5. RELEVÂNCIA DAS INFECÇÕES MICROBIANAS, A RESISTÊNCIA BACTERIANA E AS CLASSES DE ANTIBIÓTICOS.....	29
2.6 ATIVIDADE MODULADORA PELA COMBINAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS: SINERGISMO.....	34
2.7 A BIODIVERSIDADE DA SAVANA BRASILEIRA.....	36
2.8 DESCRIÇÃO BOTÂNICA, FARMACOLÓGICA E FITOQUÍMICA DAS ESPÉCIES NATIVAS DO CERRADO SELECIONADAS PARA O SCREENING ANTIMICROBIANO.....	37
2.8.1 Família Erythroxylaceae, Gênero <i>Erythroxylum</i>	37
2.8.2 Família Leguminosae, Gênero <i>Bauhinia</i>	38
2.8.3 Família Sapotaceae, Gênero <i>Pouteria</i>	39
2.8.4 Família Myrtaceae, Gênero <i>Eugenia</i>	40
3 OBJETIVOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 MÉTODOS GERAIS.....	46
4.1.1 Obtenção dos Extratos e Frações	46
4.1.1.1 Material Vegetal.....	46
4.1.1.2 Obtenção dos Extratos.....	47
4.1.1.3 Obtenção das Frações de <i>Eugenia dysenterica</i> e de <i>Erythroxylum daphnites</i> por Lavagem.....	50
4.1.1.4 Fracionamento do Extrato Etanólico de <i>Bauhinia rufa</i> e de <i>Erythroxylum</i> <i>daphnites</i> por Partição entre Líquidos Imiscíveis.....	52
4.1.2 Preparo das Soluções	54
4.1.2.1 Preparo das Soluções de Extrato.....	54
4.1.2.2 Preparação dos Discos com as Soluções dos Extratos ou Frações.....	54
4.1.2.3 Preparo da Solução Salina 0,9%.....	54
4.1.2.4 Preparo da Solução de DMSO 5%.....	55
4.1.2.5 Preparo da Solução de Resazurina 0,01%.....	55
4.1.2.6 Preparo das Soluções Tampão.....	55
4.1.2.7 Preparo das Soluções Estoque dos Agentes Antimicrobianos.....	56
4.1.2.8 Preparo do Meio Mueller Hinton Cátion Ajustado - CAMHB.....	56
4.1.3 Ensaios Biológicos	57
4.1.3.1. Micro-organismo Avaliados.....	57
4.1.3.2 Preparo do Inóculo Bacteriano e Padronização.....	57
4.1.3.3 Método de Difusão em Disco.....	58
4.1.3.4 Método de Microdiluição em Caldo.....	59
4.1.3.5 Atividade Moduladora pelo Método de <i>Checkerboard</i> - "Tabuleiro de Xadrez".....	59
4.1.4 Agentes Antimicrobianos	61
4.1.5 Análises Cromatográficas	61

4.1.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	62
4.1.5.1.1 fase estacionária.....	62
4.1.5.1.2 fase móvel.....	62
4.1.5.1.3 reveladores e reagentes.....	62
4.1.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	63
4.1.6 Ensaio de citotoxicidade.....	64
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	66
5.2 ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE <i>EUGENIA DYSENTERICA</i>	71
5.3 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DA <i>EUGENIA DYSENTERICA</i>	80
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS E DOS SOLVENTES.....	84
5.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE.....	86
6 CONCLUSÃO.....	89

1 INTRODUÇÃO

A prática milenar do uso de plantas pelo homem para manter-se hígido encontra-se documentada nos registros encontrados pelo mundo, sendo possível conhecer o poder das plantas sob uma perspectiva instigadora: a de promoção da saúde. Neste sentido, apesar das práticas medicinais tradicionais não serem atualmente adotadas de forma segura e eficaz, a tecnologia científica pode possibilitar o acesso a esta prática terapêutica de maneira coerente. Assim, a medicina tradicional associada à tecnologia pode contribuir para a compreensão da fisiopatologia de doenças e o restabelecimento da saúde, além de habilitar o uso destes recursos naturais. Então, a partir desta conjuntura, nos últimos anos, tem-se verificado uma expressiva retomada da valorização da identidade cultural dos povos, aliando-se conhecimentos e com isso buscando-se validar o que se conhece empiricamente para favorecer a disponibilização de produtos seguros, visto que o saber etnobotânico também é um dos requisitos imprescindíveis na triagem de plantas com potencial terapêutico, e este fato vem se consolidando a cada dia (COWAN, 1999; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

Ressalta-se ainda que, nos países em desenvolvimento, reconhecidamente cerca de 80% da população recorre à Medicina Tradicional, incluindo a fitoterapia como a principal forma de assistência médica primária para suprir suas necessidades de saúde (WHO, 2002c); fato que se dá devido à falta de acesso a assistência médica ou até mesmo à inexistência desta (BASSO *et al.*, 2005; BRASIL, 2006). Esta parcela da população representa cerca de 3,5 bilhões de indivíduos (AGYARE *et al.*, 2013); entretanto, recentemente, ante uma perspectiva de mudança do contexto, esta conduta alternativa à medicina convencional está sendo adotada entre diversas nações desenvolvidas, propulsionando maior interesse e demanda a este nicho de mercado (OLIVEIRA, F. Q. *et al.*, 2007).

Além disso, as pessoas têm alinhado estratégias dirigidas à manutenção da qualidade de vida. Clinicamente, tem-se utilizado com frequência tratamentos por meio da combinação de medicamentos, buscando-se opções alternativas, evidenciando que há uma relação intrínseca entre bem-estar e recursos naturais; sendo assim, estes anseios têm sido alvo de novas terapêuticas e aspirações (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010; WIGGINS, 2012).

A multiplicidade de princípios ativos produzidos pelas plantas medicinais pode auxiliar ou contribuir com estes anseios. Isto é reconhecidamente devido à enorme diversidade de espécies de plantas existentes na flora global e a significativa variabilidade de biomoléculas expressas por estas, onde muitas detêm importantes propriedades biofarmacológicas de expressivo valor (MOREIRA;GUARIM-NETO, 2009). Os metabólitos secundários advindos de folhas, raízes, caule, flores, cascas e seus derivados compõem a base terapêutica ofertada pela natureza, ou seja, a base primária para o isolamento ou síntese de fármacos. Estes compostos ativos apresentam-se distribuídos em diferentes classes fitoquímicas de interesse farmacológico, incluindo flavonoides, terpenoides, esteroides, taninos, alcaloides, dentre outros (KUETE, 2010; LIMA *et al.*, 2011).

A magnitude de probabilidades de o Brasil ser um local em destaque como fornecedor destas matérias-primas tem sido visualizada mundialmente, uma vez que, quanto ao *status* florístico, o Brasil tem alguns dos mais ricos biomas do mundo, com uma ampla diversidade biológica dispersa ao longo dos vários ecossistemas, cada um dos quais com uma exuberância natural intrínseca. Existem mais de 55.000 espécies de plantas catalogadas de um patrimônio estimado entre 350.000 a 550.000 (SIMÕES *et al.*, 2002), distribuídas em seus biomas, o que o torna uma potência energética ambiental. O destaque do bioma Cerrado é, em particular, a superioridade de sua fitofisionomia específica (RIBEIRO *et al.*, 1998) e o endemismo (MYERS *et al.*, 2000).

Ao longo dos anos, as tendências globais vêm se consolidando num vultuoso interesse nesta riqueza e, conjuntamente a este sentido, sinalizam também a necessidade de primar-se pela busca de segurança e sustentabilidade. Esta visão contemporânea engloba o aproveitamento de recursos advindos de plantas medicinais seguros e eficazes. Para que possam contribuir com esta concepção, além de cooperar com a conservação da diversidade cultural e dos ecossistemas, deve haver manejo ecologicamente correto das plantas coletadas, proporcionando novas oportunidades tanto econômicas como sociais e, conseqüentemente, evitando-se a extinção de espécies, isto é, fazer uso racional e sustentável dos recursos dos celeiros naturais. Desta forma, cria-se um novo paradigma: permitir que o conhecimento etnobotânico e os recursos ambientais sejam aproveitados de maneira versátil e, paralelamente, preservados para estarem garantidos e acessíveis às futuras gerações. Esta perspectiva abrange a utilização de compostos bioativos

resultantes do metabolismo secundário, presentes na diversidade florística, ou seja, no patrimônio natural vegetal (BRESOLIN;CECHINEL FILHO, 2010; HARAGUCHI;CARVALHO, 2010) para o desenvolvimento de drogas inovadoras e mais eficazes, uma vez que dados recentes afirmam que o reino Plantae é uma rica fonte de recursos base para a biossíntese e prospecção de fármacos (NEWMAN;CRAGG, 2012). Com essa abordagem, na qual todas as dimensões (ambiental, social, ética, cultural, econômica, política, etc.) são consideradas e inter-relacionadas para agirem em complementaridade, pode-se fomentar o almejado sentido amplo da sustentabilidade e promoção da saúde.

Outra visão que promoveu transformações foi a da globalização. Sob este ponto de vista, esta tem promovido mudanças em todo o mundo, com impactos econômicos significativos, além de colocar a coesão da saúde em risco, uma vez que as doenças infecciosas humanas e animais aumentaram sua incidência nos últimos anos, destacando-se o relevante aumento das infecções causadas por bactérias Gram-positivas (AGUIAR *et al.*, 2012; AHMED *et al.*, 2012; DIAB; ATALLA;ELBANNA, 2012; SPELLBERG; BARTLETT;GILBERT, 2013). Com este panorama vislumbrado, torna-se eminente a necessidade atual e a demanda do mercado por novas opções terapêuticas, ressaltando-se dentre estas a busca por novos fármacos para doenças infecciosas que atendam a esses intentos. Drogas vegetais, além destas possibilidades, podem apresentar reduzidos efeitos adversos indesejados ou ausência destes, além de serem o alvo de pesquisas científicas a favor da redução das resistências microbianas e da cadeia produtiva farmacêutica (BRESOLIN;CECHINEL FILHO, 2010). Derivados da expressiva relevância do propósito, incentivos têm sido empregados na avaliação da atividade biológica na área de medicamentos fitoterápicos, como a busca por fármacos antimicrobianos eficazes na sensibilização ou danificação do patógeno-alvo, ou seja, que sua ação biológica seja a mais seletiva possível e com menores efeitos indesejáveis. Espécies vegetais têm sido foco das pesquisas nas áreas de medicamentos, tais como antibióticos que superem a ineficiência do arsenal disponível (BRESOLIN;CECHINEL FILHO, 2010). Assim, pela relevância da questão e com o intuito de encontrar agentes que atuem inibindo o desenvolvimento ou a resistência de micro-organismos, a busca de soluções e a validação dos multicomponentes terapêuticos botânicos, por exemplo, de extratos vegetais e suas frações, são importantes para o desenvolvimento das terapêuticas adotadas. Estes, aliados à

validação e padronização dos componentes, são relevantes para a segurança e eficácia química e biológica dos compostos, estando claro que o elo que necessariamente irá prevalecer serão as orientações dos protocolos e as conjunturas que os embasam.

Por outro lado, a expressiva necessidade de descobertas de novos fármacos torna-se imprescindível devido à inerente seleção natural realizada pelos antibióticos, seja pelo uso inadequado de antimicrobianos ou por métodos alternativos de resistência, por exemplo transferência de plasmídeos; o que implica na refratariedade à ação dos antimicrobianos disponíveis no mercado, revelando um novo cenário, o qual alerta a comunidade mundial para os cuidados de saúde sob uma perspectiva alarmista (GOODMAN;GILMAN, 2010). Neste sentido, a sociedade encontra-se ávida por novos fármacos, razão pela qual o capital natural do Brasil passa a ser um ativo, com um enorme potencial como fonte de recursos genéticos para atender a essas demandas do mercado e gerar soluções para doenças infecciosas, e mais, contribuir para amenização de custos (BRESOLIN;CECHINEL FILHO, 2010).

Neste contexto, a identificação de espécies vegetais com atividade inibitória de micro-organismos causadores de infecções no homem, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, poderá contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos, melhorando a qualidade de vida dos pacientes com agravos tais como piodermites, gastroenterites, infecções nosocomiais e demais doenças oportunistas, além de promover uma exploração racional e autosustentável. Neste sentido, o bioma Cerrado, com sua incomensurável riqueza vegetal e cultural, contribui com incentivos à produção nacional e à pesquisa, no intuito de identificar novas espécies vegetais e compostos bioativos, que possuam propriedades terapêuticas e potencial atividade antimicrobiana, somando oportunidades para solucionar desafios impostos a sociedade e satisfazer estas novas concepções. Assim, frente ao exposto e para que promissoras evoluções se processem no tratamento farmacológico das doenças infecciosas, utilizando metabólitos secundários como um modelo para a produção de medicamentos antimicrobianos, este estudo teve como objetivo investigar as propriedades antimicrobianas de extratos de plantas nativas do Cerrado em micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos de relevância médica. Além disso, *Eugenia dysenterica*, uma espécie especialmente promissora, foi investigada,

incluindo sua análise fitoquímica e citotóxica, bem como sua combinação com fármacos de uso clínico. Sendo assim, essa prospecção foi realizada baseando-se em métodos qualitativos e quantitativos; e a fração mais ativa de metabólitos secundários foi utilizada para a detecção dos níveis de variações de sensibilidade dos micro-organismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ARTE DO CONHECIMENTO DAS PLANTAS MEDICINAIS

Ao longo do tempo e ao regressarmos às origens, às organizações sociais e às mais variadas formas de expressão cultural humanas, estas nos recordam e revelam-nos, por meio de registros do usufruto das plantas medicinais, que este hábito surgiu na pré-história, a partir da aliança entre conhecimento, saberes e práticas e com base em celebrações, observações e experiências a favor da manutenção da saúde, sendo considerado análogo ao comportamento animal de primatas (HART, 2005), aves e insetos (KRIEF; HLADIK; HAXAIRE, 2005). Desde então, com esta âncora evolucionária e comportamental, o homem passou a compreender, por meio de evidências, que as plantas são fonte de saúde, mas que também podem ser nocivas (HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

Portanto, à medida que consolidaram-se e expandiram-se as civilizações, da visão empírica progrediu-se para o embasamento em evidências científicas. Assim, a prática da fitoterapia remonta ao início das civilizações, período em que estes pioneiros obtiveram as primeiras constatações de cura advindas de plantas, sendo inegável que esta prática está intimamente ligada ao desenvolvimento da humanidade, ou seja, andam em paralelo (COWAN, 1999).

Os acervos literários mundiais dispõem de descrições sobre o uso de plantas com fins terapêuticos, conduzido pela humanidade e evidenciam as virtudes florísticas globais, permitindo ser possível conhecer o poder das plantas sob uma perspectiva instigadora: a promoção da saúde. Os primórdios desta prática pelos nossos ancestrais estão registrados em vários documentos, que são alguns dos tesouros das antigas civilizações e que foram preservados para a humanidade, resgatando o percurso do conhecimento medicinal a cerca dos recursos vegetais.

Achados de mais de 60 mil anos registram que Neanderthals foram os primeiros usuários de plantas para fins medicinais (HART, 2005), dentre elas a *Alteia officinalis* L. (HARAGUCHI; CARVALHO, 2010) e a *Malva sylvestris* L. (COWAN, 1999). Os hebreus registraram seus conhecimentos a cerca do uso de plantas medicinais em manuscritos religiosos (COWAN, 1999). Registros indicam que

algumas plantas como o tomilho (*Thymus vulgaris* L.), o ópio (*Papaver somniferum* L.), o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) e a mostarda (*Sinapis alba* L.) eram utilizados pelos sumérios em 4.000 a.C., enquanto que os povos babilônicos usavam, além destas, açafão (*Crocus sativus* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), canela (*Cinnamomun zeylagicum* Blume), alho (*Allium sativum* L.), sene (*Senna alexandrina* Mill.) e resina de benjoim (*Styrax benzoin* Dryand) (HARAGUCHI;CARVALHO, 2010).

Na China, em 3000 a.C., o imperador Sheng-Nung elaborou o documento que deu origem à primeira farmacopeia, o PEN TSAO, o qual comporta descrições sobre o uso do óleo de chalmogra (*Hydnocarpus wightiana*) para lepra e da *Ephedra sinica* Stapf (Ma-Huang) (efedra) para amenizar sintomas respiratórios (CHEVALLIER, 1996; JORGE, S., 2009). Além destes, descreveu também o ginseng (*Panax ginseng* C.A.Meyer), o acônito (*Aconitum napellus* L.), o ruibarbo (*Rheum officinale* L.) e a cânfora (*Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl) (GILBERT; FERREIRA;ALVES, 2005).

O documento Papiro de Ebers, datado de 1550 a.C., procedente do Egito, foi a publicação que primeiramente levantou dados que resultaram em um tratado médico fitoterápico. Este elenca plantas como a babosa (*Aloe vera* (L.) Mill), o absinto (*Artemisia absinthium* L.), a hortelã (*Mentha piperita* L.) e cerca de 800 formulações (JORGE, S., 2009; HARAGUCHI;CARVALHO, 2010), além de outras plantas como a *Commiphora molmol* (Engl.) e o *Allium sativum* L. (CHEVALLIER, 1996).

Em meados de 2300 a.C., era tendência entre diversos povos, como egípcios, assírios e hebreus, cultivar plantas ou transportá-las das regiões por eles exploradas; portanto, as descobertas das rotas marítimas comerciais e das grandes navegações possibilitaram uma expressiva troca de espécimes, conhecimentos e experiências sobre plantas medicinais (JORGE, S., 2009; HARAGUCHI;CARVALHO, 2010). O cravo da Índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry ou *Eugenia caryophyllata* - família Myrtaceae), por exemplo, foi uma das espécies mais importadas nestas viagens transoceânicas e foi amplamente utilizada como antisséptico e analgésico (CHEVALLIER, 1996); atualmente, é usada na composição de produtos de higiene bucal, devido a altas concentrações de eugenol que a espécie apresenta (WHO, 2002b; OLIVEIRA, F. Q. *et al.*, 2007; FRANCISCO, 2010; VICTORIA *et al.*, 2012), composto com reconhecida atividade antimicrobiana (ZAGO; USHIMARU;BARBOSA, 2009).

Em levantamentos realizados pelo “Pai da Medicina”, Hipócrates (400 a.C.), foram reunidas na obra "Corpus Hipocratium" descrições sobre a prescrição vegetal para cada enfermidade. Este manuscrito reconhece cerca de 400 plantas, dentre elas a erva-doce (*Pimpinella asinum* L.), a salsa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym), o tomilho (*Thymus vulgaris* L.), o funcho (*Foeniculum vulgare* Mill) e o aipo (*Apium graveolens* L.) (COWAN, 1999; JORGE, S., 2009; HARAGUCHI;CARVALHO, 2010).

Na redação da “História das Plantas”, elaborada por Teofrasto (372-285 a.C.), considerado pai da Botânica, foram catalogadas 500 espécies vegetais com descrições botânicas pormenorizadas, salientando os efeitos tóxicos e as propriedades curativas (JORGE, S., 2009; HARAGUCHI;CARVALHO, 2010), sendo ele o primeiro a referir ao poder do ópio (GOODMAN;GILMAN, 2010).

Os primórdios de documentos relatando comprovações científicas do poder medicinal das plantas ocorreu na Grécia, com Dioscórides, século I a.C., que publicou o esboço da farmacopeia, o tratado "*De Materia Medica*" (COWAN, 1999), onde foram inseridas informações sobre mais de 500 plantas medicinais e suas aplicações, sendo algumas utilizadas até os dias atuais (CHEVALLIER, 1996; GILBERT; FERREIRA;ALVES, 2005). Na Idade Média, as imposições realizadas pela Igreja podem ter concorrido para a perda de documentos deste acervo, bem como de informações valiosas (COWAN, 1999; JORGE, S., 2009). Como estes conhecimentos eram fundamentais para a humanidade, estes foram então resgatados por monges, no século XI (HARAGUCHI;CARVALHO, 2010), e por religiosos, no Brasil (JORGE, S., 2009). Dentre estes destacam-se Duarte Pacheco (1506) e os padres José de Anchieta (1553) e Manuel de Nóbrega (1549). A arte literária de seus manuscritos é composta de informações sobre plantas como o *Pilocarpus pennatifolius* Holmes (jaborandi), a *Nicotiana tabacum* L. (fumo), a *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (ipeca) e a *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub (canafístula) (STARLING; GERMANO;SCHMIDT, 2005.).

Em terras brasileiras, Gabriel Soares de Souza, em 1587, foi o responsável pelas informações recolhidas junto aos habitantes nativos e, conseqüentemente, pela elaboração da obra farmacopeica indígena, onde descreveu as plantas cabureíba (*Mycrocarpus frondous* Fr. All.), figueira-do-inferno (*Datura stramonium* L.) e copaíba (*Copaifera langsdorffii* (Desf.) Kuntze (GILBERT; FERREIRA;ALVES, 2005).

Do ocidente, também existem registros sobre os índios mexicanos, que usavam cacto (*Lophophora williamsii* (Lem) Coult.) para curar feridas, o qual tem atividade antimicrobiana comprovada (HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

Muito antes da chegada dos europeus ao Brasil, a população autóctone era composta de diferentes etnias indígenas. Estes habitantes já desfrutavam da biodiversidade de diversas formas e, dentre estas, a medicinal; mas foi com as viagens marítimas que o Brasil foi descoberto e também desvelou-se seu patrimônio natural e cultural. Desde então, foi o reflexo da convivência entre a população nativa com indivíduos de outros continentes que aqui aportaram (europeus, africanos, italianos dentre outros) que estabeleceu-se um intenso intercâmbio e aprimoramento de saberes empíricos sobre as propriedades medicinais das plantas, proporcionando um fluxo bidirecional de informações e de matéria-prima natural (COWAN, 1999; JORGE, S., 2009; PANIZZA; VEIGA; DE ALMEIDA, 2012).

O hábito europeu trouxe ao país tropical plantas medicinais como a *Eugenia caryophyllata* Thunb. (cravo) e a *Cinnamomum zeylagicum* (canela), assim como ervas aromáticas tomilho (*Thymus vulgaris* L.), erva-doce (*Pimpinella asinum* (L.), cebola (*Allium cepa* L.), etc), que são um legado europeu prontamente incorporado pela população brasileira (COWAN, 1999). Por exemplo, a camomila (*Matricaria recutita*), originária da Europa e amplamente utilizada no cotidiano das famílias brasileiras, foi introduzida por meio destas trocas, assim como inúmeras outras espécies (SIMÕES *et al.*, 2002; JORGE, S., 2009). Estas plantas somaram-se ao hábito dos indígenas de consumirem vegetais para fins medicinais, como o óleo de copaíba (*Copaifera landesdorffii*) (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005).

Neste contexto, no século XX, ocorreram os primórdios das mudanças na indústria química farmacêutica, neste período principiaram as buscas de novas opções terapêuticas advindas de plantas, fase em que houve o isolamento de um dos primeiros metabólitos secundários, um alcaloide derivado do ópio, purificado da papoula (*Papaver somniferum* L.), dando origem à morfina, um dos princípios ativos oriundos desta planta de relevante significância na inibição da resposta aos estímulos dolorosos (GOODMAN; GILMAN, 2010).

Por fim, a abundância do patrimônio natural e as diversas possibilidades de consumo (infusão, tintura, óleos, pomadas) aliadas às favoráveis condições bióticas e abióticas do Brasil podem contribuir decisivamente para o progresso da prática da

fitoterapia, seu desenvolvimento e produção, bem como das pesquisas envolvendo os recursos naturais do país.

2.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O uso e a manutenção de recursos naturais racionalmente e de forma sustentável asseguram o usufruto para suprir às necessidades das gerações presentes, não esgotando e deixando-os disponíveis para as gerações futuras. Com estas atitudes e ações, os ecossistemas terão capacidade de prover bens essenciais à humanidade por longo prazo, sendo que este pressuposto abrange a utilização de compostos químicos presentes nas plantas resultantes do metabolismo secundário (NASCIMENTO, 2012).

No reino Plantae, a produção de metabólitos secundários promove adaptações evolutivas e exerce funções de proteção da espécie e, paralelamente, são estes que são utilizados para restabelecimento e promoção da saúde do ser humano (JIRSCHITZKA *et al.*, 2012).

As plantas fornecem uma multiplicidade de compostos vegetais resultantes dos processos de biotransformação de moléculas da planta em resposta às necessidades primordiais e a interações e pressões seletivas provocadas por micro-organismos patogênicos e fitófagos herbívoros presentes no ambiente. Ecofisiologicamente, os metabólitos primários suprem as funções básicas da planta e encontram-se distribuídos de forma universal, enquanto que os metabólitos secundários são um arsenal de substâncias que são biotransformadas em função da demanda de atividades que estão aliadas a papéis importantes, como segurança, adaptação e interação com o meio ambiente, incluindo a perpetuação da espécie em seu habitat, defesa contra predadores e patógenos (HARBORNE, 1999; SIMÕES *et al.*, 2002; PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010; ROCHA *et al.*, 2011), proteção contra os raios ultravioleta (UV), atração de polinizadores ou dispersores de sementes (COWAN, 1999) e dar cor a flores e frutos tornando-os mais atraentes; são ainda estes metabólitos fornecidos pela natureza que abrem enormes perspectivas para a descoberta de fontes de princípios ativos para a manufatura de medicamentos farmacologicamente ativos (CUSHNIE; LAMB, 2005; DEWICK, P. M.,

2011; CECÍLIO *et al.*, 2012). Portanto, a produção e as propriedades dos princípios ativos dos vegetais estão diretamente associadas às adaptações evolucionárias das plantas às condições bióticas e abióticas ambientais (KRIEF; HLADIK; HAXAIRE, 2005; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

Em função dos fatores diretamente condicionantes dos metabólitos secundários produzidos, os teores de princípios ativos podem ser variáveis e estarem distribuídos de forma heterogênea na planta, influenciando na concentração e nas propriedades do produto vegetal. Neste sentido, diversos fatores que influenciam sua variabilidade precisam ser computados, dentre os quais se ressaltam os seguintes: localização geográfica e sazonalidade, como estação do ano, fotoperíodo (tempo e intensidade luminosa), temperatura, umidade, altitude, latitude, condições edáficas (disponibilidade de nutrientes e tipo de solo), além do período do dia da coleta, condições fenológicas, forma de uso *in natura* ou desidratada (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

Naturalmente, diversas fitoalexinas metabolizadas pelas plantas em resposta a circunstâncias atípicas são capazes de atribuir proteção antimicrobiana aos vegetais (HARBORNE, 1999; ORHAN *et al.*, 2010), destacando-se dentre elas, os flavonoides (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

As catequinas (Figura 1), compostos da classe dos flavonoides, possuem potencial atividade antimicrobiana em *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Shigella*, dentre outros micro-organismos (COWAN, 1999).

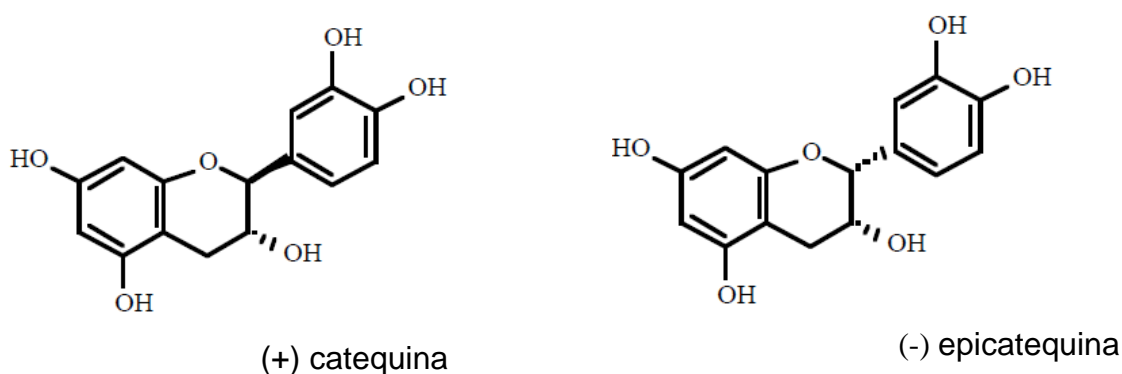


Figura 1- Estrutura da catequina e seu isômero epicatequina

São atribuídas aos metabólitos secundários bioatividades como antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana, propriedades propiciadas pelos vários fitoquímicos como compostos fenólicos, destacando-se os flavonoides, alcaloides, taninos, terpenos (DEWICK, P., 2002; BAG *et al.*, 2012; JYOTHI;SESHAGIRI, 2012) e também lectinas (COWAN, 1999).

Alguns estudos indicam que o efeito benéfico em potencial de plantas medicinais e da utilização de complexos metabólicos pode estar associado à sinergia que estes desempenham (CHEVALLIER, 1996; HARAGUCHI;CARVALHO, 2010).

Entre os metabólitos secundários, sobressaem-se os flavonoides, sendo as chalconas as precursoras desta ampla classe de substâncias de origem vegetal com propriedades farmacológicas (BASILE *et al.*, 2000; CUSHNIE;LAMB, 2005). São estruturas onipresentes, comumente encontradas em vinho, própolis, sementes, nozes, frutas e vegetais (BOIK, 2001; SIMÕES *et al.*, 2002; CUSHNIE;LAMB, 2005; SAVOIA, 2012). Alguns exemplos de flavonoides são as catequinas provenientes de *Camellia sinensis* L., os quais possuem propriedades antioxidante, anti-tumoral (BOIK, 2001), anti-inflamatória e anti-plaquetária, apresentando relevantes benefícios para o sistema cardiovascular (DEWICK, P., 2002; SIMÕES *et al.*, 2002). Estes compostos fenólicos têm potente capacidade de eliminar radicais livres (COOK;SAMMAN, 1996; MANDALARI *et al.*, 2007), além de apresentarem atividades analgésica, antialérgica e antimicrobiana, de regeneração de cartilagens e ossos (ORHAN *et al.*, 2010; SUGAMOTO *et al.*, 2011) e moduladora do sistema imune (MACHADO *et al.*, 2008). Os potenciais benefícios à saúde propiciados pelos flavonoides também estão associados com a compatibilidade com o meio biótico (CLARDY;WALSH, 2004).

Estruturalmente, os flavonoides são substâncias fenólicas hidroxiladas, constituídas por um anel aromático com 15 átomos de carbono (C₁₅) e uma unidade C₆-C₃-C₆ ligada a este (SIMÕES *et al.*, 2002). Atualmente, já foram identificados mais de 6000 flavonoides diferentes (Marchand, 2002), sendo as principais classes dos flavonoides: flavonas, flavanonas, antocianinas (MANDALARI *et al.*, 2007), isoflavonas, flavonóis e flavanas (COOK;SAMMAN, 1996; DEWICK, P., 2002).

Em razão dos flavonoides deterem a capacidade de ligarem-se às proteínas extracelulares, formando um complexo com a parede do agente patogênico e

inativando bactérias, estes têm sido alvo de pesquisas (TSUCHIYA *et al.*, 1996; COWAN, 1999).

2.3 ARCABOUÇO LEGAL DAS POLÍTICAS PÚBLICAS BRASILEIRAS REFERENTES ÀS PLANTAS MEDICINAIS

Remontam de longa data os ideais relacionados à Promoção de Saúde, desde as primeiras organizações sociais e com mais afinco atualmente, busca-se refletir sobre maneiras de manter e promover qualidade de vida mediante uso terapêutico de recursos naturais (COWAN, 1999; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

Neste contexto, destacam-se a Carta de Ottawa (WHO, 1986) e a Agenda 21 aliadas às Políticas Públicas de Saúde, as quais englobam as Políticas que incentivaram o uso seguro e eficaz de fitoterápicos, como a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) e a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), resultantes do intuito de solucionar obstáculos das esferas envolvidas neste processo a favor da adoção da perspectiva global (BRASIL, 2006; FERRAZ, 2013). Essas políticas respaldam os objetivos sugeridos e apoiam a adequação dos produtos oriundos das plantas, visando garantir acesso seguro e uso racional das plantas medicinais e fitoterápicos, bem como promover o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2009; PANIZZA; VEIGA; DE ALMEIDA, 2012).

Assim, nas últimas décadas, houve um aumento global do consumo de plantas medicinais e fitoterápicos. Todavia, somente em 1978, durante a Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde, em Alma-Ata (WHO, 1978), a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu e chancelou oficialmente a importância do uso de plantas medicinais e fitoterápicos para fins curativo, profilático, paliativo ou diagnóstico de doenças (HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

No Brasil, em 1982, o Ministério da Saúde, por meio da CEME (Central de Medicamentos), foi responsável pelos primeiros incentivos e respaldos regulatórios de fitoterápicos com a criação do Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais, que propunha a produção de medicamentos fitoterápicos alternativos ou

complementares, constituindo o marco inicial do arcabouço legal referente às plantas medicinais e à fitoterapia no país (BRASIL, 2009).

O instrumento de regulamentação em vigor atualmente para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) Nº14/2010 da ANVISA, que determina os requisitos necessários ao registro, como a nomenclatura botânica da planta proposta, padrão de qualidade e validação de eficácia e segurança clínica (BRASIL, 2010a). As iniciativas de regulamentação dos medicamentos fitoterápicos incorporam elaboração de monografias das plantas e levantamentos etnofarmacológicos, evidências científicas, padronização, testes de toxicologia e produção atendendo às boas práticas de manufatura, dentre outros. Neste sentido, para atender às expectativas de promoção de saúde expressas nos atuais instrumentos normativos sobre o assunto, estratégias vêm sendo planejadas e estabelecidas, visando à prospecção de medicamentos fitoterápicos eficazes e seguros (CARVALHO, A. C. B. *et al.*, 2007; CARVALHO, A. C. *et al.*, 2008).

2.4 PANORAMA MERCADOLÓGICO DOS FITOTERÁPICOS

A constatação de atividades farmacológicas oriundas de produtos naturais são rentáveis e muito exploradas mundialmente. Decorridos cerca de vinte e sete anos da divulgação da Carta de Ottawa, marco inicial da Promoção de Saúde de forma holística e que abarca todas as extensões e as responsabilizações atribuídas aos atores deste processo, faz-se notório que o atual panorama do mercado de medicamentos fitoterápicos e seus derivados traduza sua importância econômica e social e para a promoção de saúde da humanidade.

Nas últimas décadas, as possibilidades de exploração da matéria-prima ofertada pela biodiversidade vegetal brasileira para fins terapêuticos é um segmento econômico em ascensão deste ativo.

Atualmente, o mercado dos medicamentos fitoterápicos constitui uma parcela substancial da esfera econômica de medicamentos, movimentando mundialmente US\$ 21,7 bilhões por ano. No Brasil, este promissor nicho de mercado gira cerca de US\$ 160 milhões por ano com potencial de crescimento estimado de 15% ao ano (ZUANAZZI;MAYORGA, 2010).

Apesar deste potencial de crescimento, observa-se ainda a lacuna que envolve a precariedade nos sistemas de produção, padronização e comercialização. Enquanto esses empecilhos não sejam superados, a efetiva competitividade não será estabelecida.

2.5 RELEVÂNCIA DAS INFECÇÕES MICROBIANAS, A RESISTÊNCIA BACTERIANA E AS CLASSES DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Na tentativa de protegerem-se das doenças, as civilizações buscaram na natureza uma opção terapêutica, a qual permanece sendo a principal fonte originadora de substâncias bioativas, principalmente no tratamento das doenças infecciosas (CLARDY;WALSH, 2004). Uma recente pesquisa realizada no período de 1981 a 2010 estimou que a maioria dos fármacos utilizados no controle de infecções advêm de insumos naturais, corroborando a dádiva imbuída à mãe natureza (NEWMAN;CRAGG, 2012).

Face aos índices impactantes de doenças infecciosas e de resistência bacteriana aos antibióticos, e juntamente com a propagação ameaçadora de micro-organismos, é premente a busca por estratégias minuciosas para obtenção de novos compostos bioativos, como aqueles oriundos de plantas, os quais representam novas possibilidades de aplicação antimicrobiana (FRIEDMAN, 2007; GOLDMAN;AUSIELLO, 2009; AGUIAR *et al.*, 2012).

A questão da emergência das infecções e das resistências bacterianas está relacionada a mudanças que, conseqüentemente, fortaleceram as doenças infecciosas como importantes entidades mórbidas dos tempos atuais. Mudanças estas de origem comportamental, tecnológica, econômica e ambiental que permeiam as sociedades modernas. Por exemplo, as mudanças de estilos de vida, o desenvolvimento de testes diagnósticos mais precisos, as mudanças no comportamento das populações (emigração e imigração), as alterações ambientais (pressão antrópica), o aumento exponencial da população associado ao aumento da prevalência de indivíduos imunodeprimidos e de sua sobrevivência, a elevação do consumo indiscriminado de agentes antimicrobianos, as limitações de medicamentos antimicrobianos e a utilização destas substâncias nos alimentos são alvos

apontados como fatores associados ao aparecimento de resistência antimicrobiana, permitindo a subsequente seleção de espécies resistentes e tornando-se responsáveis por esse sério problema de saúde pública mundial (ALVES, T. M. D. A. *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2007; BRESOLIN;CECHINEL FILHO, 2010; MCPHEE; PAPADAKIS;RABOW, 2011; AGUIAR *et al.*, 2012), a ponto de tornar-se necessária a edição da RDC 20/2011, com o objetivo de racionalizar o consumo de antimicrobianos (BRASIL, 2011).

Entre os principais agentes etiológicos destas infecções, encontra-se o *Staphylococcus aureus*, uma bactéria encontrada normalmente no corpo humano em uma interação biológica de comensalismo, a qual, por vezes, torna-se uma relação desarmônica, pois algumas cepas são capazes de desencadear infecções, principalmente em condições em que o hospedeiro encontra-se fragilizado, momento no qual em que este micro-organismo se torna oportunista e passa a expressar sua potencial virulência (GOLDMAN;AUSIELLO, 2009). Os grupos de indivíduos mais suscetíveis ao risco de acometimento por este patógeno são usuários de drogas endovenosas, portadores de insuficiência renal, indivíduos insulino-dependentes, pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) ou com doenças dermatológicas, usuários de cateteres, idosos e imunocomprometidos (EMPINOTTI *et al.*, 2012), além de indivíduos em aprisionamento (KUMAR; ABBAS;FAUSTO, 2005), atletas, homossexuais, militares em treinamento e trabalhadores na área da saúde (CHAMBERS, 2001; MORAN *et al.*, 2006; BASSETTI; NICCO;MIKULSKA, 2009).

Por ser um micro-organismo mesófilo, coloniza normalmente várias regiões do corpo humano, como a mucosa nasal, as fezes, o tegumento cutâneo, as axilas e o períneo, utilizando como porta de entrada partes de pele com perda de integridade (EMPINOTTI *et al.*, 2012). Morfologicamente, caracteriza-se por ser uma bactéria Gram-positiva, em forma de coco e com um arranjo de agrupamento igual a um cacho de uvas; mede cerca de 0,5 μm de diâmetro e 1 a 8 μm de comprimento e possui uma espessa parede celular composta de muitas camadas de peptidoglicano. Metabolicamente, é um anaeróbio facultativo, de distribuição global e ocorrência em ampla gama de ambientes e hospedeiros (TORTORA; FUNKE;CASE, 2005; GOODMAN;GILMAN, 2010).

Uma revisão sobre a capacidade das linhagens de *S. aureus* desenvolverem resistência afirma que esta principia em uma adaptação por meio de uma seleção

genética molecular (GOLDSTEIN *et al.*, 2012). Além disso, nesta mesma revisão, mencionou-se que esta pandemia acomete inclusive o Brasil. Fato que tem demonstrado à humanidade uma das mais notáveis evidências das teorias evolutivas de Darwin, as resistências bacterianas induzidas pelo aumento do consumo de antibióticos de forma indiscriminada, tornando sua eficácia limitada (GOLDMAN;AUSIELLO, 2009; MOGHADAM *et al.*, 2010).

Outros mecanismos responsáveis pela resistência a inúmeros antimicrobianos são os fatores de virulência, tais como o ácido teicóico, responsável por permitir a adesão da bactéria às células do hospedeiro; a secreção de toxinas que causam lise celular; o efluxo ativo da droga pela membrana plasmática; a diminuição da permeabilidade da membrana celular; a produção de enzimas que inativam o fármaco; a produção de proteínas de adesão e a alteração do alvo de ação (KUMAR; ABBAS;FAUSTO, 2005). Por exemplo, no *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), essa resistência dá-se pela produção de uma proteína de ligação da penicilina de baixa afinidade pelo antibiótico (PBP) (BASSETTI; NICCO;MIKULSKA, 2009). Um exemplo de micro-organismo emergente é o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), um dos patógenos implicados na elevação das taxas de morbidade e mortalidade por serem resistentes a agentes β -lactâmicos (TOHIDPOUR *et al.*, 2010), apresentando-se sensível apenas aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina (ZUO *et al.*, 2008). Merece destaque também a cepa de *S. aureus* resistente a meticilina adquirido na comunidade (CA-MRSA) (SALGADO; FARR;CALFEE, 2003; MENEGOTTO;PICOLI, 2007), ressaltando-se ainda a emergência e prevalência destes na América Latina (MEJÍA; ZURITA;GUZMÁN-BLANCO, 2010). Fatos que intensificam a ineficiência ascendente dos agentes antimicrobianos fornecidos no mercado atual, fazendo-se necessária a otimização da disponibilização de novos agentes terapêuticos.

Todavia, sobressai-se comumente a resistência disseminada pela transferência de genes plasmidiais de resistência, mediada principalmente pelo mecanismo de conjugação, propagando rápida e amplamente a virulência do agente patogênico e conduzindo à invasão tecidual. Este é o caso da resistência a antibióticos β -lactâmicos, em que fragmentos de material genético são carregados por um plasmídeo e transferidos de uma bactéria para outra; desta forma, estes micro-organismos alcançam potencial capacidade de se estabelecerem e de disseminarem genes de resistência a antibióticos desenfreadamente entre bactérias da mesma

espécie ou de espécies diferentes, conferindo mudanças na fisiologia e ecologia dos microrganismos (RANG *et al.*, 2007; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; GOODMAN; GILMAN, 2010). Então, além da vasta resistência às inúmeras classes de antimicrobianos em consequência da exposição inadequada a estes, outras resistências microbianas indiretas ocorrem devido à pressão seletiva desenvolvida por intermédio de transferência de genes de resistência oriundos, por exemplo, de biotipos presentes em alimentos (CHAMBERS, 2001; SCHWARTZ *et al.*, 2003).

Conforme estudos, o aumento da prevalência de doenças infecciosas tem sido atribuído a fatores como o uso indiscriminado e excessivo de antibióticos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; BRIJESH *et al.*, 2006). Este fato decorre também do uso de antimicrobianos como aditivos nas formulações de alimentos para animais e no manejo dos plantéis (SANTURIO *et al.*, 2007). Por exemplo, o uso de antibióticos na avicultura e na suinocultura tem sido relatado como agente facilitador da transmissão de cepas resistentes (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

De acordo com Goodman e Gilman (2010), nos EUA, cerca de 70% das bactérias envolvidas na etiologia das infecções nosocomiais são resistentes a algum antimicrobiano (GOODMAN; GILMAN, 2010) e, aproximadamente, 90 a 95% das cepas de *S. aureus* do mundo são resistentes à penicilina (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Por outro lado, as bactérias Gram-negativas, assim como as bactérias Gram-positivas, são micro-organismos que causam infecções provocando significativo aumento das taxas de mortalidade e morbidade. Estruturalmente, são constituídas por uma única camada de peptidoglicano sobreposta por uma membrana externa lipoproteica (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Neste grupo de bactérias, destacam-se aquelas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), como a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Escherichia coli*, substancialmente associadas a doenças infecciosas (TRAGANTE *et al.*, 2008; BASSETTI; RIGHI, 2013).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria oportunista, dispersa em diferentes ambientes e hospedeiros, capaz de provocar, por exemplo, pneumonias, infecções urinárias e bacteremias (STOVER *et al.*, 2000). *E. coli*, outra bactéria Gram-negativa relevante, está diretamente relacionada a doenças diarreicas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Dados epidemiológicos apontam que, em 2002, cerca de um terço dos 53 milhões de óbitos ocorridos mundialmente foram ocasionados por doenças

infeciosas (GOLDMAN;AUSIELLO, 2009), enquanto que, no Brasil, segundo o DATASUS, no ano de 2011, as mesmas foram responsáveis pela morte de 49.175 indivíduos (BRASIL, 2012) De forma alarmante, o Brasil é apontado ainda como o país em primeiro lugar em mortes por sepse grave (BRESOLIN;CECHINEL FILHO, 2010). Nas Unidades de Terapia Intensiva, 25% dos leitos são ocupados por pacientes com choque séptico e 50% destes vão a óbito (GOLDMAN;AUSIELLO, 2009). Reforçando estas estimativas, em uma análise sistemática atual, de distribuição espacial abrangente, demonstrou-se que pneumonia, diarreia, malária e sepse sobressaem-se como causas de morte entre crianças atribuídas às doenças infecciosas (LIU *et al.*, 2012).

Além disso, cerca de 2 milhões de crianças morrem em decorrência de infecções gastrointestinais a cada ano, especialmente em países em desenvolvimento na África, na Ásia e na América Latina, representando um dos principais problemas de saúde pública (MURRAY;LOPEZ, 1997; GOLDMAN;AUSIELLO, 2009; MCPHEE; PAPADAKIS;RABOW, 2011). As doenças diarreicas são a segunda principal causa de morte em todo o mundo entre crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2011). Globalmente, segundo índices computados no ano de 2008, ocorreram cerca de 8.795 milhões de mortes entre crianças menores de cinco anos, destes 68% foram causadas por doenças infecciosas, como pneumonia (18%), diarreia (15%) e malária (8%); em neonatos, em especial, foi marcante a prevalência de sepse (6%) (LIU *et al.*, 2012; BLACK *et al.*, 2010). Fazendo-se uma analogia, as diarreias são responsáveis por taxas de mortalidade similares àquelas provocadas pela AIDS (VICTORA, 2009).

A pneumonia causada por *S. aureus* é responsável por aproximadamente 18% das infecções hospitalares no Brasil e é a primeira em morbidade e mortalidade, com taxas de mortalidade de 60%. Em UTIs, a taxa de mortalidade de pacientes com pneumonia é de aproximadamente 50% (MARTINELLI *et al.*, 2010).

Uma recente revisão relata a influência acentuada dos produtos naturais no âmbito do comércio antibacteriano e ressalta que a maioria dos correntes antimicrobianos foram descobertos a partir de fontes naturais (NEWMAN;CRAGG, 2012). Nos países em desenvolvimento, 80% da população dependem exclusivamente da medicina tradicional para cuidados de saúde primários (WHO, 2002a). Na África, na Ásia e na América do Sul é ampla a utilização de material vegetal em práticas tradicionais de medicina e, em várias comunidades de países

em desenvolvimento, as plantas são o único recurso disponível para o tratamento de inúmeras infecções (HOLETZ *et al.*, 2002; ZAGO; USHIMARU; BARBOSA, 2009; SMITH-HALL; LARSEN; POULIOT, 2012).

No bioma Cerrado, um número expressivo de plantas nativas tem sido utilizado como fármacos naturais pelas populações locais (rurais, ribeirinhas, quilombolas, tradicionais e indígenas) para o tratamento de várias morbidades (ALVES, T. M. D. A. *et al.*, 2000; GASPI *et al.*, 2006; HIRUMA-LIMA *et al.*, 2006; MOREIRA; GUARIMNETO, 2009).

Devido à extrema significância e à representatividade clínica, inúmeras substâncias antibacterianas foram desenvolvidas focando diferentes alvos e com distintos mecanismos de ação. Por exemplo, alguns antibióticos atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana, destacando-se entre estes os antibióticos β -lactâmicos, como a penicilina - que age inibindo a transpeptidase e, conseqüentemente, a formação de ligações cruzadas entre as cadeias de peptidoglicano - e a oxacilina - que inibe a β -lactamase (GOLDMAN; AUSIELLO, 2009; GOODMAN; GILMAN, 2010; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Neste contexto, deve-se refletir quanto ao enfoque da ameaça de propagação e transmissão de doenças infectocontagiosas e de transferência de potencial resistência pelo contato entre micro-organismos, os quais apresentam alta eficiência em disseminar sua virulência para os micro-organismos da microbiota intestinal, provocando sua instabilidade.

Assim, considerando-se o grau de relevância destas enfermidades e os problemas implícitos ou delas decorrentes, é justo afirmar que esta questão incita-nos a refletir que é essencial o controle da emergência das resistências, minimizando a pressão seletiva por intermédio do uso prudente de antimicrobianos.

2.6 ATIVIDADE MODULADORA PELA COMBINAÇÃO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS: SINERGISMO

Tem-se buscado compreender a estreita relação que pode ser obtida entre fito-substâncias e antimicrobianos sintéticos (WAGNER, HILDEBERT, 2011). A sinergia configura-se em relevante estratégia para a resolução das resistências

desenvolvidas por micro-organismos, uma vez que é evidente que muitas doenças têm sido tratadas de forma mais eficaz com combinações de medicamentos, entre elas as doenças infecciosas (BERENBAUM, 1989; WAGNER, HILDEBERT, 2011).

Existem relatos de efeitos sinérgicos entre compostos bioativos e agentes sintéticos, como catequinas e epigallocatequinas provenientes de *Camellia sinensis* conjugados com penicilina para tratar *S. aureus*, sendo ativas inclusive em cepas que desenvolveram o mecanismo de resistência via bomba de efluxo (WAGNER, HILDEBERT, 2011).

Sabe-se que os metabólitos secundários exercem influência sobre a atividade antimicrobiana (TSUCHIYA *et al.*, 1996; COWAN, 1999; ABAD *et al.*, 2012). Assim, para obter-se uma atividade mais expressiva, ganha respaldo o uso de combinações terapêuticas, como a junção de extratos ou frações de plantas com antimicrobianos.

É usual a adoção de esquemas com uso simultâneo de agentes antimicrobianos, buscando-se maximizar as chances de êxito no processo terapêutico; além disso, obtêm-se outras vantagens desta atuação, tais como a modulação da afinidade pelo sítio de ligação realizada pelos mediadores biológicos, a melhoria do espectro de ação, a otimização de tempo de tratamento, de intervalos e de doses e, até mesmo, redução de resistência (BERENBAUM, 1989).

A ocorrência de sinergismo no uso simultâneo de dois fármacos é avaliada pelo Teste de *Checkerboard* (WHITE *et al.*, 1996; BONAPACE *et al.*, 2002). Este teste baseia-se na técnica de microdiluição em caldo, estabelecida pela norma M7-A6 (2003) do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e consiste na combinação de fármacos e na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos fármacos combinados em relação ao CIM dos fármacos isolados (WHITE *et al.*, 1996; BONAPACE *et al.*, 2000).

Em caso de sinergismo decorrente da combinação entre fármacos antimicrobianos e os ativos vegetais, procede-se com a adoção do Índice de Concentração Inibitória Fracionado (ICIF). Este índice corresponde à soma das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIF), as quais consistem na razão entre a CIM dos fármacos combinados e a CIM de cada fármaco separado (ODDS, 2003; JOHNSON *et al.*, 2004).

2.7 A BIODIVERSIDADE DA SAVANA BRASILEIRA

A manutenção da diversidade e da sustentabilidade dos ecossistemas tem importância mundial, tendo em vista seu impacto na economia e na saúde humana. O processo contemporâneo de integração mundial provocou avanços tecnológicos e intensas alterações comportamentais, ambientais e sócio-culturais, os quais têm gerado desenvolvimento mas ao mesmo tempo, enormes desafios e temores com o futuro da saúde da humanidade.

Essas apreensões são reflexo da ação antrópica desenfreada, gerando danos incalculáveis e que se fazem notar. Ao primar-se pelo princípio da sustentabilidade, o qual rege o Planeta, a humanidade estará se orientando às premissas de Promoção de Saúde e equidade social e apelos por uma biota equilibrada.

No quesito multiplicidade biológica, o Brasil é reconhecido internacionalmente por sua riqueza e exuberância natural proporcionadas, em generosa parte, por sua dimensão continental, uma elevada biodiversidade florística, a diversidade etnocultural, além de inúmeras condições edáficas e climáticas, vantagens que ampliam as possibilidades de oferta de matéria-prima com finalidades farmacêuticas para a humanidade (RIBEIRO *et al.*, 1998; FUNARI; FERRO, 2005). E mais, a localização nos trópicos favorece este país com uma megadiversidade, a qual o situa em primeiro lugar do mundo (MITTERMEIER *et al.*, 1998; KRIEF; HLADIK; HAXAIRE, 2005).

O Brasil tem alguns dos mais ricos biomas do mundo, com uma ampla diversidade biológica dispersa ao longo dos vários ecossistemas. Existem mais de 55.000 espécies de plantas superiores, distribuídas em cinco biomas, fazendo deste país um soberano e importante fornecedor de matéria-prima, incluindo inovadoras fontes terapêuticas (SIMÕES *et al.*, 2002; FUNARI; FERRO, 2005). O bioma Cerrado destaca-se por ser a segunda maior formação vegetal da América do Sul, sendo superado somente pela Floresta Amazônica, além de uma excepcional fitofisionomia específica e o endemismo, onde predominam 4400 espécies típicas desta área (MITTERMEIER *et al.*, 1998; RIBEIRO *et al.*, 1998).

O Cerrado comporta uma extensa dimensão física, a maior parte está localizada no Centro-Oeste e Nordeste do Brasil e estende-se a estados adjacentes, como Amapá, Pará, Roraima, São Paulo e Paraná. Este bioma tem uma área de

aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados e abrange 25% da superfície terrestre do país (CARDOSO *et al.*, 2011). O Cerrado abriga mais de 11.000 espécies de plantas nativas, das quais estima-se que 44% são de espécies endêmicas (MYERS *et al.*, 2000; GENOVESE *et al.*, 2008). Desde que a capital brasileira foi movida para a região, iniciou-se um estado de depleção devido à "Revolução Verde" e aos impactos humanos de proporções sem precedentes, como construções, desmatamento, urbanização e queimadas descontroladas. Sendo o Cerrado severamente fragmentado e degradado por estas ações antrópicas a ponto de ser considerado um *hotspot* mundial (MYERS *et al.*, 2000; BASSO *et al.*, 2005; SMITH-HALL; LARSEN;POULIOT, 2012; VILELA *et al.*, 2012). Entre as famílias com relevância farmacológica encontradas no Bioma Cerrado, destaca-se a família Myrtaceae (GENOVESE *et al.*, 2008).

2.8 DESCRIÇÃO BOTÂNICA, FARMACOLÓGICA E FITOQUÍMICA DE ESPÉCIES NATIVAS DO CERRADO SELECIONADAS PARA O SCREENING ANTIMICROBIANO

2.8.1 Família Erythroxylaceae, Gênero *Erythroxylum*

Uma das famílias encontradas no bioma Cerrado é a família Erythroxylaceae, a qual compreende cerca de 250 espécies catalogadas nos gêneros *Aneulophus*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*. O gênero *Erythroxylum* é o mais representativo, com cerca de 200 espécies (AGUIAR *et al.*, 2012), sendo conhecido pela produção de alcaloides (EL-IMAM, YMA; EVANS;PLOWMAN, 1985; EL-IMAM, YAHIA; EVANS;GROUT, 1988; DEWICK, P., 2002; JIRSCHITZKA *et al.*, 2012). Estudo sobre predominância de flavonóides em espécies de *Erythroxylum* revelou que *E. daphnites* apresenta kaempferol e quercitina (BOHM *et al.*, 1988).

Aproximadamente 200 espécies de *Erythroxylum* estão distribuídas em áreas tropicais, como na América do Sul e na África (JOLY, 1998.; GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 2005; AGUIAR *et al.*, 2012). No Brasil, encontram-se 114 espécies do gênero *Erythroxylum* e, com tamanha diversidade, pode-se considerar o país como detentor

de ampla parcela de regiões endêmicas do gênero (LUCAS-FILHO *et al.*, 2010). Este encontra-se representado por árvores, arbustos e subarbustos; os quais contêm pigmentos, óleos essenciais em suas cascas e propriedades medicinais (JOLY, 1998.; ALONSO;MACHADO, 2008).

Alguns usos etnofarmacológicos citados na literatura destacam a atividade de espécies desse gênero como anti-inflamatório, antibacteriano, diurético, tônico, estimulante e como tratamento de doenças hepáticas, de vias biliares e renais, bem como para artrite, doenças respiratórias (GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 2005; LUCAS-FILHO *et al.*, 2010) e ginecológicas (GUPTA, 2008).

Ensaio *in vivo* indicaram que *E. novagratense* produziu ação anti-inflamatória em ratos, sem sintomas de intoxicação (CHAVES *et al.*, 1988), enquanto que resultados de uma pesquisa conduzida com *E. suberosum* mostram que a espécie apresenta eficiente atividade antimicrobiana contra os fungos *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Criptococcus neoformans* e bactérias da espécie *S. aureus*, além de possuir elevada atividade citotóxica (VIOLANTE, 2008).

2.8.2 Família Leguminosae, Gênero *Bauhinia*

Tem relevância também a família Leguminosae, destacando-se a subfamília Caesalpinioideae, na qual encontra-se o gênero *Bauhinia*. Esse possui mais de 300 espécies e predomina nas áreas próximas à linha do equador, sendo popularmente conhecido no Brasil e em outros países como pata-de-vaca e tradicionalmente usado para o tratamento de diabetes e infecções (JOLY, 1998.; MENEZES *et al.*, 2007; GUPTA, 2008; DIAS;ARRUÁ, 2011; DA SILVA;CECHINEL FILHO, 2002).

A espécie *B. variegata* é conhecida popularmente como adstringente, tônica, anti-helmíntica e anti-inflamatória, sendo usada ainda para diarreia, lepra, úlceras, tumores e diabetes (DA SILVA;CECHINEL FILHO, 2002; POKHREL; ADHIKARI;BARAL, 2002). Estudos com o extrato etanólico bruto de *B. variegata* evidenciaram halo de inibição de 15 mm quando exposto a *S. aureus* (POKHREL; ADHIKARI;BARAL, 2002).

Bauhinia forficata tem sido usada tradicionalmente via oral como analgésico, tônico, digestivo, anti-inflamatório, adstringente, anti-tussígeno, expectorante, anti-

hipertensivo, diurético, hipocolesterolemizante e para controle de palpitações, enquanto que o uso tópico tem ação adstringente e antisséptica em doenças de pele (GUPTA, 2008).

Recentemente, relatos confirmaram atividades farmacológicas da espécie *B. forficata* como hipoglicemiante (COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004), antibacteriana, fungicida, antioxidante, anticoagulante, antifibrinolítico e antitóxica para veneno de escorpiões (DIAS;ARRUÁ, 2011). Usando o método de difusão em disco comprovou-se ainda que a *B. forficata* inibiu o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 1000µg/mL (DA SILVA;CECHINEL FILHO, 2002).

Outras espécies do gênero se destacam devido ao potencial antimicrobiano, por exemplo, *B. kockiana* e *B. pulcherrima* possuem atividade antibacteriana para *S. aureus* (MRSA) com concentração mínima inibitória de 100 a 500µg/disco, ação atribuída à grande quantidade de compostos fenólicos (CHEW *et al.*, 2011). De forma análoga, as espécies *B. tomentosa* e *B. vahlii* também são efetivas em microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos (DUGASANI *et al.*, 2010).

Diversas plantas do gênero *Bauhinia* foram estudadas fitoquímica e farmacologicamente, tendo sido relatados compostos mais expressivos, tais como flavonoides, glicosídeos, esteroides, lactonas, taninos, quinonas e terpenoides, aos quais é atribuída a atividade farmacológica e, principalmente, antimicrobiana (DA SILVA;CECHINEL FILHO, 2002; COELHO DE SOUZA *et al.*, 2004; LUSA;BONA, 2009). Da espécie *B. rufa*, encontra-se relatada a presença majoritária de sesquiterpenos e de monoterpenos no óleo volátil (DUARTE-ALMEIDA; NEGRI;SALATINO, 2004). Entretanto, não existem estudos sobre a atividade farmacobiológica de *Bauhinia rufa* (Bong.) Steud (DA SILVA;CECHINEL FILHO, 2002; MELO *et al.*, 2010).

2.8.3 Família Sapotaceae, Gênero *Pouteria*

Espécies do gênero *Pouteria* (Sapotaceae) são encontradas no bioma Cerrado (JOLY, 1998.), correspondendo a mais de 400 espécies. São muito utilizadas na medicina popular para o tratamento de várias patologias, como diarreia (PERFEITO *et al.*, 2005) malária, hanseníase, diabetes e infecções ovarianas (MONTENEGRO

et al., 2006). De acordo com Silva e colaboradores este gênero possui atividades antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica e antitumoral (SILVA, C. A.; SIMEONI; SILVEIRA, 2009). Os constituintes em maior proporção nas plantas deste gênero são os triterpenos e flavonoides (MONTENEGRO *et al.*, 2006; SILVA, C. A.; SIMEONI; SILVEIRA, 2009).

A espécie *P. torta* apresenta atividades antimicrobiana e antioxidante (PERFEITO *et al.*, 2005; BOLETI *et al.*, 2007), sendo que o extrato metanólico de folhas de *P. torta* inibiu *Cladosporium sphaerospermum*, *B. cereus*, *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *S. aureus* (ATCC 25923) com uma concentração de 5mg/poço (ALVES, T. M. D. A. *et al.*, 2000).

Estudos buscando esclarecer o potencial antimicrobiano de *P. salicifolia* comprovaram sua ação sobre *S. aureus*, *M. tuberculosis*, *C. albicans* e *A. niger* (BERTUCCI *et al.*, 2009).

2.8.4 Família Myrtaceae, Gênero *Eugenia*

Myrtaceae é outra família de plantas da região do Cerrado que encontra-se amplamente distribuída e representada nas áreas tropicais, compreendendo cerca de 129 gêneros e 4620 espécies. *Eugenia* é o gênero desta família que mais se destaca para o uso medicinal, possuindo aproximadamente 500 espécies (COLE; HABER; SETZER, 2007; BRANDÃO, 2011), das quais cerca de 350 são nativas (MAGINA *et al.*, 2009).

Um membro desta família, a *E. uniflora* L., conhecida como pitangueira, encontra-se referida na RDC 267 de 22 de setembro de 2005 para o preparo de infusões com seus frutos e folhas e, na Farmacopeia Brasileira (2010), suas folhas são indicadas como fonte de matéria-prima para produtos farmacêuticos em virtude da expressiva quantidade de taninos e flavonóides em sua constituição (BRASIL, 2005, 2010b). Por sua vez, o óleo essencial das folhas tem sido utilizado pela indústria brasileira de cosméticos, pois este detém propriedades adstringentes (AMORIM *et al.*, 2009; VICTORIA *et al.*, 2012). Além da reconhecida *E. uniflora* L., outras duas espécies da família Myrtaceae, *Eugenia caryophyllata* e *Eucalyptus*

globulus, já possuem monografias descritas pela OMS indicando suas faculdades medicinais (WHO, 2002b).

Entre as espécies vegetais nativas do Cerrado representantes desta família e que são potencialmente utilizadas para exploração medicinal ou alimentar, sobressai-se a *Eugenia dysenterica*. DC, (synon. *Stenocalyx dysentericus* Berg., *Myrtus dysenterica* M.) (COSTA *et al.*, 2000; LORENZI, 2002.; PALHARES, 2003; DUARTE, A. R. *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2011), conhecida popularmente como “cagaita” ou “cagaiteira”, cujos frutos são coletados pela população autóctone e aproveitados pelo seu sabor *sui generis* em preparações alimentícias como sucos, picolés, licores e geléias ou *in natura* (PALHARES, 2003; ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010; VIEIRA *et al.*, 2012; VILELA *et al.*, 2012). Segundo os conhecimentos tradicionais dos povos do Cerrado, esta apresenta uso medicinal: as folhas da cagaiteira são detentoras de propriedade antidiarreica (PALHARES, 2003; OLIVEIRA, M. D. L. *et al.*, 2008; DUARTE, A. R. *et al.*, 2009; DUARTE, A. R. *et al.*, 2010) e eficazes na cicatrização da pele e no tratamento de diabetes e icterícia (SILVA, R. S.; CHAVES; NAVES, 2001); enquanto que os seus frutos têm propriedade laxativa (COSTA *et al.*, 2000; SILVA JÚNIOR, 2005; CARDOSO *et al.*, 2011), sendo esta propriedade ressaltada nos manuscritos do naturalista francês August Saint-Hilaire (1779-1853) (BRANDÃO, 2011; OLIVEIRA, V. B. *et al.*, 2012).

Macroscopicamente, a cagaiteira, apresentada na Figura 2 (A) e (B), caracteriza-se por ser uma árvore que apresenta frutos do tipo baga amarelos e globosos (LORENZI, 2002.; PALHARES, 2003; CARDOSO *et al.*, 2011), polposos e suculentos, com cerca de 4 cm de diâmetro (SILVA JÚNIOR, 2005). Trata-se de uma espécie decídua, perene, que pode medir até 10 metros de altura, de galhos retorcidos, casca grossa e fendada (PALHARES, 2003; JORGE, N.; MORENO; BERTANHA, 2010) e folhas simples, opostas, cruzadas, elípticas ou ovadas, glabras, com 3 a 10 cm de comprimento e 1 a 5 cm de largura, que quando jovens apresentam tons avermelhados (SILVA JÚNIOR, 2005).

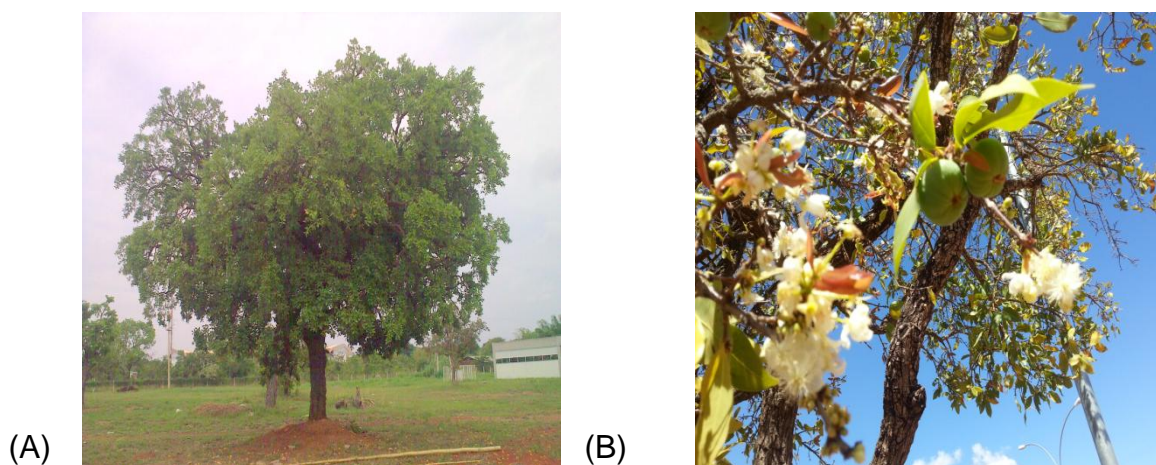


Figura 2- *Eugenia dysenterica* (A) espécime e (B) flores e frutos no Campus Darcy Ribeiro - Universidade de Brasília UnB - Brasil

As cagaiteiras encontram-se amplamente dispersas nas mais diversas fitofisionomias do Cerrado (TRINDADE;CHAVES, 2005), ocorrendo nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e no Distrito Federal (LORENZI, 2002.; MEDEIROS, 2011.). Esta árvore encontra-se bem adaptada a solos pobres, que são característicos do Cerrado brasileiro (PALHARES, 2003; OLIVEIRA, M. *et al.*, 2011).

A propagação da espécie é promovida por animais. Insetos como *Apis* sp, *Bombus atratus* e *B. morio* (SILVA, R. S.; CHAVES;NAVES, 2001; TRINDADE;CHAVES, 2005) se incumbem de fazer a fertilização do pólen, enquanto que a dispersão das sementes dá-se, na maioria das vezes, de forma antropocórica por intermédio da coleta. O período de frutificação ocorre entre outubro e dezembro (ALMEIDA; SILVA;RIBEIRO, 1990.; SILVA JÚNIOR, 2005; ROESLER; LORENCINI;PASTORE, 2010).

Nos últimos anos, inúmeros estudos têm alertado sobre o processo de extinção de espécies ao qual o planeta está sujeito e que vem prejudicando a sustentabilidade da biosfera. Esse efeito tem gerado uma pressão negativa que se reflete sobre todos os ecossistemas, concorrendo para a cessação de exemplares da flora e da fauna, incluindo o declínio das abelhas *Apis mellifera*, base de sustentação da vegetação nativa e da segurança alimentar e, conseqüentemente, das interações ambientais (GENERSCH, 2010; RATNIEKS;CARRECK, 2010;

MÖCKEL; GISDER; GENERSCH, 2011; VIDAU *et al.*, 2011; SCHÖNING *et al.*, 2012).

Além do decréscimo da fecundação da espécie e da degradação do bioma Cerrado, outra circunstância agravante revela-se pela forma com que as instituições que processam os frutos do Cerrado vêm dispensando as sementes ao final do processo de obtenção da polpa, uma vez que, por intermédio de informações informais, pode-se constatar que a maior parte deste patrimônio genético está sendo transformado em composto orgânico ao invés de retornar ao seu habitat natural. Diante desta situação, evidencia-se a necessidade de preservação destas espécies para a manutenção do equilíbrio das interações ambientais.

Eugenia dysenterica é detentora de potenciais faculdades biológicas, sendo reportada sua ação como agente antiviral (CECÍLIO *et al.*, 2012), inibidora da atividade de enzimas tirosinase (SOUZA, P. M. *et al.*, 2012), além de sua ação moluscicida (OLIVEIRA, A. M. D. *et al.*, 2006) e fungicida (COSTA *et al.*, 2000; SOUZA, L. K. H. *et al.*, 2002; OLIVEIRA, R. D.; DIAS; CÂMARA, 2005; ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010). É também um promissor nutracêutico, uma vez que é rica em vitamina C (CARDOSO *et al.*, 2011) e tem extraordinária ação antioxidante (GENOVESE *et al.*, 2008; ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010).

Recente pesquisa mostrou, em modelos animais, que os extratos aquoso e etanólico de polpa de frutos de *E. dysenterica* possuem compostos farmacológicos com propriedades laxativas, além de constatar-se que este não é tóxico (LIMA *et al.*, 2010). De acordo com Cecílio e colaboradores (2012), o extrato etanólico de folhas de *E. dysenterica* inibe a replicação de rotavírus SA11 *in vitro* e não apresenta toxicidade a uma concentração de até 500µg/mL. A atividade antiviral está relacionada com os compostos presentes, como taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas e terpenos (CECÍLIO *et al.*, 2012). O óleo essencial de folhas desta espécie demonstrou potencial atividade inibidora de fungos da espécie *Cryptococcus neoformans in vitro*, com uma concentração abaixo de 250µg/mL (COSTA *et al.*, 2000).

As espécies vegetais do bioma Cerrado, por apresentarem em sua composição constituintes metabólitos secundários com propriedades farmacológicas (COWAN, 1999; DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; CHIN *et al.*, 2006), são apontadas como excelentes alvos de escolha por sua potencial atividade biológica e de inibição microbiana, podendo representar expressivas fontes medicamentosas.

Assim, esta prospeção procurou mostrar e validar informações sobre plantas tradicionalmente detentoras de virtudes medicinais, pelos métodos científicos, almejando-se a descoberta de multicomponentes terapêuticos botânicos e o enaltecimento da importância dos vegetais para o desenvolvimento da medicina.

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de espécies vegetais oriundas do bioma Cerrado do Distrito Federal e arredores, sendo selecionadas as espécies *Bauhinia rufa* (Bong) Steud, *Bauhinia variegata* Linn, *Erythroxylum subrotundum* St. Hill, *Erythroxylum daphnites* Mart., *Pouteria torta* Radlk., *Pouteria ramiflora* Radlk. e *Eugenia dysenteria* DC.

Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos:

- Obter os extratos brutos de espécies vegetais do bioma Cerrado;
- Monitorar a atividade antimicrobiana de espécies dos gêneros *Erythroxylum*, *Bauhinia*, *Pouteria* e *Eugenia*;
- Estabelecer uma metodologia de inibição microbiana, definindo a concentração inibitória mínima - CIM;
- Desenvolver o estudo químico biomonitorado da espécie mais promissora;
- Avaliar a citotoxicidade da espécie mais promissora em cultura celular de queratinócitos e fibroblastos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MÉTODOS GERAIS

4.1.1 Obtenção dos Extratos e Frações

4.1.1.1 Material Vegetal

As espécies vegetais nativas do Cerrado utilizadas para confeccionar os extratos e frações usados na avaliação foram devidamente identificadas (Tabela 1). As folhas e o caule das plantas foram coletadas no Cerrado, em terreno da Universidade de Brasília, no Campus Darcy Ribeiro, em Brasília, Distrito Federal, Brasil. A identificação taxonômica foi confirmada e uma exsicata de cada espécie devidamente identificada foi depositada no Herbário da Universidade de Brasília (UB).

TABELA 1- Espécies vegetais nativas do Cerrado avaliadas quanto à atividade antimicrobiana

Família	Espécie	Parte vegetal	Coletor	Número de herbário
	<i>Erythroxylum daphnytes</i> Mart.	f	Fagg, C.W. & Silveira, D.	(UB) 2193
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum subrotundum</i> ST. Hill.	f	Fagg, C.W. & Silveira, D.	(UB) 2194
Leguminosae	<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud	f	Gomes, S.M.	(UB) 8749
	<i>Bauhinia variegata</i> Linn	f	de Paula, J. E.	(UB) 3674
Sapotaceae	<i>Pouteria torta</i> Radlk.	f e c	de Paula, J. E.	(UB) 3671
Myrtaceae	<i>Eugenia dysenterica</i> DC.	f	da Silva, E. C.	(UB) 914

f: folha; c: caule

4.1.1.2. Obtenção dos Extratos

No laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da UnB, o material botânico, após a secagem em estufa a 40°C, foi pulverizado em moinho de facas. Para a extração, foram utilizadas folhas ou caule das espécies selecionadas. Para a obtenção do extrato, foi vertido, sobre o material vegetal, água destilada em temperatura em torno de 70°C. Após arrefecimento a cerca de 40°C, a solução extrativa foi filtrada, congelada e submetida a liofilização. Os extratos brutos aquosos obtidos foram conservados sob refrigeração (- 30°C) até seu uso nos ensaios biológicos (Figura 3). Parte do material botânico pulverizado foi utilizada para obtenção dos extratos brutos hexânico e etanólico. A obtenção dos extratos foi

feita por processo de extração a frio (maceração passiva): as amostras foram embebidas com solventes orgânicos (hexano ou etanol), com quantidade suficiente de solvente para cobrir o material botânico, e mantidas por sete dias a temperatura ambiente; decorrido este período, o extrato foi filtrado e este procedimento foi repetido mais duas vezes após cada filtração; após a filtração, procedeu-se à concentração, em que as soluções extrativas foram submetidas à eliminação do solvente orgânico, sob vácuo, em evaporador rotatório (HEIDOLPH), à temperatura de aproximadamente 40°C; e o resultante foi completamente seco em banho-maria até a eliminação completa do solvente (NOVA ÉTICA B) a 40°C. Resultou-se, então, em extrato bruto aquoso, hexânico e extrato bruto etanólico.

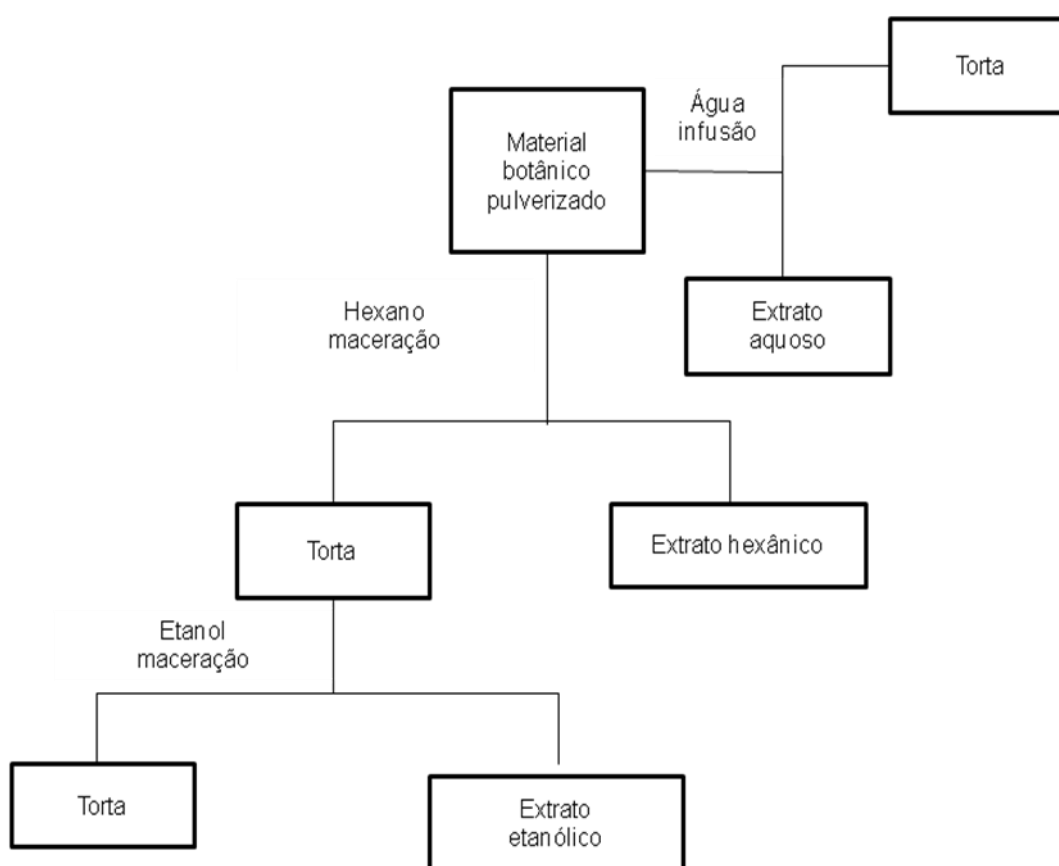


Figura 3- Esquema para obtenção dos extratos brutos

Obtidos os extratos sólidos, foram calculados os rendimentos dos extratos por meio da relação do peso do extrato seco obtido multiplicado por 100 e dividido pelo peso total do material botânico utilizado inicialmente na extração (ALVES, M. M. *et al.*, 2011). Conforme fórmula a seguir:

$$\text{Rendimento} = \frac{pf \times 100}{pi}$$

Onde, pf = peso final e pi = peso total inicial.

Desta forma, os rendimentos dos extratos ao final do processo estão listados na tabela a seguir (Tabela 2).

TABELA 2- Obtenção dos extratos brutos das espécies de plantas do Cerrado

Espécie	Parte da planta	Massa (g)	Solvente	Técnica	Rendimento (%)
<i>Erythroxylum daphnytes</i>	F	79,17	H ₂ O	infusão	1,6
		848,63	hexano	maceração	1,8
		848,63	etanol	maceração	18,4
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	F	78,05	H ₂ O	infusão	6,8
		436,75	hexano	maceração	1,0
		436,75	etanol	maceração	1,7
<i>Bauhinia rufa</i>	F	115,0	H ₂ O	infusão	4,5
		385,0	hexano	maceração	2,0
		385,0	etanol	maceração	6,0
<i>Bauhinia variegata</i>	F	84,6	H ₂ O e metanol	maceração	7,72
<i>Pouteria torta</i>	F	45,0	H ₂ O	infusão	11,2
		46,6	hexano	maceração	5,1
		104,0	etanol	maceração	11,3
<i>Pouteria ramiflora</i>	F	395	H ₂ O	infusão	9,22
		700	hexano	maceração	5,17
		700	etanol	maceração	18,32
<i>Pouteria ramiflora</i>	C	650	maceração	maceração	5,0
<i>Eugenia dysenterica</i>	F	100	H ₂ O	infusão	7,0

Um estudo recente evidenciou que o rendimento do extrato hidroalcoólico seco de folhas de *E. dysenterica* independe da estação, seja ela chuvosa ou seca, pois em ambas estações obteve-se um rendimento de cerca de 15% (ALVES, M. M. *et al.*, 2011).

4.1.1.3 Obtenção das Frações de *Eugenia dysenterica* e de *Erythroxylum daphnites* por Lavagem

O extrato bruto aquoso de *E. dysenterica* (7g) e de *E. daphnites* (3g) foram submetidos à precipitação de substâncias por lavagem com solventes puros (acetona, metanol e isopropanol). Ao extrato bruto aquoso de *E. dysenterica*, foram misturados 30mL do primeiro solvente supracitado e homogeneizados, com posterior separação do precipitado e sobrenadante após decantação. Este procedimento foi repetido três vezes e, em seguida, realizada a evaporação, obtendo-se a fração acetônica do extrato bruto aquoso da planta. Para a extração da fração metanólica, foi utilizado o resíduo remanescente da extração acetônica, sendo o procedimento igual ao citado acima para a obtenção da fração acetônica. Para obtenção da fração isopropanólica, foi realizada uma lavagem com 3g de extrato bruto aquoso, seguindo-se esta mesma metodologia. Os resíduos os extratos aquosos foram acondicionados e secos a temperatura ambiente, resultando nos produtos de cada extrato bruto dos respectivos extratos (Figura 4 e Tabela 3). As frações obtidas foram mantidas sob refrigeração (- 30°C).

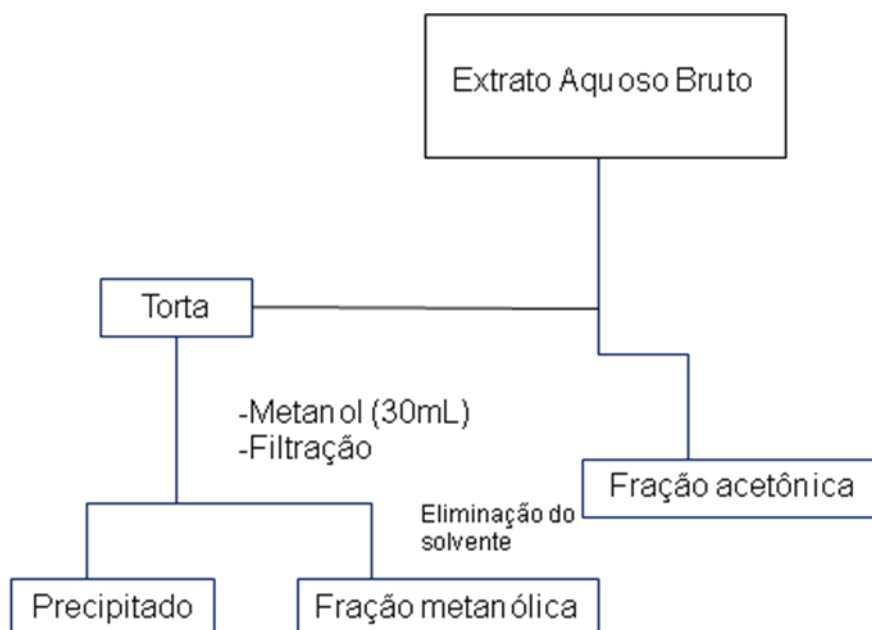


Figura 4- Esquema para obtenção das frações após a extração por lavagem

TABELA 3- Rendimento da extração do extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* e de *Erythroxylum daphynites* por lavagem

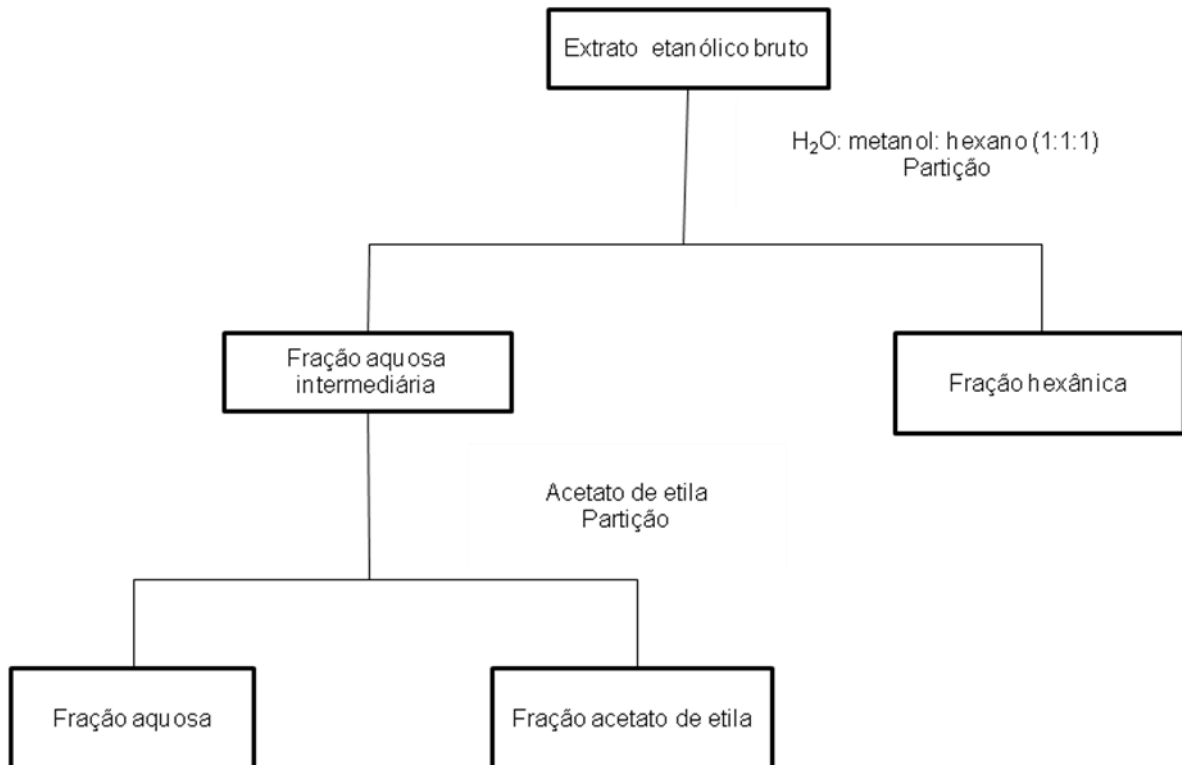
Espécie	Espécie
<i>E. dysenterica</i> frações obtidas de (7g)	<i>E. daphynites</i> frações obtidas (3g)
Fração metanólica (59%)	Fração metanólica (53,6%)
Fração acetônica (8,6%)	Fração acetônica (3,3%)
Fração isopropanólica (4%)	Precipitado (37%)
Precipitado (0,01%)	

O rendimento das frações oriundas dos extratos aquosos foram calculados a partir da amostra de extrato utilizada, conforme fórmula descrita no item 4.1.1.2.

4.1.1.4 Fracionamento do Extrato Etanólico de *Bauhinia rufa* e de *Erythroxylum daphnites* por Partição entre Líquidos Imiscíveis

O procedimento utilizado na partição dos extratos para obtenção de compostos foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Bresolin e Cechinel Filho (2010).

Dos extratos brutos etanólicos, 5g de amostra de *B. rufa* e 7,43g de *E. daphnites* foram submetidos à partição conforme método de separação com solvente de diferentes polaridades. Em um funil de decantação de 500mL, foi depositada a amostra a ser separada e, em seguida, a mistura de solventes imiscíveis composta por 100mL de metanol (CH₃OH) e 100mL de água destilada (1:1:1) com posterior adição de 25mL de hexano, homogeneizando vigorosamente com um bastão de vidro. Assim, fracionou-se com o solvente hexano (4 x 25mL), sendo obtida a fração hexânica do extrato bruto etanólico das plantas. Após a separação, esta fração foi concentrada em evaporador rotatório sob vácuo a uma temperatura de aproximadamente 40°C e exposta a secagem em banho-maria. Para a extração da fração acetato de etila, utilizando a fase aquosa remanescente de cada extrato preparado a partir da extração da fração hexânica, foram adicionados 25mL de água destilada juntamente com o solvente acetato de etila (4 x 25mL). A fração acetato de etila foi evaporada e a fração aquosa foi acondicionada em balão redondo, congelada e liofilizada, resultando deste procedimento três produtos para cada extrato bruto: fração hexânica, acetato de etila e aquosa dos respectivos extratos (Figura 5 e Tabela 4). As frações obtidas foram mantidas sob refrigeração.



Fi

Figura 5- Esquema para obtenção das frações por partição entre líquidos imiscíveis

TABELA 4- Rendimento do fracionamento do extrato etanólico de *Bauhinia rufa* e de *Erythroxylum daphynites* por partição entre líquidos imiscíveis

Espécie	Espécie
<i>B. rufa</i> frações obtidas de (5g)	<i>E. daphynites</i> frações obtidas de (7,43g)
Fração acetato de etila (47,6%)	Fração acetato de etila (14,5%)
Fração hexânica (5,8%)	Fração hexânica (2,8%)
Fração aquosa (0,02%)	Fração aquosa (3,8%)

O rendimento das frações oriundas dos extratos etanólicos foram calculados a partir da amostra de extrato utilizada, conforme fórmula descrita no item 4.1.1.2.

4.1.2 Preparo das Soluções

4.1.2.1 Preparo das Soluções de Extrato

Inicialmente, os extratos foram solubilizados para o teste com disco conforme o extrato e seu respectivo solvente, sendo então utilizados água destilada esterilizada, hexano e etanol para obter uma solução mãe de 50mg/mL. Ao adicionar 20µl de extrato solubilizado em cada disco, a concentração final dos extratos e frações variou de 62,5 até 1000µg/disco. Para o teste de microdiluição em caldo, o extrato aquoso e as frações de *E. dysenterica* foram diluídos com dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e água destilada, de forma a obter uma solução padrão de 1mg/mL, a qual foi diluída em série com concentrações finais do extrato e das frações no meio de cultura de 1,3 até 167µg/mL.

4.1.2.2 Preparação dos Discos com as Soluções de Extratos ou Frações

Cada disco de papel estéril, com 6,0mm de diâmetro, foi impregnado com 20µL da solução de extrato bruto ou de sua fração, dispensados com uma pipeta a fim de obter as seguintes concentrações: 62,5, 125, 250, 500 e 1000µg/disco. A secagem dos discos foi realizada dentro de placas de petri (150X15) estéreis em temperatura ambiente por 24 horas.

Os discos embebidos com 20µl dos solventes água Milli-Q, hexano e etanol foram utilizados como controle negativo.

4.1.2.3 Preparo da Solução Salina 0,9%

Uma solução de NaCl na concentração de 9g/L foi preparada com água destilada estéril. Essa solução foi usada para a padronização do inóculo.

4.1.2.4 Preparo da Solução de DMSO 5%

Esta solução foi preparada com uma alíquota de 5mL de DMSO, que foi diluída em 9,5mL de água Milli-Q estéril.

4.1.2.5 Preparo da Solução de Resazurina 0,01%

Para o preparo desta solução, 1mg do reagente Resazurina (Sigma-Aldrich) foi adicionado a 10mL de água Milli-Q estéril.

4.1.2.6 Preparo das Soluções Tampão

Solução A

Para o preparo de 100mL, foi dissolvido 1,39g de fosfato de sódio monobásico em água estéril dentro de um balão volumétrico.

Solução B

Para o preparo de 200mL, foram dissolvidos 5,36g de fosfato de sódio dibásico em água estéril dentro de um balão volumétrico.

Tampão fosfato pH 8, 0,1M/L

Para obtenção desta solução solvente, foram pipetados 94,7mL da solução B juntamente com 5,3mL da solução A.

Tampão fosfato pH 6, 0,1M/L

Para obtenção desta solução diluente, foram pipetados 87,7mL da solução A juntamente com 12,3mL da solução B.

4.1.2.7 Preparo das Soluções Estoque dos Agentes Antimicrobianos

Solução estoque de Ampicilina

A solução estoque de ampicilina (Sigma-Aldrich) foi preparada com 5120 μ g do pó antimicrobiano, o qual foi homogeneizado com 1mL do solvente tampão fosfato pH 8, 0,1M/L e, em seguida, diluído com 9mL do diluente tampão fosfato pH 6, 0,1M/L, sendo obtida uma concentração de 512 μ g/mL, conforme documento M100-17 (CLSI, 2007).

Solução estoque de Oxacilina

A solução estoque de oxacilina (Sigma-Aldrich) foi preparada com 5120 μ g do pó antimicrobiano, o qual foi homogeneizado com 10mL de água Milli-Q estéril, sendo obtida uma concentração de 512 μ g/mL.

4.1.2.8 Preparo do Meio Mueller Hinton Cátion Ajustado - CAMHB

Primeiramente, foi preparada uma solução de magnésio dissolvendo-se 8,36g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ em 100mL de água Milli-Q estéril, a qual contém 10mg de Mg^{++} /mL.

Depois, foi preparada uma solução de cálcio dissolvendo-se 3,68g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ em 100ml de água Milli-Q estéril, a qual contém 10mg de Ca^{++} /mL.

Posteriormente, foi preparado o caldo Mueller Hinton conforme instruções do fabricante, deixando arrefecer e acrescentando 100 μ L de solução de magnésio e 100 μ L de solução de cálcio para um litro de caldo.

Na porção de caldo Mueller Hinton utilizada com o agente antimicrobiano oxacilina, foi acrescentado NaCl 2% p/v.

4.1.3 Ensaios Biológicos

4.1.3.1 Micro-organismos Avaliados

O bioscreening da atividade antimicrobiana dos extratos e das frações foi investigado em agentes patogênicos de relevância clínica: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 12692, *S. aureus* ATCC 29213 produtor de β -lactamase, *S. aureus* ATCC 27154 produtor de enterotoxina, *S. aureus* ATCC 10390 produtor de enzima coagulase, *S. aureus* ATCC 6538 proveniente de lesão humana, *S. aureus* ATCC 12598 isolado de artrite séptica, *S. aureus* ATCC 25904, *S. aureus* ATCC 29737 e *S. aureus* subsp. *Aureus* ATCC 25923 obtida de isolamento clínico; os quais foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ - BRASIL. Os microrganismos liofilizados foram reativados em caldo Mueller Hinton (MHB, Himedia, Mumbai, Índia) e, após 24 horas, foram semeados em Ágar Mueller Hinton (MHA, Acumedia, Neogen, Lansing, MI, USA) e submetidos aos testes. Todas as culturas foram armazenadas a -80°C em glicerol e regeneradas antes do uso na análise dos ensaios.

4.1.3.2 Preparo do Inóculo Bacteriano e Padronização

No preparo da cultura do inóculo, para a reativação de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, utilizou-se o meio líquido Mueller Hinton Broth em ambiente estéril e incubação a 35°C por 24 horas. Decorrido o período de ativação, foi feita cultura em um meio inclinado em tubos de ensaio contendo MHA, incubando-se por 24 horas a 35°C novamente. Então, foi feita uma suspensão direta de colônias com uma solução salina 0,9% estéril, seguida da padronização no espectrofotômetro a 625nm até alcançar turbidez equivalente a 0,5 da escala de MacFarland (10^8 UFC/mL). Foram realizadas duas diluições seriadas 1:10 para obter, assim, a suspensão de trabalho a 1×10^6 UFC/mL.

4.1.3.3 Método de Difusão em Disco

A atividade antimicrobiana dos extratos e das frações foi testada nas cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 pelo método de difusão em disco, recomendado pelo NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards (atual CLSI), o qual se baseia no método descrito por Bauer e colaboradores (1966) (BAUER *et al.*, 1966). A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com o protocolo M2-A8 (NCCLS, 2003b) e os documentos M100-S15 e M100-S17, em que a CIM foi definida como a menor concentração detectada visualmente que inibiu o crescimento do microrganismo. Esta técnica fornece resultados qualitativos de padrão de resposta de bactérias quanto à sensibilidade destas frente a concentrações pré-estabelecidas de uma droga antimicrobiana e, a partir desta resposta, é possível agrupar o microrganismo infectante como sensível ou resistente (ROSSI;ANDREAZZI, 2005; ALVES, E. G.; VINHOLIS;CASEMIRO, 2008; GOODMAN;GILMAN, 2010). Cada suspensão de micro-organismo foi inoculada em 20mL de MHA por meio de espalhamento em placas de petri de 90x15cm de diâmetro preparadas previamente, esperando-se a completa absorção do inóculo pelo ágar antes de depositar os discos contendo os extratos. Em seguida, foram incubadas a 35°C durante 24 horas para permitir o crescimento bacteriano. Decorrido o período de incubação, o diâmetro das zonas de inibição foi mensurado em milímetros. Foram consideradas ativas as zonas de extratos ou frações que obtiveram 10 milímetros ou mais de zona clara de inibição.

Como controle positivo, foram empregados discos das substâncias puras ampicilina e amoxicilina - Laborclin. Como controle negativo, foram utilizados discos impregnados com os respectivos solventes. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. As análises estatísticas dos resultados foram feitas pela média ponderada e os respectivos desvios padrão das amostras das triplicatas utilizando GraphPad Prism versão 5.01.

4.1.3.4 Método de Microdiluição em Caldo

O método de microdiluição em caldo foi aplicado para as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC (25923, 29213, 12692, 6538, 27154, 10390, 12598, 29737 e 25904). O ensaio procedeu-se segundo a metodologia dos documentos M7-A6 do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003a), M100-S15 e M100-S17 (CLSI, 2007), em que cada orifício da placa de 96 poços recebeu 90µL de MHB, 20µL de solução de extrato ou fração e 10µL da suspensão bacteriana testada a aproximadamente 10^6 UFC/mL. As concentrações finais variaram de 1.3 até 167µg/mL na diluição seriada por poço, sendo o volume final de 120µL. As placas inoculadas foram então incubadas a 35°C durante 24 horas. Ampicilina e oxacilina a 512µg/mL foram utilizadas como controle positivo e DMSO 5% foi aplicado como controle negativo. Nas placas teste, foram incluídos os controles de esterilidade (120µL de MHB) e de crescimento (110µL de MHB e 10µL de inóculo). Em seguida, as placas inoculadas foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Cumprido o período de incubação, aos poços foram adicionados 30µL de resazurina a 0,01% e, após 4h de reincubação, foi realizada leitura visualmente. A presença ou ausência de crescimento microbiano foi revelada por meio da técnica de coloração com resazurina; sendo demonstrada resposta positiva de atividade por meio da coloração azul, que indica a ausência de células viáveis, e resposta negativa de atividade por meio da coloração rosa, que indica presença de células viáveis. Deste modo, conforme descrito por Alves et al. (2008), a CIM foi determinada como a menor concentração do extrato da planta ou das frações capaz de inibir o crescimento de micro-organismos no caldo (ALVES, E. G.; VINHOLIS; CASEMIRO, 2008). Para cada teste foram realizados ensaios em triplicata.

4.1.3.5 Atividade Moduladora pelo Método de *Checkerboard* - "Tabuleiro de Xadrez"

A performance de sinergismo entre drogas antimicrobianas e a fração acetônica de *E. dysenterica* foi revelada com o auxílio do "Teste de *Checkerboard*". Este ensaio, desenvolvido com base na técnica de microdiluição em caldo

estabelecida pela norma M7-A6 (2003) do CLSI, consiste na avaliação do efeito da combinação de dois agentes antimicrobianos sobre um determinado micro-organismo e, conseqüentemente, na determinação da CIM das drogas juntas (BONAPACE *et al.*, 2000). Para a avaliação do potencial efeito de interação entre as drogas antimicrobianas e a fração acetônica vegetal, foi utilizado o Índice de Concentração Inibitória Fracionado (ICIF), o qual corresponde à soma das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIF). Estas equivalem à razão entre a CIM das substâncias A e B combinadas pela CIM de cada substância, conforme descrito abaixo (ODDS, 2003; JOHNSON *et al.*, 2004).

$CIF_A = CIM \text{ da droga A com B} / CIM \text{ de A sozinha}$

$CIF_B = CIM \text{ da droga B com A} / CIM \text{ de B sozinha}$

$ICIF = CIF_A + CIF_B$

Nesta avaliação, o ICIF foi interpretado como indicativo de sinergismo se ≤ 0.5 , aditivo ou indiferente se > 0.5 e ≤ 1 , e antagonismo se > 1 (VISALLI; JACOBS; APPELBAUM, 1998; BONAPACE *et al.*, 2000; BONAPACE *et al.*, 2002; ODDS, 2003).

Desta forma, definidas as CIMs do antimicrobiano e da fração acetônica de *E. dysenterica* frente à cepa de bactérias Gram-positivas *S.aureus* ATCC 29213, estes foram convertidos em concentração inibitória fracionada (CIF).

Nos ensaios de combinação, o procedimento de *checkerboard* ou 'tabuleiro de xadrez' descrito por White (WHITE *et al.*, 1996) foi realizado conforme sugerido por Bonapace (BONAPACE *et al.*, 2002), o qual permite a variação das concentrações de cada um dos antimicrobianos ao longo de eixos, assegurando, assim, que cada um dos 96 poços da placa do *bioscreenig* contenha uma combinação diferente de concentrações dos compostos (Figura 6). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata.

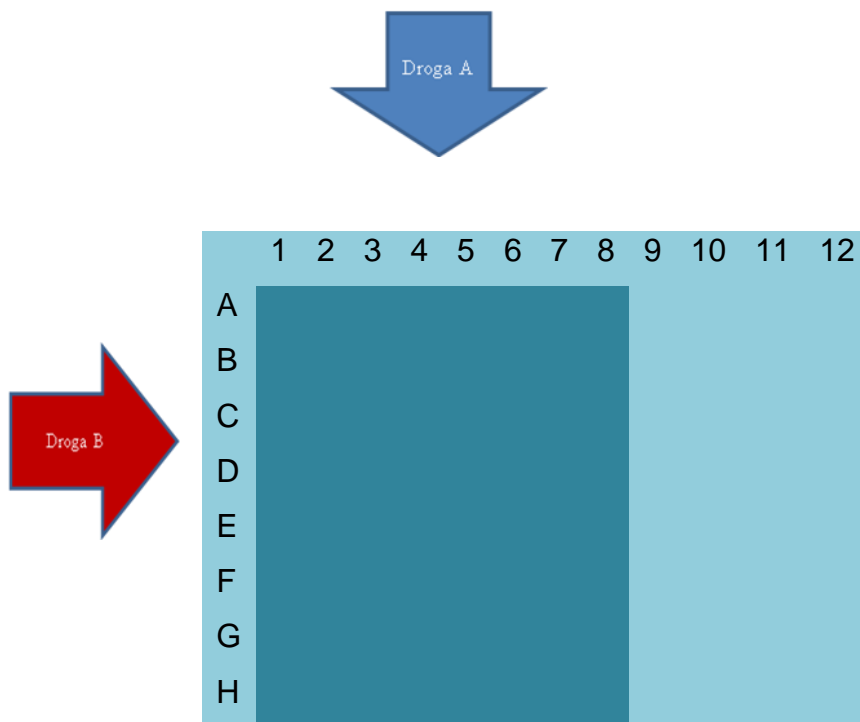


Figura 6 - Esquema para realização do *checkerboard* ou 'tabuleiro de xadrez'

4.1.4 Agentes Antimicrobianos

Para a definição das CIMs dos fármacos padrão, foram empregados como controles positivos discos de 10 μ g de Ampicilina e de 10 μ g de Amoxicilina (Laborclin), para o teste de difusão em disco, e pó de Ampicilina e Oxacilina (Sigma-Aldrich), para o método de microdiluição em caldo.

4.1.5 Análises Cromatográficas

As análises cromatográficas foram desenvolvidas no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da UnB.

4.1.5.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

4.1.5.1.1 *fase estacionária*

A caracterização da constituição qualitativa do extrato aquoso de *E. dysenterica* e de suas frações foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), conforme metodologia preconizada por Wagner & Bladt (WAGNER, HILDEBERT ;BLADT, 1996.).

Foram utilizadas placas de sílica gel 60 G (Merck), preparadas em suporte de vidro, com 0,25mm de espessura, previamente ativadas a 105°C; e placas de sílica gel de 0,2mm Kieselgel 60 Alugram 805-25 EA (Sigma-Aldrich, Germany). As amostras foram suspensas em metanol e aplicadas nas placas.

4.1.5.1.2 *fase móvel*

A fase móvel foi constituída de um sistema solvente composto por acetato de etila (AcOEt), ácido acético (AcOH), ácido fórmico (HCOOH) e água (25:1,5:1,5:1,5 v/v/v/v ml), no qual foram eluídas as amostras.

4.1.5.1.3 *reveladores e reagentes*

As cromatoplasas foram reveladas por meio da borrifação com o reagente NP/PEG solução A (solução metanólica de difenilboriloxietilamina 2%) e, em seguida, com a solução B (solução etanólica de polietilenoglicol-400 (PEG400) 5%), sendo procedida a visualização sob luz UV (λ 365nm).

Estes reagentes foram utilizados para detectar flavonóides e outros compostos fenólicos, que demonstram intensa fluorescência à luz ultravioleta (SIMÕES *et al.*, 2002).

Posteriormente, as placas foram reveladas por meio de borrifação com solução A (anisaldeído em ácido acético 2%) e, em seguida, com solução B (solução etanólica de H₂SO₄ 20%), sendo aquecidas à temperatura de aproximadamente 100°C para revelação.

Após a primeira, também foram feitas borrifações com as soluções A (solução etanólica de vanilina 1%) e B (solução etanólica de ácido sulfúrico 5%), seguida de aquecimento para realização de outro método de revelação.

4.1.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por cromatografia líquida foram desenvolvidas no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da UnB.

A fração acetônica de *E. dysenterica* foi analisada usando o cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), sistema LaChrom Elite (Hitachi, Tokyo, Japão), composto por uma bomba L2130, injetor L2200, forno para coluna L2300 mantido a 25°C e detector L2455 DAD. O detector usado para coletar os dados da amostra foi ajustado na faixa de 230nm e 400nm, sendo extraído um cromatograma em 280nm e 354nm. A fase móvel foi constituída de solução eluente de ácido fosfórico 1% (solvente da bomba A) e acetonitrila (solvente da bomba B), sendo o gradiente de eluição 0 min. 90% (A) e 10% (B); 40 min. 70% (A) e 30% (B); 50 min. 50% (A) e 50% (B). A fase móvel deu-se com uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. A separação foi realizada em uma coluna C18 e de fase reversa da Star PurospherStar RP C18 (150 X 4.6mm, 5mm, Merck, Germany), acoplada à pré-coluna de mesmas características (4 x 4; 5mm particlesize, Merck, Germany). Os componentes presentes nas amostras foram caracterizados de acordo com seu espectro UV-vis, identificados por seu tempo de retenção e comparados com padrões comerciais.

4.1.6 Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Histopatologia Bucal da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, onde foram testadas duas linhagens celulares quanto à sua viabilidade mitocondrial frente ao extrato bruto aquoso de *E. dysenterica* (EDA) e à sua fração acetônica (FA), sendo uma linhagem de queratinócito humano (HaCat) e uma linhagem de fibroblastos de camundongo (L-929). As células foram cultivadas como monocamadas em uma mistura de meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) e enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina - estreptomicina). As células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂. Para todos os experimentos, as células foram desagregadas com solução de tripsina (0,25%) / EDTA (1mM). Todos os reagentes utilizados nas culturas celulares foram adquiridos de Sigma-Aldrich (ET. Louis, MO). As linhagens de células utilizadas são oriundas de coleções ATCC (American Type Culture Collection).

As células foram semeadas a uma densidade de 5000 células por poço em uma placa de 96 poços e incubadas por 24 horas. Decorrido este período, tratou-se as células com solução de extrato aquoso bruto de *E.dysenterica* e da fração acetônica, que foram diluídos em meio de cultura DMEM (Dulbelco`s Modified Eagle Medium) a uma concentração de 500µg/mL, assim como, a concentrações referentes à CIM do ensaio antimicrobiano (83 e 167µg/mL). Decorridas as 24 horas de incubação e tratamento, para cada 100µL de meio com extrato foram adicionados 10µL de solução de brometo de Tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil - MTT (5mg/mL). As placas foram recobertas com papel alumínio e reincubadas. Após 4 horas, foi aspirado o meio de cultura com a solução de MTT e acrescentado 100µL de isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104µL de HCl 100%). As placas foram agitadas em vortex por 10 minutos a velocidade média. Finalmente, a absorbância das células foi verificada em uma leitora de microplaca (Thermo Plate TP reader) a 570nm. Para obter a citotoxicidade induzida pelo tratamento, a absorbância das células foi comparada à absorbância de seu devido controle negativo (células tratadas apenas com meio de cultura e solução de PBS na mesma concentração utilizada para as células tratadas com o extrato), que foi estabilizado como 100% de células viáveis.

Este teste avalia a capacidade da atividade enzimática mitocondrial das células vivas converterem sais de tetrazólio (brometo de Tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil - MTT) em formazan, portanto, apenas as células viáveis têm a capacidade de fazer esta redução ou as células que não sofreram toxicidade ainda suficiente para reduzir a sua atividade mitocondrial.

Todas as experiências foram conduzidas em triplicata. As análises estatísticas dos resultados da citotoxicidade foram feitas pela média ponderada e os respectivos desvios padrão das amostras das triplicatas utilizando GraphPad Prism versão 5.01. Os valores encontrados foram comparados ao controle com o uso de Oneway ANOVA, seguido pelo teste de análise de Tukey. Ou seja, o teste busca identificar se as médias encontradas para a amostra e para o controle são significativamente diferentes. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $p < 0,05$, portanto, resultando em um intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Neste estudo, sete espécies nativas do Cerrado foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana *in vitro* em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Nos ensaios biológicos, foram testados extratos brutos e frações obtidos destas plantas.

De acordo com as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) e outros relatos presentes na literatura, na avaliação de compostos quanto à sensibilidade microbiana, é apropriado o uso dos métodos de difusão em disco e de microdiluição em caldo, utilizados neste estudo, os quais são métodos qualitativo e quantitativo, respectivamente. Estes são métodos simples, rápidos, de baixo custo e de fácil reprodutibilidade e que demandam diminutas porções de amostras (BAUER *et al.*, 1966; ELOFF, 1998a; NCCLS, 2003a, 2003b; ROSSI;ANDREAZZI, 2005; KLANČNIK *et al.*, 2010; KUETE, 2010).

O método de difusão em disco determina a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração de agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento de colônias visíveis no meio de cultura, seguindo o protocolo recomendado para testes de sensibilidade de acordo com o NCCLS, Documento M2-A8, 2003 (ELOFF, 1998b; NCCLS, 2003b; GOLDMAN;AUSIELLO, 2009). A CIM dos extratos foi aferida através do diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano, considerando-se sensível (S) quando houve desenvolvimento de halo $\geq 10,0\text{mm}$ e resistente (R) quando não houve desenvolvimento de halo ou este foi $< 10,0\text{mm}$, conforme sugerido por alguns autores (SOUZA, I. A. *et al.*, 2007; AGUIAR *et al.*, 2008; OLIVEIRA, I. S. *et al.*, 2008).

No presente estudo, foram testados 16 extratos brutos: extratos hexânicos de *B. rufa* (folhas), *E. subrotundum* (folhas), *E. daphnites* (folhas), *P. torta* (folhas) e *P. ramiflora* (folhas e caules); extratos etanólicos de *B. rufa*, *B. variegata* (folhas), *E. subrotundum*, *E. daphnites*, *P. torta* e *P. ramiflora*; e extratos aquosos de *B. rufa*, *E. subrotundum*, *E. daphnites* e *E. dysenterica* (folhas). Destes, 6 extratos apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, sendo que algumas

espécies exibiram atividade de inibição de *S. aureus* ATCC 25923, com halos medindo 10,0mm de diâmetro ou mais no ensaio de difusão em disco (Tabela 5).

TABELA 5- Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos brutos testados pelo método de difusão em disco ativos frente a *S. aureus* ATCC 25923

Família	Espécie	Extrato *	CIM µg/disco	Halos (mm)
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i>	Etanol (f)	1000	10,0 ± 1,0
	<i>daphnites</i>	Aquoso (f)	1000	10,6 ± 0,6
Leguminosae	<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Stued	Hexano (f)	1000	11,3 ± 0,6
Myrtaceae	<i>Eugenia</i> <i>dysenterica</i> DC.	Aquoso (f)	250	10,3 ± 0,6
Sapotaceae	<i>Pouteria</i>	Etanol (f)	1000	10,3 ± 0,6
	<i>ramiflora</i> Radlk.	Hexano (c)	1000	10,0 ± 0,0
AMP**			10	49,7± 0.6
AMOX**			10	39,6 ± 0.6

*Solvente utilizado e parte vegetal utilizada folha (f) e caule (c)

** Controle positivo: ampicilina e amoxicilina

Os extratos brutos de *B. rufa*, *B. variegata*, *E. daphynites*, *E. subrotundum*, *P. torta*, *P. ramiflora* e *E. dysenterica* não apresentaram halo de inibição para *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 25922, demonstrando que estas bactérias Gram-negativas não foram sensíveis a estes extratos nas concentrações testadas. Resultado semelhante foi relatado quanto ao extrato aquoso de *Eugenia malaccencis* (LOCHER *et al.*, 1995).

Posteriormente, foram realizados ensaios utilizando frações dos extratos brutos destas plantas para avaliar uma possível atividade de inibição microbiana em *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923. Os resultados revelaram ação inibitória somente contra *S. aureus* ATCC 25923 (Tabela 6).

Considerando a incidência crescente e preocupante das infecções, em especial as causadas por *S. aureus* (SPELLBERG; BARTLETT; GILBERT, 2013),

principalmente, devido à distribuição ubiqüitária (BASSETTI; NICCO;MIKULSKA, 2009; AHMED *et al.*, 2012; DIAB; ATALLA;ELBANNA, 2012; NUNES; ARRAIS DE ALENCAR MOTA;CALDAS, 2013). Em face disso, há uma predisposição para adquirir este micro-organismo Gram-positivo patogênico. Fato este alarmante, uma vez que, mundialmente, têm despertado considerável atenção as doenças infecciosas provocadas por *S. aureus*, uma das principais causas de elevadas taxas de mortalidade e morbidade (TAYLOR, P. L.;WRIGHT, 2008; BURTON *et al.*, 2009; GOLDMAN;AUSIELLO, 2009), especialmente entre crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas (OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ;DE LENCASTRE, 2002; COLOMBO;GUIMARÃES, 2003; FIELD, 2003; KUMAR; ABBAS;FAUSTO, 2005).

Portanto, estes relatos são importantes para fornecerem novas opções terapêuticas para infecções que afligem a sociedade contemporânea. Dentre os agentes etiológicos de processos infecciosos, *S. aureus* é considerado um dos mais importantes patógenos oportunistas e está frequentemente associado a infecções comunitárias e hospitalares (ANDERSON *et al.*, 2012). No homem, este micro-organismo está vinculado a doenças de pele e mucosas, que afetam cerca de 7% da população, tais como impetigo, ectima, foliculite, síndrome da pele escaldada e infecções gastrointestinais, infecções nosocomiais, as quais podem complicar-se com bacteremia, endocardite, pneumonia ou até septicemia (COLOMBO;GUIMARÃES, 2003; KUMAR; ABBAS;FAUSTO, 2005; BURTON *et al.*, 2009; EMPINOTTI *et al.*, 2012). Pode provocar ainda mastite em animais (FAGUNDES;OLIVEIRA, 2004).

TABELA 6- Concentração inibitória mínima (CIM) das frações de extratos testadas pelo método de difusão em disco ativas frente a *S. aureus* ATCC 25923

Família	Espécie	Fração	CIM	Halos
---------	---------	--------	-----	-------

			$\mu\text{g}/\text{disco}$	(mm)	
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum daphnites</i> (f)	Acetato de etila	500	$10,3 \pm 0,6$	
		Hexânica	NI	NI	
		Aquosa	500	$10,0 \pm 0,0$	
		Metanólica	500	$10,3 \pm 0,6$	
		Acetônica	1000	$10,0 \pm 0,0$	
		Precipitado	NI	NI	
		Leguminosae	<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Stuedel (f)	Hexânica	1000
	Acetato de etila	NI		NI	
	Aquosa	NI		NI	
Leguminosae	<i>Bauhinia variegata</i> (Bong.) Stuedel (f)	MeOH		NI	NI
Myrtaceae		<i>Eugenia dysenterica</i> DC. (f)	Acetônica	250	$11,6 \pm 0,6$
			Metanólica	250	$10,0 \pm 0,0$
			Isopro	250	$10,0 \pm 0,0$
AMP**			10	$49,7 \pm 0,6$	
AMOX**			10	$39,6 \pm 0,6$	

NI= não inibiu

** Controle positivo: AMP= ampicilina e AMOX= amoxicilina

De acordo com a literatura, o gênero *Erythroxylum* é escasso em estudos farmacológicos e fitoquímicos (GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 2005). Quanto aos constituintes químicos da espécie *E. daphnites*, há relato de terem sido isolados flavonóides, como kampherol e quercitina (BOHM *et al.*, 1988). Estudo recente com uma espécie do gênero *Erythroxylum* comprovou atividade antibacteriana e antifúngica de extrato metanólico e frações de *E. caatingae* e constatou que esta planta apresenta compostos bioativos frente a bactérias Gram-positivas, como *S. aureus*, e não foi efetiva em bactérias Gram-negativas (AGUIAR *et al.*, 2012),

semelhante aos dados encontrados no presente estudo com *E. daphnites*. Provavelmente, esta ação deve-se à presença de moléculas bioativas, como alcaloides, taninos, flavonoides e terpenoides, sintetizadas por membros da família Erythroxilaceae (AGUIAR *et al.*, 2012).

Quanto ao gênero *Bauhinia*, há comprovada atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram-positivas como para Gram-negativas. Por exemplo, *Bauhinia forficata* foi ativa em *E. coli* e *S. aureus*, *Bauhinia splendens* teve ação sobre *S. aureus* (DA SILVA;CECHINEL FILHO, 2002) e *Bauhinia variegata* inibiu *P. aeruginosa* e *S. aureus* (POKHREL; ADHIKARI;BARAL, 2002). Chew e colaboradores (2011) afirmam que as espécies *Bauhinia kockiana* e *Bauhinia pulcherrima* têm ação antimicrobiana para bactérias Gram-positivas, com CIM de 100 a 500µg/disco para *S. aureus* (MRSA), e julgam que este efeito é atribuído à alta quantidade de compostos fenólicos presentes nesta espécie (CHEW *et al.*, 2011). Da mesma forma, as espécies *Bauhinia tomentosa* e *Bauhinia vahlii* também são efetivas contra micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos, incluindo *S. aureus* e leveduras (DUGASANI *et al.*, 2010).

Neste estudo, somente o extrato hexânico de *B. rufa* mostrou atividade frente a *S. aureus* 25923. Nos ensaios com *B. variegata*, não houve inibição dos microrganismos testados. Dados estes que divergem dos estudos de Pokhrel e colaboradores (2002), que evidenciaram atividade antimicrobiana no extrato etanólico bruto de *B. variegata*, o qual foi mais efetivo contra *P. aeruginosa* e *S. aureus* (POKHREL; ADHIKARI;BARAL, 2002). Esta diferença de resposta pode ser devida a fatores bióticos e de sazonalidade, fato que provavelmente ocorreu neste estudo (BRESOLIN;CECHINEL FILHO, 2010; HARAGUCHI;CARVALHO, 2010).

Os extratos brutos de *P. torta* não demonstraram efeito antimicrobiano com uma concentração de 1000µg/disco frente às cepas testadas. Estudos apontam que o gênero *Pouteria* apresenta atividades biológicas antitumoral, anti-inflamatória e anti-helmíntica (SILVA, C. A.; SIMEONI;SILVEIRA, 2009), assim como a espécie *P. torta* tem ações antimicrobiana e antioxidante (PERFEITO *et al.*, 2005; BOLETI *et al.*, 2007), conferidas aos triterpenos (MONTENEGRO *et al.*, 2006). O flavonoide mericitrina é um marcador do gênero (SILVA, C. A.; SIMEONI;SILVEIRA, 2009). Segundo Alves e colaboradores (2000), o extrato metanólico de folhas de *P. torta* inibiu *Cladosporium sphaerospermum*, *Bacillus cereus*, *E. coli* (ATCC 25922), *P.*

aeruginosa (ATCC 27853) e *S. aureus* (ATCC 25923) com uma concentração de 5 mg/poço (ALVES, T. M. D. A. *et al.*, 2000).

Assim, a ausência de efeito antimicrobiano da espécie *P. torta* no presente estudo pode ser devida à concentração adotada ou a fatores ambientais (BRESOLIN;CECHINEL FILHO, 2010). Por outro lado, os extratos etanólico (f) e hexânico (c) da espécie *P. ramiflora* apresentaram atividade antimicrobiana contra *S.aureus*, com halo de inibição de 10mm, o que mostra que o gênero *Pouteria* possui capacidade de sensibilização de bactérias Gram-positivas.

5.2 ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO PELA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *EUGENIA DYSENTERICA*

O *screening* por difusão em disco indicou que a espécie *E. dysenterica* exibiu considerável atividade antimicrobiana para a linhagem Gram-positiva (*S. aureus*), sobressaindo-se como a espécie mais promissora. A partir deste resultado, foi feito um biomonitoramento do extrato bruto aquoso e das frações acetônica, metanólica e isopropanólica da espécie pelo método de microdiluição em caldo para determinar a CIM de cada um dos produtos botânicos, por meio de uma diluição seriada entre 1,3 a 167 μ g/mL.

É importante salientar que o critério de classificação adotado na avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) para atividade antimicrobiana por microdiluição em caldo foi realizado conforme o documento M7-A6 do CLSI/NCCLS e os suplementos M100-S15 e 17, considerando-se CIM \leq 100 μ g/ml como atividade antimicrobiana potencialmente positiva, CIM de 100 a 500 μ g/ml como atividade antimicrobiana moderada, CIM de 500 a 1000 μ g/mL como atividade antimicrobiana leve e CIM >1000 μ g/mL como inativo (HOLETZ *et al.*, 2002; NCCLS, 2003a; CLSI, 2005; DUARTE, M. C. T. *et al.*, 2005; CLSI, 2007; KUETE, 2010).

A triagem da inibição do crescimento de *S. aureus* por extrato aquoso e frações de *E. dysenterica* foi conduzida usando o método de microdiluição com a reação de resazurina. Este indicador é reduzido a resofurina na presença de células viáveis (STOPPA, 2009) e tem a vantagem de não formar precipitado após a redução,

permitindo leitura direta visual, além de ser um método fácil e reprodutível (COS *et al.*, 2006).

O efeito dos compostos sobre os isolados nos ensaios por microdiluição indicou que a fração acetônica de *E. dysenterica* apresentou excepcional atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* avaliadas em relação às demais frações e ao extrato bruto aquoso (Tabela 7).

TABELA 7- Perfil da atividade antimicrobiana, CIM ($\mu\text{g/mL}$) de extrato aquoso e frações de folhas de *E. dysenterica* pelo método de microdiluição em caldo para diferentes isolados de patógenos oportunistas

Cepas de <i>S. aureus</i>	Isolado*/ Produção**	Extrato aquoso ($\mu\text{g/mL}$)	Fração acetônica ($\mu\text{g/mL}$)	Fração metanólica ($\mu\text{g/mL}$)	Fração Iso propanólica ($\mu\text{g/mL}$)	AMP ($\mu\text{g/mL}$)	OXA ($\mu\text{g/mL}$)
25923	Isolamento clínico *	83,0	83,0	83,0	83,0	-	-
29213	Ferimento * β -lactamase**	167,0	83,0	NI	NI	128,0	256,0
12692	-	83,0	167,0	167,0	NI	-	-
6538	Lesão humana*	167,0	167,0	167,0	NI	-	-
27154	Peru fatiado* Enterotoxina**	167,0	167,0	167,0	NI	-	-
10390	Enzima coagulase **	NI	167,0	NI	NI	-	-
12598	Artrite séptica *	NI	167,0	167,0	NI	-	-
29737	-	83,0	167,0	NI	NI	-	-
25904	-	167,0	167,0	NI	NI	-	-

(*) Isolado; (**) Produção; (NI) Não inibiu

No presente estudo, os extratos e as frações das plantas somente mostraram atividade antimicrobiana para micro-organismos Gram-positivos. Esta resposta pode ser atribuída à diferença estrutural da parede celular das bactérias, isto é, a presença da membrana lipoprotéica revestindo o exterior das bactérias Gram-

negativa pode ter dificultado a difusão dos compostos ativos, atuando como uma barreira (KAJIYA; KUMAZAWA; NAKAYAMA, 2002; BURT, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005; FRIEDMAN, 2007; MAGINA *et al.*, 2009; ZAGO; USHIMARU; BARBOSA, 2009; GOODMAN; GILMAN, 2010; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Além disso, a presença de compostos fenólicos e lipopolissacarídeos torna as células Gram-negativas menos suscetíveis a agentes antimicrobianos, dificultando a ruptura da membrana e, conseqüentemente, os danos às mitocôndrias provocados por essas substâncias (BURT, 2004; TAGURI; TANAKA; KOUNO, 2004; AULTON, 2005.). Burt (2004) reportou que é comum este padrão de resposta dos agentes patogênicos em relação a compostos vegetais (BURT, 2004). Portanto, a permeabilidade das células dos micro-organismos é diretamente influenciada por fatores estruturais. Além disso, Basile e colaboradores (2000) ressaltam que este comportamento seletivo é semelhante às classes de agentes antimicrobianos (BASILE *et al.*, 2000).

Usando o método do disco de difusão, foi mostrado que o extrato aquoso cru de *E. dysenterica* e as frações metanólica, acetônica e isopropanólica promoveram sensibilização da estirpe Gram-positiva. Então, foi realizado o teste de microdiluição em caldo com espécies isoladas de *S. aureus* (ATCC 25923, ATCC 12692, ATCC 29213, ATCC 27154, ATCC 10390, ATCC 6538, ATCC 12598, ATCC 25904, ATCC 29737). A avaliação do efeito antibacteriano de *E. dysenterica* frente às diversas bactérias Gram-positivas demonstrou que todas as linhagens de *S. aureus* mostraram-se sensíveis à fração acetônica (Figura 7).

Assim, de acordo com os critérios de classificação da atividade antimicrobiana aplicados, o extrato aquoso de folhas de *E. dysenterica* demonstrou considerável atividade antimicrobiana para as cepas de *S. aureus* ATCC 25923, 12692 e 29737, com CIM de 83 µg/mL; atividade antimicrobiana moderada nas cepas de *S. aureus* ATCC 29213, 6538, 27154 e 25904, com valor de CIM de 167 µg/mL; e não se apresentou ativo para as cepas de *S. aureus* ATCC 10390 e 12598 nas concentrações testadas. A fração acetônica mostrou os melhores resultados do ensaio, com uma atividade antimicrobiana relevante em *S. aureus* ATCC 29213 e 25923 (CIM = 83 µg/mL) e moderada atividade antimicrobiana em *S. aureus* ATCC 12692, 6538, 27154, 10390, 12598, 25904 e 29737 (CIM = 167 µg/mL). No entanto, comparando-se estes dois compostos ativos e considerando-se o perfil de sensibilidade de cada cepa a substâncias puras, é perceptível o desempenho

superior da fração acetônica, a qual inibiu todas as cepas testadas, principalmente as cepas 10390 (coagulase-positiva) e 12598 (isolada de artrite séptica) e, mais intensamente, a estirpe produtora de β -lactamase (*S.aureus* 29213), com CIM de 83 μ g/mL.

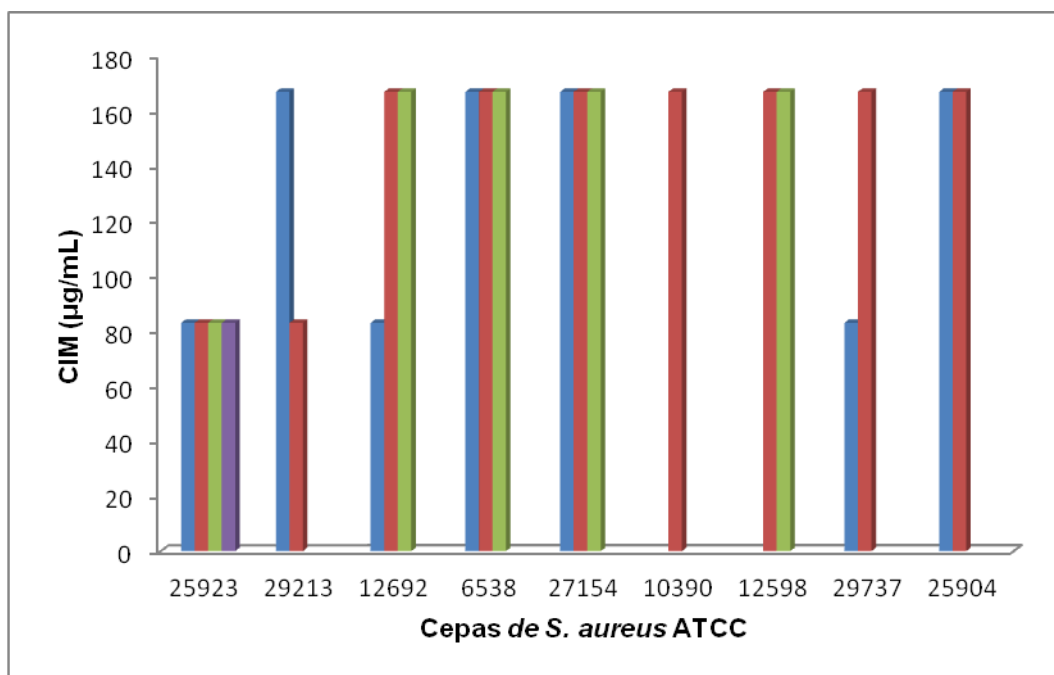


Figura 7- Perfil de *S. aureus* em relação ao extrato aquoso e às frações de *E. dysenterica* usando o método de microdiluição em caldo

■ extrato aquoso bruto; ■ fração acetônica; ■ fração metanólica e ■ fração isopropanólica

Estes resultados estão de acordo com os encontrados para outras espécies do gênero *Eugenia* que se destacam por sua ação antimicrobiana, como *Eugenia umbelliflora*, *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia uniflora*, *Eugenia malaccensis*, *Eugenia caryophyllata* e *Eugenia mansonii*.

E. umbelliflora e *E. brasiliensis* foram reportadas como potencialmente antimicrobianas para *S. aureus* ATCC 25923, com CIM de 119 e 156 μ g/mL, respectivamente (MAGINA *et al.*, 2009).

Das sementes de *E. uniflora* foi extraída e purificada uma lecitina (EUniSL), uma proteína que inibiu *in vitro* *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Klesiella* sp. (OLIVEIRA, M. D. L. *et al.*, 2008). Outro estudo também revelou a atividade antimicrobiana do óleo de *E. uniflora*, sensibilizando cepas de *S. aureus* com um CIM de 0,8mg/mL (VICTORIA *et al.*, 2012). Das sementes de outra espécie do gênero, a *E. malaccensis*, conhecida como jambo, também foi extraída uma lecitina (EmaL) que

teve ação antimicrobiana inibitória *in vitro* para *S. aureus* e proporcionou bons resultados *in vivo* para tratamento de inflamação em pele (BRUSTEIN *et al.*, 2012).

Segundo outro estudo, o extrato metanólico de folhas de *E. uniflora* inibiu *Cladosporium sphaerospermum*, *B. cereus*, *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *S. aureus* (ATCC 25923) com uma concentração de 5mg/poço (ALVES, T. M. D. A. *et al.*, 2000).

O extrato hidroalcoólico de folhas de *E. uniflora* foi testado em cepas de bactérias e leveduras, mostrando inibição de *S. aureus* com CIM de 250µg/mL e *E. coli* com CIM de 500µg/mL. Quanto às leveduras, inibiu *Candida krusei* com CIM de 31,2µg/mL, *C. parapsilosis* com CIM de 125µg/mL e *C. tropicalis* com CIM de 31,2µg/mL. Esta atividade pode ser atribuída aos constituintes bioativos presentes na espécie (HOLETZ *et al.*, 2002).

Auricchio e colaboradores (2007) também verificaram a atividade antimicrobiana de *E. uniflora* para *S. aureus* (CIM 80 µg/mL), *Salmonella cholerasuis* (CIM 100µg/mL), *P. aeruginosa* (CIM 400µg/mL) e *C. albicans* (CIM 500µg/mL), que pressupõe-se que seja produzida por compostos fenólicos (AURICCHIO; BARROS; BACCHI, 2007).

A *Eugenia caryophyllata*, mais uma espécie deste gênero que se sobressai quanto à capacidade antibacteriana (LARHSINI *et al.*, 2001; WHO, 2002b; CHAIEB *et al.*, 2007; FRANCISCO, 2010), é muito usada pela indústria de produtos de higiene pessoal na confecção de creme dental e enxaguatório bucal (VICTORIA *et al.*, 2012). O efeito antimicrobiano desta espécie dá-se devido à abundância de eugenol, o qual tem comprovada ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DORMAN; DEANS, 2000; LAI; ROY, 2004; FRANCISCO, 2010; KOUIDHI; ZMANTAR; BAKHROUF, 2010). O eugenol é usado como antisséptico e analgésico para tratamento de doenças infecciosas orais, pois estudos recentes evidenciaram sua potencial atividade antimicrobiana em patógenos orais, como *Streptococcus mutans* e diversas linhagens de *Candida* sp., com baixa citotoxicidade (KOUIDHI; ZMANTAR; BAKHROUF, 2010).

As espécies *E. mansonii* e *E. respanda* mostraram-se ativas para *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus*, *L. innocua*, *C. albicans* e *A. niger* (BERTUCCI *et al.*, 2009).

Outro exemplar desta mesma família é o *Syzygium jambos* (L.) Alston ou *Eugenia jambos*, cujos extratos aquoso e acetônico foram ativos em várias cepas de

S. aureus, por exemplo, inibiram uma cepa oxacilina resistente com CIM de 500 e 750µg/mL, respectivamente, e a cepa 25923 com CIM de 500µg/mL em ambos extratos (DJIPA; DELMÉE;QUETIN-LECLERCQ, 2000). Os extratos aquoso, etanólico e acetônico e as frações de sementes de *E. jambolana* inibiram *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (BAG et al., 2012).

Psidium cattleianum Sabine, o araçá, também apresenta abundância de compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenos, os quais são geralmente associados com importantes propriedades biológicas, incluindo ação antioxidante, antimicrobiana e anticarcinogênica (OZGOVÁ; HEŘMÁNEK;GUT, 2003; MEDINA et al., 2011).

Destaca-se também nesta família o gênero *Eucalyptus*, o qual, devido à ação do eucaliptol, é amplamente usado como antimicrobiano em produtos cosméticos e farmacêuticos, alimentos industrializados (TOHIDPOUR et al., 2010) e cimentos dentários, sendo capaz de inibir diversos micro-organismos, incluindo o *S. aureus* (WHO, 2002b). O óleo essencial deste gênero em combinação com antissépticos, como clorexidina, demonstrou significativa eficácia (KARPANEN et al., 2010). Comumente, têm-se incorporado óleos essenciais em produtos cosméticos, preparações tópicas para infecções cutâneas e soluções para uso inalatório (SOLÓRZANO-SANTOS;MIRANDA-NOVALES, 2012).

Relata-se ainda outros gêneros com potencial antimicrobiano, tais como *Hypericum* (CUSHNIE;LAMB, 2005), capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* resistente à metilina (SAVOIA, 2012); *Allium sativum* (Liliaceous), cuja propriedade foi detectada cientificamente por Louis Pasteur em 1858; *Thymus vulgaris* e *Salvia officinalis*, ambos da família Labiatae e ricos em timol (LAI;ROY, 2004; SOLÓRZANO-SANTOS;MIRANDA-NOVALES, 2012). Outra espécie também citada como eficaz no tratamento odontológico é a romã, *Punica granatum* L. (Punicaceae) (OLIVEIRA, F. Q. et al., 2007; FRANCISCO, 2010).

Uma espécie extensamente citada com potencial efeito antimicrobiano é a *Camellia sinensis* (Theaceae), erva que possui abundância do fitoquímico catequina (BOIK, 2001; KAJIYA; KUMAZAWA;NAKAYAMA, 2002; LAI;ROY, 2004; STAPLETON et al., 2004; BANDYOPADHYAY et al., 2005). As catequinas possuem uma significativa capacidade de modular a atividade antimicrobiana de fármacos de uso clínico, como a oxacilina (STAPLETON et al., 2004; STAPLETON et al., 2006) e o levofloxacino (FRIEDMAN, 2007).

Entre os metabólitos secundários vegetais com capacidade antimicrobiana, sobressaem-se flavonoides, alcaloides, lectinas, taninos e terpenos (PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010), com ação principalmente em bactérias Gram-positivas (KUETE, 2010; SAVOIA, 2012).

A caracterização fitoquímica por CCD e CLAE da fração acetônica de *E. dysenterica* revelou a presença de potenciais compostos antimicrobianos, os compostos fenólicos catequina e epicatequina (Figura 8 e 9). Inúmeros estudos associam a significativa atividade antimicrobiana de plantas à abundância de flavonoides, como catequinas (COWAN, 1999; VAN DER WATT; PRETORIUS, 2001; FRIEDMAN, 2007; PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010), composto biodisponível no plasma humano após 2 a 4 horas de sua ingestão (CABRERA; ARTACHO; GIMÉNEZ, 2006). Corroborando os resultados obtidos, estudos com *Camellia sinensis* relatam o potencial antimicrobiano das catequinas (STAPLETON *et al.*, 2004; FRIEDMAN, 2007; SHIMAMURA; ZHAO; HU, 2007; DAGLIA, 2012). Estudos com ensaios *in vitro* e *in vivo* sugeriram que catequinas oriundas de chá de *Camellia sinensis* podem ser uma alternativa para o tratamento de dermatite atópica (HISANO *et al.*, 2003; FRIEDMAN, 2007). As catequinas possuem ainda potencial atividade antimicrobiana contra *S. aureus* de origem alimentar (TAGURI; TANAKA; KOUNO, 2004).

Baseando-se no delineamento fitoquímico encontrado e no embasamento bibliográfico, provavelmente a atividade antimicrobiana do extrato aquoso e da fração acetônica de *E. dysenterica* apresentada neste estudo pode estar intimamente condicionadas à sua composição química, ou seja, à presença de flavonoides.

Estudos preliminares constataram que as bactérias Gram-positivas apresentam maior sensibilidade aos compostos polifenólicos, como as catequinas, fatos similares aos encontrados neste estudo (HISANO *et al.*, 2003; TAGURI; TANAKA; KOUNO, 2004).

O mecanismo da atividade antimicrobiana de muitos extratos de plantas tem sido atribuído aos compostos fenólicos, os quais podem reagir com a membrana celular e inativar processos vitais do micro-organismo (COWAN, 1999; SHIMAMURA; ZHAO; HU, 2007; YALTIRAK *et al.*, 2009). Shimamura e colaboradores (2007) ressaltam que a ação antimicrobiana das catequinas advém do seu efeito sobre as proteínas das células do patógeno: ao ligarem-se a estas,

causam sua precipitação e, conseqüentemente, danificam a parede celular e interferem na sua biossíntese. Estes mesmos autores sugerem que este princípio ativo pode ser eficaz contra as infecções de trato digestivo ou pele (SHIMAMURA; ZHAO;HU, 2007). Outro composto encontrado na *E. dysenterica*, a epicatequina, também possui propriedade antimicrobiana (YALTIRAK *et al.*, 2009; TAYLOR, P. W., 2013).

Os flavonoides presentes em própolis, quercetina e narigenina, afetam as funções bioenergéticas de bactérias como *S. aureus* (MIRZOEVA; GRISHANIN;CALDER, 1997). Outros estudos com própolis também demonstram que este possui atividade biológica contra *S. aureus*, a qual é atribuída principalmente aos flavonoides (BANSKOTA; TEZUKA;KADOTA, 2001; MARCUCCI *et al.*, 2001; STEPANOVIĆ *et al.*, 2003; CUSHNIE;LAMB, 2005; LU; CHEN;CHOU, 2005; CUSHNIE;LAMB, 2011), ação semelhante à encontrada neste estudo.

O extrato bruto aquoso e as frações de *E. dysenterica* apresentaram efeito antimicrobiano em diferentes perfis de cepas de *S. aureus*, como cepas produtoras de enterotoxinas e coagulase. Corroborando estes achados, duas revisões atuais relatam que flavonoides, como as catequinas, podem exercer efeitos antibacterianos satisfatórios em doenças gastrointestinais causadas por bactérias toxigênicas, tanto em humanos como em outros animais (FRIEDMAN, 2007; CUSHNIE;LAMB, 2011; DAGLIA, 2012). Doenças do trato gastrointestinal são causadas por diversos microorganismos, incluindo bactérias veiculadas por alimentos e água, e são comumente provocadas por toxinas pirogênicas e eméticas como as provindas de *S. aureus*, (NORMANNO *et al.*, 2007; TAYLOR, P. L.;WRIGHT, 2008), *E. coli* e *P. aeruginosa* (AHMED *et al.*, 2012).

As gastroenterites estafilocócicas, condições infecciosas causadas por enterotoxinas termoestáveis produzidas por *S. aureus* coagulase-positivo, afetam indiretamente os homens por meio de acometimento do gado e contaminação de produtos lácteos ou outros alimentos com cepas com alta capacidade toxigênica (FAGUNDES;OLIVEIRA, 2004; NORMANNO *et al.*, 2005; TAYLOR, P. L.;WRIGHT, 2008; NUNES; ARRAIS DE ALENCAR MOTA;CALDAS, 2013). Este agente patogênico é responsável pela maioria das intoxicações alimentares e tem propensão para causar choque tóxico (FAGUNDES;OLIVEIRA, 2004; KUMAR; ABBAS;FAUSTO, 2005). Fato que chama a atenção pela virulência deste microorganismo e pela possibilidade de carrear resistência aos antimicrobianos.

Portanto, a *E. dysenterica* demonstrou potenciais efeitos antimicrobianos *in vitro* em cepas de *S. aureus* de relevância médica, evidenciando que a espécie pode ser uma promissora fonte de agente antimicrobiano. Além disso, possui prerrogativas que lhe são facultadas na literatura científica com relação a atividades antioxidante (ROESLER *et al.*, 2007; GENOVESE *et al.*, 2008), laxativa (LIMA *et al.*, 2010), fungicida (COSTA *et al.*, 2000; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011) e antiviral (CECÍLIO *et al.*, 2012).

Assim, postula-se que o mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana encontrada em *E. dysenterica* atua em nível da parede celular, afetando a estrutura e a integralidade da mesma, ou interfere em processos essenciais à sobrevivência do micro-organismo, conforme sugerido em estudo prévio (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Quanto à avaliação da ação moduladora *in vitro* da combinação de fração acetônica de *E. dysenterica* com os agentes antimicrobianos ampicilina e oxacilina, foi demonstrado que houve efeito sinérgico em *S. aureus*. A CIM dos antibióticos β -lactâmicos foi diminuída em duas diluições seriadas, mostrando ação com sub-CIM (0,25 X CIM) para a cepa 29213 (Tabela 8) e o ICIF encontrado foi ≤ 5 .

TABELA 8- Avaliação da atividade moduladora na cepa *S. aureus* 29213

Concentração Inibitória Mínima - CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
AMP	AMP+ FA	OXA	OXA + FA
128	32	256	64

Essa observação corrobora com inúmeros estudos que reportam que extratos contendo catequinas apresentam ação sinérgica com antibióticos β -lactâmicos (ZHAO *et al.*, 2001; STAPLETON *et al.*, 2004; TAYLOR, P. W.; HAMILTON-MILLER; STAPLETON, 2005; FRIEDMAN, 2007; CHO; SCHILLER; OH, 2008; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; WAGNER, HILDEBERT, 2011; ANDERSON *et al.*, 2012). Possivelmente, este fato pode ser atribuído às várias maneiras com que flavonoides agem modulando a resistência dos patógenos aos antimicrobianos, por exemplo, via inibição da expressão da proteína ligante de penicilina 2a (PBP2a), fazendo com que os agentes tenham maior afinidade com a parede celular após a ligação destes compostos com peptidoglicano (STAPLETON *et al.*, 2007).

Estudos apontam que a capacidade antimicrobiana dos flavonoides pode ser atribuída a vários mecanismos: lesões causadas à parede celular; supressão de fatores de virulência bacteriana, como a inibição de enzima coagulase; redução da secreção ou neutralização de toxinas, inclusive termorresistentes (HISANO *et al.*, 2003; FRIEDMAN, 2007); inibição da formação de biofilme (STAPLETON *et al.*, 2007); ação sobre mecanismos de resistência, como bloqueio de bomba de efluxo (WAGNER, HILDEBERT, 2011) e inibição de β -lactamases (ZHAO *et al.*, 2001; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008); e sinergismo com agentes antimicrobianos ao modularem a ação destes (CUSHNIE; LAMB, 2011; ANDERSON *et al.*, 2012; DAGLIA, 2012). Estas evidências demonstram as promissoras possibilidades de aplicação dos metabólitos secundários em combinação com antibióticos para o tratamento de doenças infecciosas em seres vivos (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

O presente estudo confirma o potencial de ação antimicrobiano de mais uma espécie do gênero *Eugenia*, a *E. dysenterica*, frente a cepas Gram-positivas. Esta ação provavelmente decorre da presença de catequinas. Esses dados corroboram o seu papel etnofarmacológico e, em algum grau, valida o seu uso tradicional. Desta forma, este estudo reafirma que podem ocorrer novas descobertas de princípios ativos presentes nas plantas.

5.3 AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA DA *EUGENIA DYSENTERICA*

Para identificar os metabólitos secundários presentes em *E. dysenterica*, estabeleceu-se o padrão de combinação de taxonomia, cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta performance (CLAE-DAD).

A análise da cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato aquoso e das frações de *E. dysenterica*, revelada sob luz ultravioleta (luz UV), mostrou a existência de flavonoide pela fluorescência (Figura 8A) e pela ação dos reveladores (Figura 8B) (PETERSON; DWYER, 1998; SIMÕES *et al.*, 2002). O extrato aquoso cru e as frações foram testados em comparação com diferentes padrões comerciais de metabólitos secundários para determinar a presença do composto ativo. Foi possível detectar por CCD que, na espécie *E. dysenterica*, os compostos majoritários

encontrados nas amostras foram catequina e epicatequina, sendo reafirmada esta informação pela análise por CLAE-DAD.

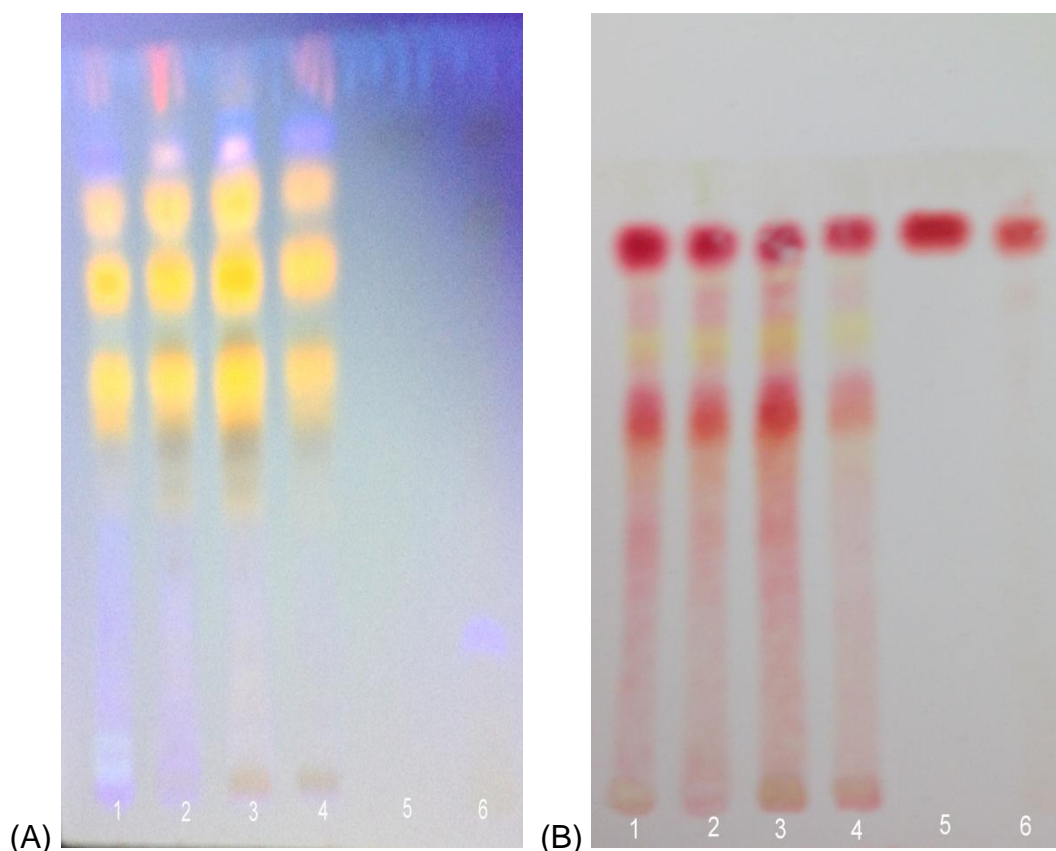


Figura 8- Perfil da CCD de *Eugenia dysenterica*

A: Fluorescência sob luz UV de extrato aquoso bruto (1), fração acetônica (2), fração metanólica (3) e fração isopropanólica (4) comparados aos padrões de catequina (5) e epicatequina (6);

B: Revelação com solução de Vanilina/Ácido para o extrato aquoso bruto (1), fração acetônica (2), fração metanólica (3) e fração isopropanólica (4) comparados aos padrões de catequina (5) e epicatequina (6).

A investigação de metabólitos secundários de plantas foi aprofundada com o auxílio da CLAE-DAD, a qual fornece com acurácia informações sobre as classes de produtos químicos presentes (SPRINGFIELD; EAGLES; SCOTT, 2005).

Nas análises com CLAE, a presença de flavonoides inicialmente verificada por CCD foi confirmada por meio de comparação dos tempos de retenção de compostos autênticos e da fração acetônica de *E. dysenterica*. Na fração acetônica, foram identificados por CLAE catequina (14') e epicatequina (18') (Figura 9), compostos estes reconhecidamente bioativos (COWAN, 1999; MACHADO *et al.*, 2008).

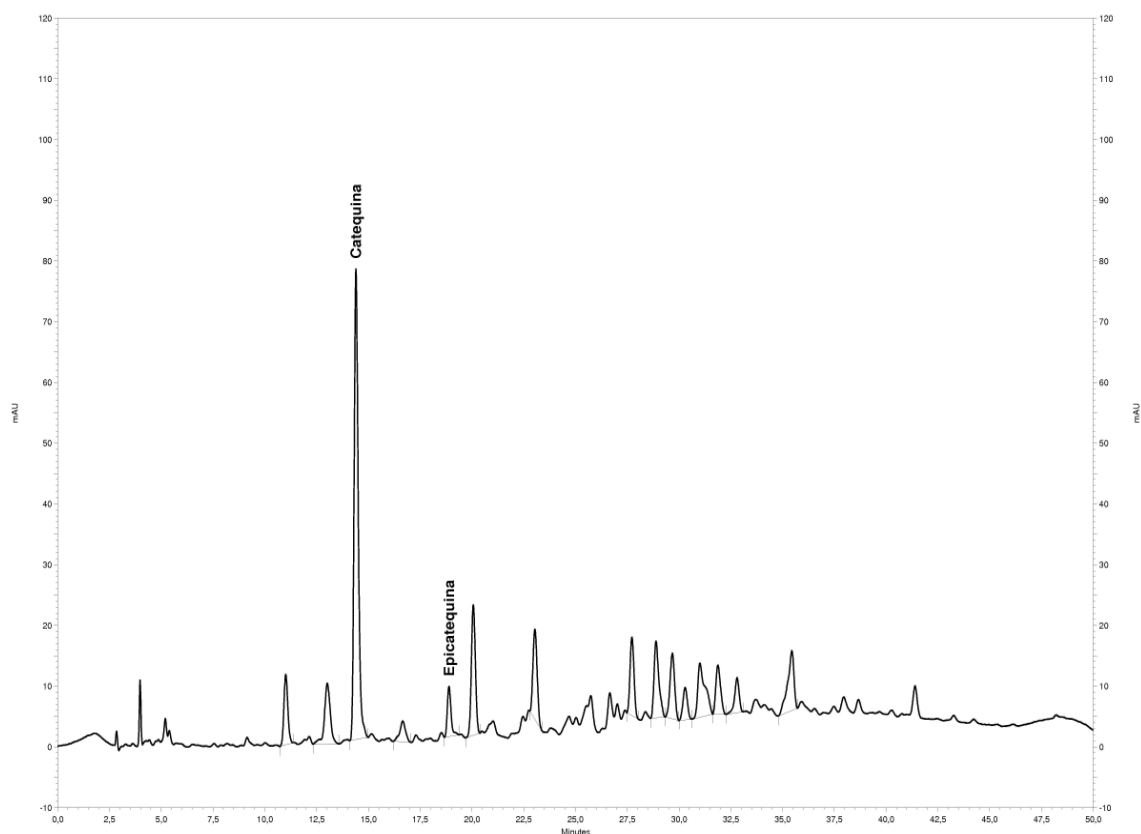


FIGURA 9- Perfil cromatográfico da fração acetônica de *Eugenia dysenterica*

Similarmente a estes resultados, estudo usando o método de CLAE com inúmeras espécies da família Myrtaceae endêmicas da África, incluindo espécies do gênero *Eugenia*, demonstrou que todas as espécies analisadas contêm catequinas. Destacaram-se *Eugenia orbiculata* e *Eugenia tinifolia*, que apresentaram os mais altos níveis deste metabólito, respectivamente. Esta última, além do referido composto, também possui epicatequinas, assim como a espécie *E. dysenterica* estudada (NEERGHEEN *et al.*, 2006). Em outro estudo recente, *Eugenia pollicina*, também originária do referido continente, demonstrou conter catequina (RAMFUL *et al.*, 2011).

Outra espécie, a *E. uniflora*, é constituída de compostos como taninos, flavonoides (AURICCHIO; BARROS; BACCHI, 2007), terpenos, saponinas e cumarinas (CECÍLIO *et al.*, 2012).

Em relação à composição fitoquímica, estudos anteriores revelaram a presença de importantes moléculas bioativas na espécie *E. dysenterica*, conforme relacionados na Tabela 9.

TABELA 9- Composição fitoquímica de *Eugenia dysenterica*

Compostos	Parte vegetal	Referências
Sesquiterpenos, monoterpenos, β -cariofileno, α -humuleno, α -Copaeno, δ -cadineno	Folhas (óleo essencial)	(VILELA <i>et al.</i> , 2012).
Compostos fenólicos: flavonoides, taninos, saponinas e terpenos	Folhas	(VIEIRA <i>et al.</i> , 2012).
Flavonoides, saponinas, terpenos e taninos	Folhas (extrato etanólico)	(CECÍLIO <i>et al.</i> , 2012).
Carotenoides, Vitamina C, folato, proteína, lipídios, carboidratos e fibras	Polpa	(CARDOSO <i>et al.</i> , 2011).
Cariofileno e <i>trans</i> -cariofileno	Folhas	(ALVES, M. M. <i>et al.</i> , 2011).
Campferol, quercetina e ácido elágico	Polpa	(DE SOUZA; LAJOLO;GENOVESE, 2010).
Sesquiterpenos	Folhas (óleo essencial)	(DUARTE, A. R. <i>et al.</i> , 2010).
Fenóis	Sementes (extrato etanólico)	(ROESLER; LORENCINI;PASTORE, 2010).
Cariofileno	Folhas	(DUARTE, A. R. <i>et al.</i> , 2009).
Sesquiterpenos, β -cariofileno, α -humuleno, limoneno, α -tujeno, sabineno e α -terpineol	Folhas (óleo essencial)	(COSTA <i>et al.</i> , 2000).

Uma revisão recente sobre a composição química do óleo essencial de folhas de espécies da família Myrtaceae reporta que, no gênero *Eugenia*, há uma enorme diversidade química, predominando o β -cariofileno (STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011), composto também relatado como prevalente em *E. dysenterica* (COSTA *et al.*, 2000; DUARTE, A. R. *et al.*, 2009; ALVES, M. M. *et al.*, 2011; STEFANELLO; PASCOAL; SALVADOR, 2011).

De acordo com estudos prévios sobre a constituição química da *E. dysenterica*, nesta espécie figuram compostos fenólicos como flavonoides, taninos, saponinas, E terpenos (COSTA *et al.*, 2000; DO COUTO *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2011), cujas ações biológica e terapêutica são reconhecidas (COWAN, 1999).

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DOS AGENTES ANTIMICROBIANOS E DOS SOLVENTES

A resposta inibitória das substâncias puras utilizadas como controle positivo na técnica de difusão em disco revelou que a linhagem padrão de *S. aureus* 25923 foi sensível a ampicilina (Tabelas 10).

Embora as substâncias utilizadas como controle positivo tenham apresentado halos de inibição superiores aos gerados pelos compostos vegetais, os resultados apresentados são considerados potenciais, uma vez que os fármacos controle tratam-se de moléculas isoladas e os extratos são complexos de princípios ativos (COWAN, 1999). Quanto à ocorrência de ampla variação no padrão de sensibilidade aos antimicrobianos, esta resposta é esperada até mesmo entre cepas da mesma espécie (GOODMAN; GILMAN, 2010), para substâncias puras (BASILE *et al.*, 2000) ou compostos vegetais (BURT, 2004; FRIEDMAN, 2007).

TABELA 10- Medidas de diâmetro em (mm) dos halos de inibição de crescimento bacteriano obtidas por difusão em disco utilizando substâncias puras em cepas de bactérias ATCC

Micro-organismos	Ampicilina 10µg/disco	Amoxicilina 10µg/disco
<i>E. coli</i> - 25922	18	-
<i>P. aeruginosa</i> - 27853	NE	-
<i>S. aureus</i> - 25923	50	40
<i>S. aureus</i> - 29213	22	16
<i>S. aureus</i> - 12692	54	45
<i>S. aureus</i> - 6538	50	45
<i>S. aureus</i> - 27154	45	40
<i>S. aureus</i> - 10390	17	15
<i>S. aureus</i> - 12598	45	40
<i>S. aureus</i> - 29737	45	35
<i>S. aureus</i> - 25904	20	20

(-) = não utilizado; NE= não efetivo

Em relação às substâncias puras utilizadas como controle positivo no método de microdiluição em caldo, mostrou-se que a cepa padrão 29213 não foi sensível à oxacilina (Tabela 11), pois apresentou CIM $\geq 4\mu\text{g/mL}$, maior do que o estipulado pela norma do CLSI (CLSI, 2005, 2007). Além disso, a cepa 29213 foi previamente citada como resistente a oxacilina (STAPLETON *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2009).

TABELA 11- Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL das substâncias puras em cepas de bactérias ATCC pelo método de microdiluição em caldo

Micro-organismos	Ampicilina	Oxacilina
<i>S. aureus</i> - 25923	0,12	-
<i>S. aureus</i> - 29213	128,0	256,0
<i>S. aureus</i> - 12692	0,12	-
<i>S. aureus</i> - 6538	0,25	-
<i>S. aureus</i> - 27154	0,12	-
<i>S. aureus</i> - 10390	2,0	64,0
<i>S. aureus</i> - 12598	0,12	-
<i>S. aureus</i> - 29737	0,25	-
<i>S. aureus</i> - 25904	8,0	-

(-) = não utilizado

Os solventes etanol, hexano, DMSO e água, usados na diluição de extratos vegetais e respectivas frações, não influenciaram no crescimento dos microorganismos nos testes de inibição microbiana, o que determina que eles não interferiram no potencial de resposta dos compostos testados. Todavia, a atividade antimicrobiana das frações e dos extratos foi dependente da concentração e do tipo de solvente utilizado na extração, possivelmente em função da polaridade dos solventes. Por exemplo, o metanol é relatado como um bom solvente para extração de compostos fenólicos de frutos de *E. dysenterica* (ROCHA *et al.*, 2011), assim como a acetona (PERUMAL SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2010). De acordo com Simões e colaboradores (2002), solventes com maior polaridade - metanol, água e acetona - são eficientes na extração de flavonoides como catequinas (SIMÕES *et al.*, 2002).

5.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para prever a segurança *in vitro* do extrato aquoso e da fração acetônica de *E. dysenterica*. O bioensaio avaliou os efeitos da exposição de linhagens de células HaCat (queratinócito de pele humana) e L-929 (fibroblasto de camundongo) ao complexo advindo da espécie, quanto à sua capacidade de interferir na viabilidade celular. Observou-se que as amostras avaliadas comportaram-se como tóxicas para ambas as células na concentração de 500µg/mL (Figura 10 A e B). As concentrações de 83 e 167µg/mL de ambos os compostos, capazes de inibir cepas Gram-positivas, foram avaliadas quanto à sua afinidade com células que compõem o tecido cutâneo. Então, a concentração de 167µg/mL foi tóxica para queratinócitos (HaCat), mas não para fibroblastos (L-929); enquanto que a concentração de 83µg/mL causou leve toxicidade para a linhagem de queratinócitos, com uma variação entre 87 e 89% de células viáveis, e ação não tóxica para fibroblastos, propiciando até uma leve proliferação destas células.

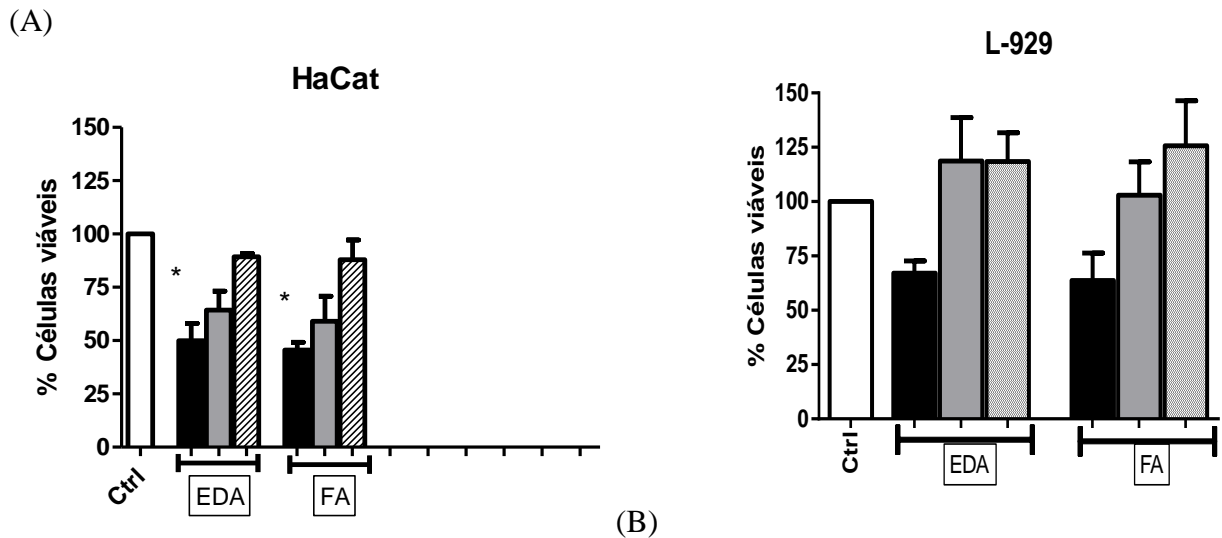


Figura 10- Perfil de efeito citotóxico de extrato aquoso bruto (EDA) e fração acetônica (FA) de *Eugenia dysenterica* em linhagens (A) HaCat (queratinócito) e (B) L-929 (fibroblasto)

Esta avaliação preliminar é recomendada para evitar que uma possível citotoxicidade seja interpretada como eficácia antimicrobiana (KUETE, 2010), além disso, é uma ferramenta útil para prever os efeitos da exposição ao uso empírico de extratos de plantas.

Os resultados obtidos corroboram um estudo que mostrou que o extrato aquoso de folhas da espécie *E. dysenterica* não foi tóxico frente a linhagens semelhantes às que foram avaliadas neste ensaio, propondo que compostos advindos desta espécie podem constituir formulações tópicas (SOUZA *et al.*, 2012).

Outro estudo avaliou a citotoxicidade do extrato etanólico de folhas de *E. dysenterica*, o qual comportou-se como atóxico para uma linhagem de células de rim de macacos (MA-104) até uma concentração de 500µg/mL, enquanto que o extrato etanólico de folhas de *E. uniflora* foi tóxico com uma concentração similar (CECÍLIO *et al.*, 2012).

Em geral, espécies de gênero *Eugenia* não demonstraram toxicidade aguda em estudos com *E. uniflora* (AURICCHIO; BARROS; BACCHI, 2007; KOUIDHI; ZMANTAR; BAKHROUF, 2010) e extratos de semente (ROESLER; LORENCINI; PASTORE, 2010) e óleo essencial de cagaita (VICTORIA *et al.*, 2012).

Lima e colaboradores (2011) analisaram o comportamento *in vivo* da cagaita, encontrando que o extrato etanólico e a infusão de folhas de *E. dysenterica* foram tóxicos aos animais (LIMA *et al.*, 2011). Por outro lado, um peptídeo isolado dos frutos de *E. dysenterica* é um eficaz laxante e não citotóxico (LIMA *et al.*, 2010; VILELA *et al.*, 2012). Em estudo *in vivo* recente, o extrato etanólico de folhas de *E.*

dysenterica exibiu atividade genotóxica e citotóxica com altas doses (VIEIRA *et al.*, 2012).

Estas observações corroboram o presente estudo e a expressiva contribuição de comprovações científicas para o desvelamento dos constituintes metabólicos de plantas com funções curativas, bem como elucidam possíveis ações nocivas.

Neste estudo mostrou-se que *E. dysenterica* potencialmente inibiu inúmeras cepas de *S. aureus*, podendo contribuir para o desenvolvimento de um fitoterápico para doenças infecciosas de relevância para a saúde pública. As análises demonstraram que o extrato aquoso e as frações de folhas de *E. dysenterica* têm compostos, como catequina e epicatequina, capazes de inibir, sem citotoxicidade aguda, o crescimento de micro-organismos que causam gastroenterites e doenças de pele. Por esta razão, as folhas de *E. dysenterica* representam uma alternativa interessante para combater doenças infecciosas causadas por *S. aureus*. Portanto, constitui fonte potencial para o desenvolvimento de antimicrobianos, assim como para pomadas, pastas de dente, enxaguatórios bucais dentre outras formulações que promovam ação antisséptica tópica.

É pertinente ressaltar a urgente necessidade de preservação do bioma Cerrado para o equilíbrio das interações, pois a pressão antrópica sobre este bioma tem contribuído para um acelerado processo de exaustão deste patrimônio natural. No caso da *Eugenia dysenterica*, a propagação desta espécie dá-se em função da polinização por abelhas, as quais estão em vias de extinção, e da coleta dos frutos pela população da região, sem retorno apropriado das sementes à natureza, concorrendo para a minimização da população de indivíduos desta espécie. Assim, é oportuno aventar ao Ministério da Saúde a estruturação de uma monografia da *Eugenia dysenterica*, uma vez que apesar de apresentar virtuosas faculdades biológicas, encontra-se em condições desfavoráveis de conservação da espécie.

6 CONCLUSÃO

O presente biomonitoramento mostrou que, das sete espécies avaliadas - *Erythroxylum subrotundum*, *Erythroxylum daphynites*, *Bauhinia variegata*, *Bauhinia rufa*, *Pouteria torta*, *Pouteria ramiflora* e *Eugenia dysenterica* - aquela que demonstrou uma performance considerável aos padrões de potencial atividade antimicrobiana foi a espécie da família Myrtaceae, a *E. dysenterica*.

Os resultados encontrados com a fração acetônica de *E. dysenterica* fornecem perspectivas encorajadoras sobre o seu potencial efeito antibacteriano em bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus*, incluindo as cepas de *S. aureus* produtora de β -lactamase (ATCC 29213), enterotoxigênica (ATCC 27154), coagulase positiva (ATCC 10390) e isolada em caso de artrite séptica (ATCC 12598). Esta fração inibiu a cepa de *S. aureus* produtora de β -lactamase (ATCC 29213) com uma concentração inibitória mínima potencialmente positiva e as demais cepas, incluindo a estirpe enterotoxigênica (ATCC 27154), com uma CIM moderada.

A *E. dysenterica* apresentou os metabólitos secundários ativos catequina e epicatequina, os quais possuem considerável ação para bactérias Gram-positivas do gênero *Staphylococcus*.

Este trabalho representa o primeiro relato na literatura da presença de catequinas no extrato aquoso de *E. dysenterica*, correlacionando-a à atividade antibacteriana em *S. aureus*. É importante ressaltar que o extrato aquoso bruto e a fração acetônica de *E. dysenterica* não apresentaram citotoxicidade contra queratinócitos e fibroblastos na concentração inibitória mínima encontrada.

Considerando os resultados obtidos, *E. dysenterica* é uma espécie promissora como insumo genuinamente nacional, oriundo do Cerrado, para o desenvolvimento de fitoterápicos a cosméticos.

REFERÊNCIAS

- ABAD, J. M.; BEDOYA, L. M.; APAZA, L.; BERMEJO, P. **Anti-Infective Flavonoids: An Overview in Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**. Singapura: World Scientific. 2012. 443-474 p.
- AGUIAR, J. S.; ARAÚJO, R. O.; DO DESTERRO RODRIGUES, M.; SENA, K. X.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Extract, Fractions and Isolated Compounds from the Stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 4, p. 4124-4140, 2012.
- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C.; NASCIMENTO, S. C.; SENA, K. X. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436-440, 2008.
- AGYARE, C.; BEMPAH, S. B.; BOAKYE, Y. D.; AYANDE, P. G.; ADARKWA-YIADOM, M.; MENSAH, K. B. Evaluation of Antimicrobial and Wound Healing Potential of *Justicia flava* and *Lannea welwitschii*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v., n., p. 10, 2013.
- AHMED, A. S.; ELGORASHI, E. E.; MOODLEY, N.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. The antimicrobial, antioxidative, antiinflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 826-839, 2012.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento Alimentar de Espécies Nativas dos Cerrados: Araticum, Barú, Cagaita e Jatobá**. 2ª. Planaltina-DF: EMBRAPA-CPAC. 1990.
- ALONSO, A. A.; MACHADO, S. R. Stem protective tissue in *Erythroxylum tortuosum* (Erythroxylaceae), a fire tolerant species from cerrado. **IAWA journal**, v. 29, n. 1, p. 69-77, 2008.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ALVES, M. M.; SOARES PEREIRA, A. M.; PEREIRA, P. S.; CASTRO FRANÇA, S.; BERTONI, B. W. Caracterização química qualitativa de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada comparativa. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, p. 1-8, 2011.

- ALVES, T. M. D. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. D. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- AMORIM, A.; LIMA, C.; HOVELL, A.; MIRANDA, A.; REZENDE, C. Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L.(Brazilian Pitanga). **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 16, n. 10, p. 923-928, 2009.
- ANDERSON, M. J.; LIN, Y.-C.; GILLMAN, A. N.; PARKS, P. J.; SCHLIEVERT, P. M.; PETERSON, M. L. Alpha-toxin promotes *Staphylococcus aureus* mucosal biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 64, p. 1-10, 2012.
- AULTON, M. M. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.
- AURICCHIO, M. T.; BARROS, S. B.; BACCHI, E. M. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 76-81, 2007.
- BAG, A.; BHATTACHARYYA, S. K.; PAL, N. K.; CHATTOPADHYAY, R. R. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, v. 167, n. 6, p. 352-357, 2012.
- BANDYOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, T. K.; DASGUPTA, A.; LOURDURAJA, J.; DASTIDAR, S. G. In vitro and in vivo antimicrobial action of tea: the commonest beverage of Asia. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 11, p. 2125-2127, 2005.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.
- BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRARA, S.; MONTESANO, D.; CASTALDO COBIANCHI, R.; VUOTTO, M.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. S110-S116, 2000.
- BASSETTI, M.; NICCO, E.; MIKULSKA, M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it change clinical practice? **International journal of antimicrobial agents**, v. 34, n. 1, p. S15-S19, 2009.

- BASSETTI, M.; RIGHI, E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? **ASH Education Program Book**, v. 2013, n. 1, p. 428-432, 2013.
- BASSO, L. A.; SILVA, L. H. P. D.; FETT-NETO, A. G.; AZEVEDO JUNIOR, W. F. D.; MOREIRA, Í. D. S.; PALMA, M. S.; CALIXTO, J. B.; ASTOLFI FILHO, S.; SANTOS, R. R. D.; SOARES, M. B. P. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 475-506, 2005.
- BAUER, A.; KIRBY, W.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493, 1966.
- BERENBAUM, M. C. What is synergy? **Pharmacological Reviews**, v. 41, n. 2, p. 93-141, 1989.
- BERTUCCI, A.; OLIVARO, C.; SILVA, P. A. D.; RAMOS, D.; CERDEIRAS, M. P.; VÁZQUEZ, A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 20-25, 2009.
- BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E.; RUDAN, I.; BASSANI, D. G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C. F. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v. 375, n. 9730, p. 1969-1987, 2010.
- BOHM, B.; LOO, T.; NICHOLLS, K.; PLOWMAN, T. Flavonoid variation in *Erythroxylum*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 3, p. 833-837, 1988.
- BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. Minnesota. 2001.
- BOLETI, A.; FREIRE, M.; COELHO, M.; SILVA, W.; BALDASSO, P.; GOMES, V.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.; MACEDO, M. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2653-2658, 2007.
- BONAPACE, C. R.; BOSSO, J. A.; FRIEDRICH, L. V.; WHITE, R. L. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 44, n. 4, p. 363-366, 2002.
- BONAPACE, C. R.; WHITE, R. L.; FRIEDRICH, L. V.; BOSSO, J. A. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii* a comparison with Etest, time-kill,

and checkerboard methods. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 38, n. 1, p. 43-50, 2000.

BRANDÃO, M. D. G. L. **Auguste de Saint-Hilaire Quadro Geográfico da Vegetação Primitiva na Província de Minas Gerais**. Belo Horizonte - MG, Brasil: Fino Traço. 2011. 56 p.

BRASIL. **Dispõe sobre o REGULAMENTO TÉCNICO DE ESPÉCIES VEGETAIS PARA O PREPARO DE CHÁS**. RDC nº 267 (23 de setembro de 2005). D.O.U. Brasília: Anvisa 7p. 2005.

_____. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. M. D. SAÚDE. Brasília-DF. bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos 2006.

_____. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Disponível em: http://www.mda.gov.br/.../Programa_Nacional_de_Plantas_Medicinais_e_Fitot 2009.

_____. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. RDC nº 14 (31 de março de 2010). D.O.U. Brasília: Anvisa: 6 p. 2010a.

_____. **Farmacopeia Brasileira**. V.2 - Monografias. Brasília: 549-899 p. 2010b.

_____. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isolados ou em associação**. Resolução nº20 (09 de maio de 2011). D.O.U. Brasília: Anvisa: . Brasília: 39-41 p. 2011.

_____. **Indicadores e Dados Básicos sobre Saúde - IBD 2012 (23 de dezembro de 2012)**. Ministério da Saúde: Departamento de Informática do SUS. Brasília: DATASUS. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0201>. Brasília, 2012.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo -Santos: Santos. 2010. 416 p.

BRIJESH, S.; DASWANI, P.; TETALI, P.; ROJATKAR, S.; ANTIA, N.; BIRDI, T. Studies on *Pongamia pinnata* (L.) Pierre leaves: understanding the mechanism (s) of action in infectious diarrhea. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 7, n. 8, p. 665-674, 2006.

BRUSTEIN, V.; SOUZA-ARAÚJO, F.; VAZ, A.; ARAÚJO, R.; PAIVA, P.; COELHO, L.; CARNEIRO-LEÃO, A.; TEIXEIRA, J.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.; CORREIA,

- M. A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. **Inflammopharmacology**, v. 20, n. 6, p. 315-322, 2012.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BURTON, D. C.; EDWARDS, J. R.; HORAN, T. C.; JERNIGAN, J. A.; FRIDKIN, S. K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* central line-associated bloodstream infections in US intensive care units, 1997-2007. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 301, n. 7, p. 727-736, 2009.
- CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 79-99, 2006.
- CARDOSO, L. D. M.; MARTINO, H. S. D.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2151-2154, 2011.
- CARVALHO, A. C.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.
- CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. D. S. G.; BARATELLI, T. D. G.; MAHMUD, N. S.; SHUQAIRA, S. A. Q.; NETO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v., n. 11, p. 26-32, 2007.
- CECÍLIO, A. B.; FARIA, D. B. D.; OLIVEIRA, P. D. C.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, D. A. D.; SOBRAL, M. E. G.; DUARTE, M. G. R.; MOREIRA, C. P. D. S.; SILVA, C. G.; ALMEIDA, V. L. D. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975-981, 2012.
- CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A. B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 6, p. 501-506, 2007.
- CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 178-182, 2001.
- CHAVES, C.; SCHAPOVAL, E.; ZUANAZZI, J.; DIEHL, E.; DE SIQUEIRA, N.; HENRIQUES, A. *Erythroxylum argentinum*: assays for anti-inflammatory activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 117, 1988.

CHEVALLIER, A. **The Encyclopedia of Medicinal Plants**. United States: DK. 1996.

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; GOH, J. K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 12, 2011.

CHIN, Y.-W.; JONES, W. P.; WAYBRIGHT, T. J.; MCCLOUD, T. G.; RASOANAIVO, P.; CRAGG, G. M.; CASSADY, J. M.; KINGHORN, A. D. Tropane Aromatic Ester Alkaloids from a Large-Scale Re-collection of *Erythroxylum p ervillei* Stem Bark Obtained in Madagascar. **Journal of natural products**, v. 69, n. 3, p. 414-417, 2006.

CHO, Y.-S.; SCHILLER, N. L.; OH, K.-H. Antibacterial effects of green tea polyphenols on clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Current microbiology**, v. 57, n. 6, p. 542-546, 2008.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

CLSI, C. A. L. S. I. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteen Information Supplement. CLSI document M100-S15**. Waine, Pensilvânia - USA, 2005.

_____. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Information Supplement**. Waine, Pensilvânia-USA 2007.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877-886, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COOK, N.; SAMMAN, S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

- COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.
- COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. L.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H.; SILVA, M. D. R. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1, p. 111-117, 2000.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CUSHNIE, T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- _____. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.
- DA SILVA, K. L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.
- DE SOUZA, S. G. A.; LAJOLO, F.; GENOVESE, M. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of Brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 8, p. 4666, 2010.
- DEWICK, P. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2^a ed. Chichester-UK: John Wiley & Sons. 2002.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3^a. Chichester-UK: Wiley. 2011.
- DIAB, Y.; ATALLA, K.; ELBANNA, K. Antimicrobial screening of some Egyptian plants and active flavones from *Lagerstroemia indica* leaves. **Drug discoveries & therapeutics**, v. 6, n. 4, p. 212, 2012.
- DIAS, D. A. I.; ARRUÁ, R. D. L. **Catálogo Ilustrado de 80 Plantas Medicinais do Paraguai**. Faculdade de Ciências Químicas - UNA & Agência de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 2011.

- DJIPA, C. D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 307-313, 2000.
- DO COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; DE PAULA, J. R. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PÓ DAS FOLHAS DE EUGENIA DYSENTERICA DC.(MYRTACEAE). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 3, p. 59-69, 2009.
- DORMAN, H.; DEANS, S. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 8, p. 747-753, 2004.
- DUARTE, A. R.; NAVES, R. R.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Seasonal influence on the essential oil variability of *Eugenia dysenterica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 967-974, 2009.
- DUARTE, A. R.; NAVES, R. R.; SANTOS, S. C.; SERAPHINC, J. C.; FERRI, P. H. Genetic and environmental influence on essential oil composition of *Eugenia dysenterica*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 8, p. 1459-1467, 2010.
- DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.
- DUGASANI, S.; BALIJEPALLI, M. K.; TANDRA, S.; PICHKA, M. R. Antimicrobial activity of *Bauhinia tomentosa* and *Bauhinia vahlii* roots. **Pharmacognosy magazine**, v. 6, n. 23, p. 204, 2010.
- EL-IMAM, Y.; EVANS, W.; PLOWMAN, T. Alkaloids of some south american erythroxyllum species. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2285-2289, 1985.
- EL-IMAM, Y.; EVANS, W. C.; GROUT, R. J. Alkaloids of *Erythroxyllum cuneatum*, *E. ecarinatum* and *E. australe*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2181-2184, 1988.
- ELOFF, J. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta medica**, v. 64, n. 08, p. 711-713, 1998a.

- _____. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 1998b.
- EMPINOTTI, J. C.; UYEDA, H.; RUARO, R. T.; GALHARDO, A. P.; BONATTO, D. C. Pyodermitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 2, p. 277-284, 2012.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública; *Staphylococcus aureus* intramammary infections and its implications in public health. **Ciência rural**, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.
- FERRAZ, S. T. Promoção da saúde: viagem entre dois paradigmas. **Revista de Administração Pública**, v. 32, n. 2, p. 49-60, 2013.
- FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 7, p. 931-943, 2003.
- FRANCISCO, K. Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 1, n. 4, p. 18-24, 2010.
- FRIEDMAN, M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. **Molecular nutrition & food research**, v. 51, n. 1, p. 116-134, 2007.
- FUNARI, C.; FERRO, V. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178-182, 2005.
- GASPI, F.; FOGLIO, M.; CARVALHO, J.; MORENO, R. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 107, n. 1, p. 19-24, 2006.
- GENERSCH, E. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 87-97, 2010.
- GENOVESE, M.; DA SILVA PINTO, M.; DE SOUZA SCHMIDT GONÇALVES, A.; LAJOLO, F. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v. 14, n. 3, p. 207-214, 2008.
- GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALVES, L. F. **Monografias de Plantas Medicinais Brasileiras e Aclimatadas**. Abifito. Curitiba. 2005.

- GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil medicina**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009. 3458 p.
- GOLDSTEIN, R. E. R.; MICALLEF, S. A.; GIBBS, S. G.; DAVIS, J. A.; HE, X.; GEORGE, A.; KLEINFELTER, L. M.; SCHREIBER, N. A.; MUKHERJEE, S.; SAPKOTA, A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Detected at Four US Wastewater Treatment Plants. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 11, p. 1551-1558, 2012.
- GONZALEZ-GARCIA, K.; GONZALEZ-LAVAUT, J. A.; GONZALEZ-GUEVARA, J.; PRIETO-GONZALEZ, S. Género *Erythroxylum*: análisis de la información científica. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 2, p. 284, 2005.
- GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª. Porto Alegre: Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill. 2010. 1821 p.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- GUPTA, P. M. **Plantas medicinales iberoamericanas**. Colombia, v.158, . 2008. 1003 p.
- HARAGUCHI, L. M. M.; CARVALHO, O. B. D. **Plantas Mediciniais**. 1ª. São Paulo. 2010
- HARBORNE, J. B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 4, p. 335-367, 1999.
- HART, B. L. The evolution of herbal medicine: behavioural perspectives. **Animal Behaviour**, v. 70, n. 5, p. 975-989, 2005.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.
- HIRUMA-LIMA, C.; SANTOS, L.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C.; SILVEIRA, G.; VASCONCELOS, P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 1, p. 207-214, 2006.
- HISANO, M.; YAMAGUCHI, K.; INOUE, Y.; IKEDA, Y.; IJIMA, M.; ADACHI, M.; SHIMAMURA, T. Inhibitory effect of catechin against the superantigen

staphylococcal enterotoxin B (SEB). **Archives of dermatological research**, v. 295, n. 5, p. 183-189, 2003.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. 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.

JIRSCHITZKA, J.; SCHMIDT, G. W.; REICHEL, M.; SCHNEIDER, B.; GERSHENZON, J.; D'AURIA, J. C. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, p. 103-104, 2012.

JOHNSON, M. D.; MACDOUGALL, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PERFECT, J. R.; REX, J. H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

JOLY, B. A. **BOTÂNICA: introdução à taxonomia vegetal**. 12^a ed. São Paulo. 1998.

JORGE, N.; MORENO, D. M.; BERTANHA, B. J. EUGENIA DYSENTERICA DC: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y DETERMINACIÓN DE TOCOFEROLES. **Revista chilena de nutrición**, v. 37, n. 2, p. 208-214, 2010.

JORGE, S. **Plantas Mediciniais: Coletânia dos Saberes**. 2009. 81 p.

JYOTHI, K.; SESHAGIRI, M. In-Vitro Activity of Saponins of Bauhinia Purpurea, Madhuca Longifolia, Celastrus Paniculatus and Semecarpus Anacardium on Selected Oral Pathogens. **Journal of Dentistry (Tehran, Iran)**, v. 9, n. 4, p. 216, 2012.

KAJIYA, K.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T. Effects of external factors on the interaction of tea catechins with lipid bilayers. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 11, p. 2330-2335, 2002.

KARPANEN, T. J.; CONWAY, B. R.; WORTHINGTON, T.; HILTON, A. C.; ELLIOTT, T. S.; LAMBERT, P. A. Enhanced chlorhexidine skin penetration with eucalyptus oil. **Infectious Diseases**, v. 10, n., p. 278, 2010.

KLANČNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERŠEK, B.; MOŽINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of microbiological methods**, v. 81, n. 2, p. 121-126, 2010.

- KOUIDHI, B.; ZMANTAR, T.; BAKHROUF, A. Anticariogenic and cytotoxic activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*) against a large number of oral pathogens. **Annals of microbiology**, v. 60, n. 4, p. 599-604, 2010.
- KRIEF, S.; HLADIK, C. M.; HAXAIRE, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1, p. 1-15, 2005.
- KUETE, V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta medica**, v. 76, n. 14, p. 1479-1491, 2010.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 7^a. Rio de Janeiro. 2005.
- LAI, P.; ROY, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1451-1460, 2004.
- LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.; WATALEB, S.; BOUSAID, M.; BEKKOUCHE, K.; JANA, M. Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 250-252, 2001.
- LIMA, T.; SILVA, O.; OLIVEIRA, J.; VASCONCELOS, I.; SCALABRIN, F.; ROCHA, T.; GROSSI-DE-SÁ, M.; SILVA, L.; GUADAGNIN, R.; QUIRINO, B. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: a novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. **Peptides**, v. 31, n. 8, p. 1426-1433, 2010.
- LIMA, T.; SILVA, O.; SILVA, L.; ROCHA, T.; GROSSI-DE-SÁ, M.; FRANCO, O.; LEONARDECZ, E. In Vivo Effects of Cagaita (*Eugenia dysenterica*, DC.) Leaf Extracts on Diarrhea Treatment. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2011, n., p. 10, 2011.
- LIU, L.; COUSENS, S.; LAWN, J. E.; BLACK, R. E. Global regional and national causes of child mortality—Authors' reply. **The Lancet**, v. 380, n. 9853, p. 1556-1557, 2012.
- LOCHER, C.; BURCH, M.; MOWER, H.; BERESTECKY, J.; DAVIS, H.; VAN POEL, B.; LASURE, A.; VANDEN, B. D.; VLIETINCK, A. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 49, n. 1, p. 23, 1995.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. São Paulo, v.2. 2002.

- LU, L.-C.; CHEN, Y.-W.; CHOU, C.-C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 213-220, 2005.
- LUCAS-FILHO, M. D.; SILVA, G. C. D.; CÔRTEZ, S. D. F.; MARES-GUIA, T. R. D.; PERPÉTTUA FERAZ, V.; SERRA, C. P.; BRAGA, F. C. ACE inhibition by astilbin isolated from *Erythroxylum gonocladum* (Mart.) OE Schulz. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 383-387, 2010.
- LUSA, M. G.; BONA, C. Comparative morphological and anatomical analyses of *Bauhinia forficata* Link and *B. variegata* Linn.(Leguminosae, Caesalpinioideae) leaves. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 196-211, 2009.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. D. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n., p. 33-39, 2008.
- MAGINA, M.; DALMARCO, E.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E.; DALMARCO, J.; PIZZOLATTI, M.; BRIGHENTE, I. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of natural medicines**, v. 63, n. 3, p. 345, 2009.
- MANDALARI, G.; BENNETT, R.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C.; GASSON, M.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2056-2064, 2007.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.; DE CASTRO, S.; DANTAS, A.; VALENTE, P.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.
- MARTINELLI, L. M. B.; BOAS, P. J. F. V.; QUELUZ, T. T.; YOO, H. H. B. Determinantes morfológicos de prognóstico em pneumonia nosocomial: um estudo em autópsias. **J Bras Pneumol**, v. 36, n. 1, p. 51-58, 2010.
- MCPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A.; RABOW, M. W. **CURRENT Medical Diagnosis & Treatment**. 15ª. Rio de Janeiro. 2011.
- MEDEIROS, J. D. D. **Guia de Campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília. 2011.

- MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R. C.; DA SILVA, W. P.; NORA, L.; ROMBALDI, C. V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916-922, 2011.
- MEJÍA, C.; ZURITA, J.; GUZMÁN-BLANCO, M. Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 79-86, 2010.
- MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; DE SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562, 2010.
- MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **RBAC**, v. 39, n. 2, p. 147-150, 2007.
- MENEZES, F. D. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, 2007.
- MIRZOEVA, O.; GRISHANIN, R.; CALDER, P. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.
- MITTERMEIER, R. A.; MYERS, N.; THOMSEN, J. B.; DA FONSECA, G. A.; OLIVIERI, S. Biodiversity hotspots and major tropical wilderness areas: approaches to setting conservation priorities. **Conservation biology**, v. 12, n. 3, p. 516-520, 1998.
- MÖCKEL, N.; GISDER, S.; GENERSCH, E. Horizontal transmission of deformed wing virus: pathological consequences in adult bees (*Apis mellifera*) depend on the transmission route. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 2, p. 370-377, 2011.
- MOGHADAM, M. S.; MALEKI, S.; DARABPOUR, E.; MOTAMEDI, H.; SEYYED NEJAD, S. M. Antibacterial activity of eight Iranian plant extracts against methicillin and cefixime resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 4, p. 262-265, 2010.
- MONTENEGRO, L. H. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVA, L. M.; ROCHA, E. M. M.; BRITO, A. C.; ARAÚJO, R. M.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, R. P. L. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e

anticolinesterásico de Pouteria venosa (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n., p. 611-617, 2006.

MORAN, G. J.; KRISHNADASAN, A.; GORWITZ, R. J.; FOSHEIM, G. E.; MCDOUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; TALAN, D. A. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 7, p. 666-674, 2006.

MOREIRA, D. L.; GUARIM-NETO, G. USOS MÚLTIPLOS DE PLANTAS DO CERRADO: UM ESTUDO ETNOBOTÂNICO NA COMUNIDADE SÍTIO PINDURA, ROSÁRIO OESTE, MATO GROSSO, BRASIL *Polibotânica*, Núm. 27, abril, 2009, pp. 159-190 Instituto Politécnico Nacional México. **Polibotânica**, v., n. 27, p. 159-190, 2009.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 349, n. 9061, p. 1269-1276, 1997.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.; MITTERMEIER, C.; DA FONSECA, G.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NASCIMENTO, E. P. D. Trajetória da sustentabilidade: do ambiental ao social, do social ao econômico. **estudos avançados**, v. 26, n. 74, p. 51-64, 2012.

NCCLS, N. C. F. C. L. S.-. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. Pennsylvania 2003a.

_____. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard**. Pennsylvania 2003b.

NEERGHEEN, V. S.; SOOBRAATTEE, M. A.; BAHORUN, T.; ARUOMA, O. I. Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro. **Journal of plant physiology**, v. 163, n. 8, p. 787-799, 2006.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International journal of food microbiology**, v. 98, n. 1, p. 73-79, 2005.

- NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International journal of food microbiology**, v. 115, n. 3, p. 290-296, 2007.
- NUNES, M. M.; ARRAIS DE ALENCAR MOTA, A. L.; CALDAS, E. D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. **Food Control**, v. 34, n., p. 235-240, 2013.
- ODDS, F. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.
- OLIVEIRA, A. M. D.; HUMBERTO, M. M. D. S.; SILVA, J. M. D.; ROCHA, R. D. F. D. A.; SANT'ANA, A. E. G. Phytochemical studies of the extracts of stem bark and leaves of *Eugenia malaccensis* L.(Myrtaceae) and evaluation of their molluscicidal and larvicidal activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n., p. 618-624, 2006.
- OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n., p. 180-189, 2002.
- OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.
- OLIVEIRA, I. S.; LIMA, J. C.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. 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, 2008.
- OLIVEIRA, M.; PANTOJA, L.; DUARTE, W.; COLLELA, C.; VALARELLI, L.; SCHWAN, R.; DIAS, D. Fruit wine produced from cagaita *Eugenia dysenterica* DC. by both free and immobilised yeast cell fermentation. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2391-2400, 2011.
- OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G.; CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.
- OLIVEIRA, R. D.; DIAS, I.; CÂMARA, C. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco; Comparative study

of the essential oil of *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. from different places of Pernambuco. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

ORHAN, D. D.; ÖZÇELİK, B.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 496-504, 2010.

OZGOVÁ, Š.; HEŘMÁNEK, J.; GUT, I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. **Biochemical pharmacology**, v. 66, n. 7, p. 1127-1137, 2003.

PALHARES, D. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae Jussieu); Pharmacognosy of the leaves of *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae Jussieu). **Lecta-USF**, v. 21, n. 1/2, p. 29-36, 2003.

PANIZZA, S. T.; VEIGA, R. D. S.; DE ALMEIDA, M. C. **Uso Tradicional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. São Luís - MA. 2012.

PEREIRA, I. A.; SOARES, L. C.; COELHO, S. M.; PRIBUL, B. R. Suscetibilidade à azitromicina de isolados bacterianos de processos infecciosos em cães e gatos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 153-156, 2009.

PERFEITO, J.; SANTOS, M. L. D.; LÓPEZ, K.; PAULA, J. E. D.; SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 183-186, 2005.

PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 283-294, 2010.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

POKHREL, N. R.; ADHIKARI, R.; BARAL, M. In-vitro evaluation of the antimicrobial activity of *Bauhinia variegata*, locally known as koiralo. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 69-71, 2002.

- RAMFUL, D.; AUMJAUD, B.; NEERGHEEN, V.; SOBRATTEE, M.; GOOGOLYE, K.; ARUOMA, O.; BAHORUN, T. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract in vitro and in model emulsion systems. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1190-1196, 2011.
- RANG, H.; DALE, M.; RITTER, J.; FLOWER, R. **Farmacologia. Tradução da 6ª edição Americana**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. 2007. 829 p.
- RATNIEKS, F. L.; CARRECK, N. L. Clarity on honey bee collapse? **Science**, v. 327, n. 5962, p. 152-153, 2010.
- RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T.; SANO, S.; ALMEIDA, S. D. Fitofisionomias do bioma Cerrado. **Cerrado: ambiente e flora**, 1998.
- ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B. D.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P. D.; AGOSTINI-COSTA, T. D. S. Total phenolics and condensed tannins in native fruits from Brazilian savanna. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.
- ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 814-821, 2010.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
- ROSS, J. E.; JONES, R. N. Quality control guidelines for susceptibility testing of retapamulin (SB-275833) by reference and standardized methods. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 12, p. 6212-6213, 2005.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo. 2005. 118 p.
- SALGADO, C. D.; FARR, B. M.; CALFEE, D. P. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p. 131-139, 2003.
- SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

- SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.
- SCHÖNING, C.; GISDER, S.; GEISELHARDT, S.; KRETSCHMANN, I.; BIENEFELD, K.; HILKER, M.; GENERSCH, E. Evidence for damage-dependent hygienic behaviour towards *Varroa destructor*-parasitised brood in the western honey bee, *Apis mellifera*. **The Journal of experimental biology**, v. 215, n. 2, p. 264-271, 2012.
- SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; JANSEN, B.; OBST, U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, n. 3, p. 325-335, 2003.
- SERRANO, C.; MATOS, O.; TEIXEIRA, B.; RAMOS, C.; NENG, N.; NOGUEIRA, J.; NUNES, M. L.; MARQUES, A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1554-1560, 2011.
- SHIMAMURA, T.; ZHAO, W.-H.; HU, Z.-Q. Mechanism of action and potential for use of tea catechin as an antiinfective agent. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)**, v. 6, n. 1, p. 57-62, 2007.
- SILVA, C. A.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D. Genus *Pouteria*: chemistry and biological activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 501-509, 2009.
- SILVA JÚNIOR, M. C. D. **100 Árvores do Cerrado: guia de campo**. Brasília. 2005.
- SILVA, R. S.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do Estado de Goiás, Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 330-340, 2001.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed. Porto Alegre/Florianópolis. 2002.
- SMITH-HALL, C.; LARSEN, H. O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n., p. 43, 2012.
- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, 2012.

- SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. D. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n., p. 572-577, 2007.
- SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. D.; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. D. R. R. Antifungal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 247-249, 2002.
- SOUZA, P. M.; ELIAS, S. T.; SIMEONI, L. A.; DE PAULA, J. E.; GOMES, S. M.; GUERRA, E. N.; FONSECA, Y. M.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHAES, P. O. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. 485-489, 2012.
- SPELLBERG, B.; BARTLETT, J.; GILBERT, D. The future of antibiotics and resistance. **The New England journal of medicine**, v. 368, n. 4, p. 299-302, 2013.
- SPRINGFIELD, E.; EAGLES, P.; SCOTT, G. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 75-83, 2005.
- STAPLETON, P. D.; SHAH, S.; EHLERT, K.; HARA, Y.; TAYLOR, P. W. The β -lactam-resistance modifier (-)-epicatechin gallate alters the architecture of the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**, v. 153, n. 7, p. 2093-2103, 2007.
- STAPLETON, P. D.; SHAH, S.; HAMILTON-MILLER, J. M.; HARA, Y.; NAGAOKA, Y.; KUMAGAI, A.; UESATO, S.; TAYLOR, P. W. Anti-*Staphylococcus aureus* activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3- O-acyl-catechins. **International journal of antimicrobial agents**, v. 24, n. 4, p. 374-380, 2004.
- STAPLETON, P. D.; SHAH, S.; HARA, Y.; TAYLOR, P. W. Potentiation of catechin gallate-mediated sensitization of *Staphylococcus aureus* to oxacillin by nongalloylated catechins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 752-755, 2006.
- STARLING, H. M. M.; GERMANO, L. B. D. P.; SCHMIDT, P. **Farmácia Ofício & História**. Belo Horizonte. 2005.
- STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C.; SALVADOR, M. J. Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 1, p. 73-94, 2011.

- STEPANOVIĆ, S.; ANTIĆ, N.; DAKIĆ, I.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, v. 158, n. 4, p. 353-357, 2003.
- STOPPA, M. Estudo comparativo Entre as Metodologias Preconizadas pelo CLSI e pelo Eucast para avaliação da atividade antifúngica. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.
- STOVER, C.; PHAM, X.; ERWIN, A.; MIZOGUCHI, S.; WARRENER, P.; HICKEY, M.; BRINKMAN, F.; HUFNAGLE, W.; KOWALIK, D.; LAGROU, M. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n., p. 959-964, 2000.
- SUGAMOTO, K.; MATSUSITA, Y.-I.; MATSUI, K.; KUROGI, C.; MATSUI, T. Synthesis and antibacterial activity of chalcones bearing prenyl or geranyl groups from *Angelica keiskei*. **Tetrahedron**, v. 67, n. 29, p. 5346-5359, 2011.
- TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 12, p. 1965-1969, 2004.
- TAJKARIMI, M.; IBRAHIM, S.; CLIVER, D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.
- TAYLOR, P. L.; WRIGHT, G. D. Novel approaches to discovery of antibacterial agents. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 02, p. 237-246, 2008.
- TAYLOR, P. W. Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 3, p. 195-201, 2013.
- TAYLOR, P. W.; HAMILTON-MILLER, J. M.; STAPLETON, P. D. Antimicrobial properties of green tea catechins. **Food science and technology bulletin**, v. 2, n., p. 71-81, 2005.
- TOHIDPOUR, A.; SATTARI, M.; OMIDBAIGI, R.; YADEGAR, A.; NAZEMI, J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 142-145, 2010.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª. Porto Alegre. 2005.

- TRAGANTE, C. R.; CECCON, M.; FALCÃO, M. C.; SEITI, M.; SAKITA, N.; VIEIRA, R. A. Prevalência de sepse por bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido em Unidade de Cuidados Intensivos Neonatal. **Rev Paul Pediatr**, v. 26, n. 1, p. 59-63, 2008.
- TRINDADE, M. D. G.; CHAVES, L. J. Genetic structure of natural *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) populations in northeastern Goiás, Brazil, accessed by morphological traits and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 3, p. 407-413, 2005.
- TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 50, n. 1, p. 27-34, 1996.
- VAN DER WATT, E.; PRETORIUS, J. C. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 87-91, 2001.
- VICTORA, C. Diarrhea mortality: what can the world learn from Brazil? **Jornal de pediatria**, v. 85, n. 1, p. 3-5, 2009.
- VICTORIA, F.; LENARDÃO, E.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R.; ALVES, D.; SILVA, W.; MOTTA, A.; NASCENTE, P. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 8, p. 2668-2674, 2012.
- VIDAU, C.; DIOGON, M.; AUFAUVRE, J.; FONTBONNE, R.; VIGUÈS, B.; BRUNET, J.-L.; TEXIER, C.; BIRON, D. G.; BLOT, N.; EL ALAOUI, H. Exposure to sublethal doses of fipronil and thiacloprid highly increases mortality of honeybees previously infected by *Nosema ceranae*. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e21550, 2011.
- VIEIRA, P. M.; VERONEZI, E.; SILVA, C. R.; CHEN-CHEN, L. Detection of genotoxic, cytotoxic, and protective activities of *Eugenia dysenterica* DC.(Myrtaceae) in mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 6, p. 563-567, 2012.
- VILELA, E. C.; CARVALHO, T. C.; DUARTE, A. R.; NAVES, R. R.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Spatial structure of *Eugenia dysenterica* based on essential oil chemovariations and implications for conservation and management of the genetic diversity of its populations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 10, p. 1776-1782, 2012.

- VIOLANTE, I. M. P. Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste. 2008.
- VISALLI, M. A.; JACOBS, M. R.; APPELBAUM, P. C. Determination of activities of levofloxacin, alone and combined with gentamicin, ceftazidime, cefpirome, and meropenem, against 124 strains of *Pseudomonas aeruginosa* by checkerboard and time-kill methodology. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 4, p. 953-955, 1998.
- WAGNER, H. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Fitoterapia**, v. 82, n. 1, p. 34-37, 2011.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2^a. Germany. 1996.
- WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-1918, 1996.
- WHO. Declaration of Alma-Ata. In: International conference on primary health care, Alma-Ata. 1978, USSR: World Health Organization, 12 p.
- _____. Ottawa charter for health promotion. 1986.
- _____. **Traditional Medicine Strategy 2002-2005**. Geneva: World Health Organization. 2002a. 74 p.
- _____. **WHO - World Health Organization monographs on selected medicinal plants**. Geneva: World Health Organization, v.2. 2002b
- _____. **WHO traditional medicine strategy 2002-2005**. Geneva: World Health Organization 61 p. 2002c.
- _____. **World health statistics 2011**. World Health Organization. 2011
- WIGGINS, N. Popular education for health promotion and community empowerment: a review of the literature. **Health promotion international**, v. 27, n. 3, p. 356-371, 2012.
- YALTIRAK, T.; ASLIM, B.; OZTURK, S.; ALLI, H. Antimicrobial and antioxidant activities of *Russula delica* Fr. **Food and chemical toxicology: an international**

journal published for the British Industrial Biological Research Association, v. 47, n. 8, p. 2052-2056, 2009.

ZAGO, J. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

ZHAO, W.-H.; HU, Z.-Q.; OKUBO, S.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Mechanism of synergy between epigallocatechin gallate and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 6, p. 1737-1742, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421-1429, 2010.

ZUO, G.; WANG, G.; ZHAO, Y.; XU, G.; HAO, X.; HAN, J.; ZHAO, Q. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA). **Journal of ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 287-290, 2008.