

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE ATIVOS EM EXTRATOS E FRAÇÕES
ORIGINADOS DE FOLHAS DE *Azadirachta indica* A. JUSS. VISANDO
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

MARIANA CRISTINA GALEANE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

ARARAQUARA - SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DE ATIVOS EM EXTRATOS E FRAÇÕES
ORIGINADOS DE FOLHAS DE *Azadirachta indica* A. JUSS. VISANDO
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

MARIANA CRISTINA GALEANE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA – SP

2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

G151p

Galeane, Mariana Cristina

Prospecção fitoquímica de ativos em extratos e frações de folhas de *Azadirachta indica* A. JUSS visando atividade antimicrobiana / Mariana Cristina Galeane – Araraquara, 2013
66 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Luís Vitor Silva do Sacramento

1. *Azadirachta indica*. 2. Meliaceae. 3. Nim. 4. Antimicrobiano I. Sacramento, Luís Vitor Silva do, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Shirley e Jair por todo amor imenso e incondicional, toda a força e dedicação, trabalho, apoio, companheirismo, incentivo, pelos ensinamentos da vida, que sem dúvida, foram indispensáveis para meu crescimento pessoal e profissional, responsáveis por toda minha índole e dignidade. Obrigada por todas as experiências compartilhadas comigo, sem vocês não conseguiria metade do que consegui e não seria metade do que sou! Agradeço por me ensinarem o que é uma família estruturada, companheira, unida e feliz!! Vocês são minha vida!

A minha irmã Michele, que é mais do que uma irmã, minha amiga, companheira, confidente e que me estimula e apoia em todas minhas decisões, obrigada pela força para continuar a enfrentar os desafios deste trabalho, pelas palavras de conforto e de incentivo, pelo amor e dedicação. Sem sua companhia não teria conseguido alcançar meus objetivos!

À Deus, pela sua presença constante em minha vida e no meu caminho, agradeço pelo dom da vida e pela saúde, e pelas pessoas maravilhosas que me deu como família!!!

“A única coisa boa que a velhice nos dá é a sabedoria. Por isso que quem ouve o conselho dos pais nunca se dá mal na vida” (Chico Anysio).

“Gostaria de dizer para você que viva como quem sabe que vai morrer um dia, e que morra como quem soube viver direito.” (Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e amorosos agradecimentos a todas as pessoas que auxiliaram de alguma forma para a realização deste trabalho, pela paciência, ajuda, amizade, incentivo e apoio contribuídos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, só tenho a agradecer por toda a dedicação, ensinamento, experiência, disponibilidade, incentivo, amizade e por todos os momentos de força e companheirismo! Obrigada pela sua inteligência, por você ser essa pessoa paciente e amiga que é! Agradeço a Deus sempre por ter tido você como exemplo, pois sempre foi meu estímulo e meu incentivo para continuar e não desistir nunca!!

A minha avó, primos, tios e todos os meus familiares que sempre me disseram palavras fortes, estimulando a continuação deste trabalho! Obrigada por todo carinho e amor!!

As minhas amigas Sabrina Romano e Marina Manaia, que sempre estiveram ao meu lado me dando carinho, compreensão, amor, e acima de tudo, amizade verdadeira!! Obrigada por tudo e todos os momentos!!

Meu agradecimento mais que especial a Angélica, técnica do laboratório de Botânica, minha amiga, obrigada por todas as horas e momentos cedidos para a realização de cada etapa deste trabalho, pela sua inteligência, paciência em todos os ensinamentos, dedicação, força, carinho, amizade acima de tudo, amor, pelos tempos bons e inesquecíveis de convivência diária.

A Profa. Dra. Tais Maria Bauab por todas as palavras e métodos de ensino, dedicação, paciência, sabedoria, disponibilidade cedida para o acompanhamento deste trabalho, permissão para a realização de procedimentos em seu laboratório, confiança e amizade. Obrigada por permitir que mais esta etapa em minha vida tenha sido cumprida.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos por conceder o laboratório para realização de técnicas, por transmitir sua sabedoria e experiência, por auxiliar sempre na realização deste projeto, pelo apoio e dedicação fornecidos a mim.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins da Universidade de Franca, pelos testes realizados em seu laboratório de microbiologia aplicada, pela colaboração, apoio e confiança.

Aos Professores Doutores André Gonzaga dos Santos e Rosemeire Cristina L. R. Pietro pelo auxílio e contribuição durante o Exame Geral de Qualificação.

Aos meus amigos de laboratório, Marília, Victor Hugo, Débora, Andréia, Juhan, Juninho, Andréa e todos os alunos do laboratório de botânica que de alguma forma me ajudaram, por todo apoio, ânimo, experiências, carinho, amizade, dedicação, paciência, companheirismo, enfim, todos os momentos bons e ruins que passamos juntos, obrigada por me fazerem crescer e aprender com cada um de vocês! Momentos inesquecíveis!

Aos amigos do laboratório de Microbiologia da FCF, Mariana Rozatto, Bruna Bonifácio, Kamila e Mateus pela colaboração, auxílio, força e amizade diariamente contribuídos para o sucesso deste trabalho.

Para as amigas do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, Silvia Heredia, Marcella Gabrielle e Josyane Claudino pelos momentos vividos, pela força, colaboração, apoio e amizade!! Obrigada por passarem junto comigo essa etapa tão importante em nossas vidas!!

Para a funcionária Silvia do laboratório de Microbiologia da FCF pelo auxílio e colaboração nas etapas deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Imunologia pela disponibilidade do uso dos aparelhos do laboratório.

Aos funcionários da biblioteca da FCF pelo auxílio concedido.

A todos os funcionários e docentes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, que de alguma forma, contribuíram para o rendimento e finalização deste estudo.

À CAPES pelo apoio financeiro cedido.

“É exatamente disso que a vida é feita: De momentos!

*Momentos os quais temos que passar, sendo bons ou não,
para o nosso próprio aprendizado, por algum motivo.*

Nunca esquecendo do mais importante: Nada na vida é por acaso...”

(Chico Xavier).

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Revisão da literatura	14
3. Objetivos	24
4. Materiais e métodos	25
4.1. Extratos vegetais.....	25
4.1.1. Coleta.....	25
4.1.2. Preparo do material vegetal	25
4.1.3. Método de extração	25
4.1.4. Fracionamento do extrato hidroalcoólico.....	26
4.2. Triagem fitoquímica	26
4.2.1. Saponinas.....	26
4.2.2. Taninos.....	26
4.2.3. Flavonoides.....	27
4.2.4. Antraquinonas	28
4.2.5 Alcaloides	28
4.2.6. Glicosídeos cardiotônicos.....	29
4.3. Cromatografia em camada delgada	30
4.3.1. Técnicas cromatográficas	31
4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana	32
4.4.1. Preparo dos extratos vegetais	32
4.4.2. Espectro de absorção dos extratos vegetais.....	33
4.4.3. Micro-organismos utilizados	33
4.4.3.1. Estocagem e manutenção dos micro-organismos.....	33
4.4.3.2. Preparo das substâncias controle positivo	34
4.4.3.3. Controle negativo	34
4.4.3.4. Preparo e padronização das suspensões bacterianas e fúngica.....	34
4.4.3.4.1. Suspensão bacteriana.....	34
4.4.3.4.2. Suspensão fúngica	35
4.4.3.5. Determinação da atividade antibacteriana (CLSI, 2006).....	35
4.4.3.5.1. Realização do teste	35
4.4.3.5.1.1. Método de diluição em microplacas.....	35

4.4.3.5.2. Leitura do teste	37
4.4.3.5.2.1. Leitura espectrofotométrica	37
4.4.3.5.2.2.1. Cálculo da viabilidade microbiana	37
4.4.3.5.2.3. Leitura com revelador	37
4.4.3.6. Determinação da atividade anti- <i>Candida</i> (CLSI, 2008)	38
4.4.3.6.1. Realização do teste	38
4.4.3.6.1.1. Método de diluição em microplacas	39
4.4.3.6.2. Leitura do teste	40
4.4.3.6.2.1. Visual	40
4.4.3.6.2.2. Leitura espectrofotométrica	41
4.4.3.6.2.2.1. Cálculo da viabilidade microbiana	41
4.4.3.6.2.3. Revelação Colorimétrica	41
5. Resultados e Discussão	43
5.1. Triagem fitoquímica	43
5.2. Cromatografia em camada delgada	44
5.3. Atividade antimicrobiana	47
5.3.1. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas com leitura espectrofotométrica	47
5.3.2. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador	49
5.3.3. Determinação da atividade antifúngica e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas com leitura espectrofotométrica	51
5.3.4. Determinação da atividade antifúngica e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas utilizando TTC como revelador	52
6. Conclusão.	54
7. Referências Bibliográficas	55

Lista de figuras

Figura	Página
1	Figura 1. Imagens do exemplar de <i>A. indica</i> existente no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. A: vista geral; B: detalhe dos ramos15
2	Estrutura química da azadiractina.....17
3	Representação esquemática do teste de diluição em microplaca36
4	Teste realizado com a bactéria <i>Escherichia coli</i> revelado com resazurina.....38
5	Esquema da técnica de microplaca para <i>Candida albicans</i>40
6	Teste realizado com a levedura <i>Candida albicans</i> revelado com TTC42
7) A)	Perfil cromatográfico de metabólitos secundários em <i>A. indica</i> por cromatografia em camada delgada para terpenos.46
7) B)	Perfil cromatográfico de metabólitos secundários em <i>A. indica</i> por cromatografia em camada delgada para flavonoides.46
7) C)	Perfil cromatográfico de metabólitos secundários em <i>A. indica</i> por cromatografia em camada delgada para taninos.46
7) D)	Perfil cromatográfico de metabólitos secundários em <i>A. indica</i> por cromatografia em camada delgada para alcaloides.46
8	Atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico e suas frações e o extrato acetato de etila frente a <i>E. coli</i>47
9	Atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico e suas frações e o extrato acetato de etila frente a <i>S. aureus</i>48
10	Atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico e suas frações e o extrato acetato de etila frente a <i>Candida albicans</i>52

Lista de tabelas

Tabela	Página
1 Fase móvel e reagentes utilizados para determinação de metabólitos secundários utilizando-se técnica de cromatografia em camada delgada	32
2 Micro-organismos utilizados nos testes	33
3 Triagem fitoquímica da droga vegetal obtida de <i>Azadirachta indica</i>	43
4 Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/ml para <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. mutans</i> e <i>E. faecalis</i> , pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador	49
5 Determinação da atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i> e da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a técnica de diluição em microplaca e TTC como revelador.....	53

RESUMO

Azadirachta indica A. Juss. popularmente conhecida como nim ou margosa, pertence à família Meliaceae, tendo propriedades inseticidas e pesticidas, sendo que outros estudos comprovam sua eficácia como antifúngico, anti-inflamatório, cicatrizante, antiviral, dentre outras atividades. O estudo para o desenvolvimento de fitoterápicos está em ascensão devido a diversos fatores, tais como resistência bacteriana frente aos antibióticos comumente utilizados pelo seu uso indiscriminado, pelas possíveis reações adversas causadas pelos mesmos, pela presença de infinidade de compostos ativos que possuem atividade farmacológica desejável em determinadas plantas. Foram realizadas triagem fitoquímica e análise por cromatografia em camada delgada, obtendo-se resultados semelhantes, com a presença de flavonoides, taninos e terpenos. A atividade antimicrobiana mostrou que o extrato acetato de etila e a fração butanol apresentaram maior atividade contra *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans* apresentando uma CIM = 50 µg/mL para estas duas cepas, e para a cepa *Enterococcus faecalis*, o extrato hidroetanólico e a fração aquosa foram as amostras mais promissoras com uma CIM = 50 µg/ml e CIM = 25 µg/ml respectivamente. Portanto, incentiva - se a continuidade dos estudos, objetivando o desenvolvimento de cosméticos, pastas dentais ou até mesmo uma substância isolada no combate à cáries.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*, Metabólitos secundários, Microdiluição, Cepas bacterianas, cepas fúngicas

ABSTRACT

Azadirachta indica A. Juss, popularly known as neem or margosa, belongs to the family Meliaceae, presenting properties as an insecticide and pesticide, and many studies have shown their efficacy as antifungal, anti-inflammatory, healing, antiviral and other pharmacological activities. Studies for the development of drugs originated from plants is rising due to several factors such as bacterial resistance against commonly used antibiotics, indiscriminate use of these, as well as the adverse reactions caused by them, and the presence of infinitude of active compounds that have desirable pharmacological activity in certain plants.

In this present study, phytochemical triage were performed as well as thin layer chromatography analysis, and similar results were obtained, with the presence of flavonoids, tannins and terpenes. The antimicrobial activity showed that the ethyl acetate extract and butanol fraction presented greater activity against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus mitis* presenting a MIC = 50 mg / mL for these two strains, and the strain *Enterococcus faecalis*, the hydroethanolic extract and aqueous fraction were most promising samples with a MIC = 50 mg / ml and MIC = 25 mg / ml respectively. Therefore, it encourages the continuation of studies, aiming at the development of cosmetics, toothpaste or even a isolated substance to destroy carie.

Keywords: *Azadirachta indica*, Phytochemistry, Antimicrobial Activity, Oral Strains.

1. INTRODUÇÃO

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. As diversas enfermidades têm sido tratadas com chás (infusos, decoctos, macerados), sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e unguentos, preparados a partir de partes de plantas. A referida conduta terapêutica remonta, principalmente, aos antigos povos da China, Egito, Ásia e Roma, onde eruditos, com base em seus conhecimentos classificaram muitas espécies vegetais, com a respectiva indicação do uso medicinal. Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, a busca das mesmas teve grande impulso após a descoberta da penicilina (LIMA, 2001).

As primeiras evidências do uso de plantas com fins terapêuticos datam de 460 a. C (CONSERVA, 1985; LEHIR, 1985). No entanto, as primeiras informações sobre o uso sistemático de plantas como medicamentos datam da Índia Antiga, através do sistema de medicina vigente naquela época, possivelmente do “Ayurveda” (Ciência da Vida) (OLIVEIRA, 1986).

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador em animais, em resposta às pressões agressivas do meio ambiente. Algumas dessas substâncias depois de descobertas foram chamadas de isoflavonoides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcaloides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais, além de muitas outras que agem como antioxidantes e coenzimas. (WILLIAMS, 2001).

Tradicionalmente, plantas tem sido usadas para tratamento ou prevenção de várias condições de saúde, como depressão, hipertensão, doenças de pele, diabetes, entre outras enfermidades. Muitas dessas plantas acredita-se serem livres de riscos para o usuário e são comumente usadas para automedicação sem supervisão. Durante as últimas três décadas, houve um renascimento notável da Fitoterapia (BALBINO & DIAS, 2010).

Uma força adicional dos medicamentos fitoterápicos é que em sua maioria possuem preços acessíveis, ou podem custar menos que os medicamentos cujo(s) princípio(s) ativo(s) seja(m) sintético(s) (SHAW, 1998).

As doenças infecciosas são consideradas como a principal causa de mortes prematuras no mundo, chegando a 15 milhões de óbitos por ano. O crescimento da

resistência bacteriana é um fator importante na ocorrência deste quantitativo, além de que, esta ameaça também dificulta a cura e eleva os gastos com a assistência a saúde (WHO, 2008).

A necessidade de encontrar alternativas para o controle microbiano tem induzido muitas pesquisas para buscar produtos que sejam eficazes e econômicos. Estudos realizados com produtos naturais possuindo atividade biológica têm sido direcionados para oferecer alternativas confiáveis ao controle microbiano, principalmente a partir de produtos bioativos obtidos de plantas com propriedades terapêuticas de uso rotineiro (ALBUQUERQUE, 2001).

Parte das populações dos países desenvolvidos se utiliza da medicina tradicional para a maioria dos cuidados necessários à saúde (HOUGHTON, 1995). O uso popular de plantas medicinais para o tratamento de várias doenças, incluindo infecções fúngicas e bacterianas é típico do Brasil (CARVALHO et al., 2002; PEREIRA et al., 2007; SCHUBERT et al., 2007) e, no mundo muitos grupos de pesquisa que estudam plantas detectam metabólitos com propriedades antimicrobianas na prospecção de novos compostos antimicrobianos ou antifúngicos (COS et al., 2006; SOBERÓN et al., 2007; RANGASAMY et al., 2007).

A resistência múltipla a fármacos tem crescido devido ao uso indiscriminado de medicamentos antimicrobianos existentes no tratamento de doenças infecciosas (SERVICE, 1995). Este problema exige uma renovada tentativa de procurar agentes antibacterianos e antifúngicos efetivos contra a resistência de micro-organismos patogênicos aos antibióticos mais comuns (SOULSBY, 2005).

Este trabalho busca estudar e analisar a composição de *Azadirachta indica* A. Juss., popularmente conhecida como nim, realizando testes fitoquímicos, além de testar sua atividade antimicrobiana frente às cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Na revisão da literatura constam vários estudos que comprovaram a ocorrência de metabólitos responsáveis pelas atividades antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, inseticida, pesticida entre outras nesta espécie.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Azadirachta indica* (Meliaceae)

Plantas exóticas bem adaptadas ao clima do Brasil têm apresentado diversas propriedades medicinais, inseticidas e alelopáticas dentre outras; a exemplo de *Azadirachta indica* A. Juss. (nim), originária do sudeste da Ásia, região de clima tropical, pertencente à família Meliaceae, como a *barbarea vulgaris*, ou *melia azeadarach*, o *cedrela fissilis* vel., e o *swietenia macrophylla* (SCHMUTTERER, 2004).

A família Meliaceae pertence à ordem Sapindales (CRONQUIST, 1988) e seus gêneros e espécies estão distribuídos na região neotropical do planeta, sendo que 16 espécies agrupadas em 4 gêneros, ocorrem como espécies arbóreas e nativas na Região Sul do Brasil (KLEIN, 1984). De acordo com Tringali (2001), a família Meliaceae contém aproximadamente 1400 espécies.

Sapindales inclui nove famílias sendo seis majoritárias, dentre elas Rutaceae, Meliaceae, e Simaroubaceae, são consideradas fontes ricas de diversos metabólitos secundários (Judd et al., 2008).

O hábito de crescimento da família Meliaceae constitui-se de árvores frondosas (medindo em média de 20 a 30 m de altura) e árvores de pequeno a médio porte (medindo em média de 3 a 10 m de altura). São comuns nas florestas estacionais decíduais e semidecíduais, apresentando ampla e expressiva distribuição. Ocorrem também na floresta ombrófila densa da encosta atlântica, mesmo em altitudes elevadas. (KLEIN, 1984).

O tronco de *A. indica* é classificado como semi-reto a reto, com 30 a 80cm de diâmetro, sendo relativamente curto e duro, de coloração marrom-avermelhada, com fissuras e escamas. O diâmetro da copa varia de 8 a 12m, podendo atingir 15m em árvores isoladas. São árvores atrativas, com grande quantidade de folhas sempre verdes, do tipo imparipinadas, alternas, com folíolos de coloração verde-claro intenso, que caem somente em casos de seca extrema (MARTINEZ, 2002.).

A Figura 1 mostram um exemplar de *A. indica* incorporado ao acervo do Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Campus de Araraquara.

Figura 1. Imagens do exemplar de *A. indica* existente no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. A: vista geral; B: detalhe dos ramos.



O nim é facilmente propagado, tanto por sementes quanto vegetativamente, (mudas, árvores novas, brotos de raiz ou cultura de tecidos). Entretanto, o crescimento se mostra melhor em áreas com chuvas anuais entre 800a 1800mm, solos arenosos, profundos e bem drenados, com pH entre 6,5 e 7,5 e temperaturas de 20°C (MARTINEZ, 2002).

Segundo Jain et al. (2002), quando a árvore está situada em solos ligeiramente alcalinos, encontra maior quantidade de nutrientes disponíveis, e que fatores ambientais, como latitude geográfica, desempenha papel significativo no aumento de produtividade da planta.

Diversos fatores podem exercer influência na constância da produção de metabólitos secundários em uma planta afetando diretamente sua atividade biológica e,

consequentemente, a reprodutibilidade da ação inseticida. Fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento vegetal da planta, época, horário e forma de coleta e condições ambientais devem ser considerados para uso do neem como inseticida natural.¹³ Além disso, condições de armazenamento e procedimentos de preparo dos óleos e extratos certamente afetam a qualidade do produto final (SHIDU, 2003).

2.2. Aspectos fitoquímicos de *A. indica*

Plantas da família Meliaceae são conhecidas por conter uma variedade de compostos descritos como inseticidas, antialimentares e reguladores do crescimento (NAKATANI et al., 2004). Dentro dessa família, destaca-se a *Azadirachta indica*, conhecida por nim, que é considerada uma das mais importantes, graças à sua atividade sistêmica, eficiência em baixas concentrações e baixa toxicidade aos mamíferos (GALLO et al., 2002).

O interesse pelo nim-indiano (*A. indica*) tem crescido pelas diversas características interessantes do seu extrato bruto ou do seu óleo vegetal, que podem ser obtidos das folhas, caules e sementes. Essas utilidades vão desde o combate às pragas agrícolas até o uso medicinal e na indústria cosmética, e têm atraído a atenção de pesquisadores de todo o mundo, o que pode ser confirmado pelo número crescente de trabalhos publicados sobre essa espécie (WEWETZER, 1998; KULKARNI et al., 1999; ARAÚJO et al., 2000; OKEMO et al., 2001; ROOP et al., 2005).

O nim é cultivado em todos os países da África, na Austrália e América Latina, usado há séculos na Ásia, principalmente na Índia, como planta medicinal. Tem diversas aplicações, em especial como antisséptico, curativo, vermífugo; colocado em sabões medicinais, cremes e pastas dentais (SCHMUTTERER, 2004).

Os metabólitos mais característicos de Sapindales são os limonoides, que são tetranortriterpenoides. Possuem considerável interesse devido a sua fascinante diversidade estrutural e sua ampla atividade biológica. Particularmente, caracterizam os membros da família Meliaceae, onde são abundantes e variados (TRINGALI, 2001).

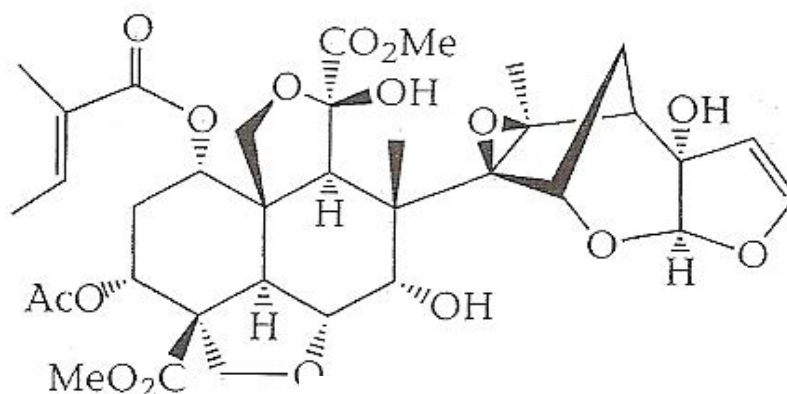
Muitos compostos de *A. indica* têm sido isolados a partir de sementes oleaginosas (mistura de tetranortriterpenos) e de cascas do tronco (polissacarídeos). Embora estudos têm descrito o efeito anti-inflamatório dos extratos de polissacarídeos, poucos têm identificado os componentes bioativos (Biswas et al., 2002).

O principal composto extraído dos frutos dessa planta é a azadiractina, um limonoide que atua interferindo no funcionamento de glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos e também apresenta propriedade fagoinibidora (VIEGAS-JÚNIOR, 2003).

A azadiractina pertencente a classe dos terpenos ocorre em todas as partes da planta, destacando-se principalmente nos frutos, passando por aumentos na concentração ao longo do desenvolvimento, sendo máxima no amadurecimento e, durante o armazenamento, pode apresentar variações em função do modo de colheita, dos teores de umidade, presença de luz, amplitudes térmicas e variações no pH (MARTINEZ, 2002; SCHMUTTERER, 2004). A azadiractina é o mais importante constituinte biopesticida do nim, sendo considerado um limonóide e sua fórmula molecular é $C_{35}H_{44}O_{16}$ (MORDUE [LUNTZ] & BLACKWELL, 1993; SCHUMUTTERER, 1995).

A Figura 2 mostra a estrutura química da azadiractina segundo Tringali (2001).

Figura 2. Estrutura química da azadiractina



De acordo com Martinez (2002) e Lee et al. (1988), apesar de os compostos bioativos presentes no nim serem encontrados em todas as partes da planta, aqueles presentes nas sementes e folhas são os que possuem maior concentração e são mais facilmente extraíveis, por meio de processos em solventes orgânicos como hidrocarbonetos, alcoóis, cetonas ou éteres.

O contínuo crescimento da população mundial, a grande competição entre o homem e os insetos pelo mesmo tipo de alimentação, a transmissão de doenças e

infecções hospitalares tendo como principais vetores os insetos, e a resistência a inseticidas, levam à necessidade de uma contínua busca de novos e diferentes compostos. São várias as estratégias capazes de determinar a atividade dos produtos naturais contra insetos e o seu isolamento. Para azadiractina, a atividade contra o inseto se dá pelo impedimento da ecdise que, conseqüentemente, impede a formação do inseto adulto (SIMÕES et al., 2010).

Azadirachta indica é considerada como espécie com ação mais importante planta inseticida de grande importância em todo o mundo (MARTINEZ, 2002), sendo sua atividade avaliada em mais de 400 espécies de insetos, das quais mais de cem ocorrem no Brasil (PENTEADO, 1999).

Os limonóides são, talvez, os maiores representantes da classe dos terpenoides como substâncias inseticidas. São conhecidos também como meliacinas e são assim denominados devido ao seu sabor amargo, sendo tais substâncias isoladas de plantas pertencentes às famílias Meliaceae. Sua rota biossintética em plantas prevê como precursor um triterpeno que, ao final, dá origem aos tetranortriterpenoides pela perda de quatro átomos de carbono do precursor original (CONNOLLY, 1983).

O nim (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) é nativo da Índia e Myanmar (antiga Burma), onde cresce em florestas de regiões tropicais e subtropicais. Nessas regiões o nim se apresenta como árvore de crescimento rápido e perenifólia (Maithani et al., 2011). É uma planta utilizada há mais de 4.000 anos em virtude de suas propriedades medicinais apresentadas por seus frutos, sementes, folhas, cascas e raízes conterem compostos com comprovada ação antisséptica, anti-inflamatória e antifúngicas, entre outros (GIRISH & BHAT, 2008). Por isto, em países onde a espécie é nativa o extrato das folhas do nim é usado no tratamento de úlcera, de diabetes e em procedimentos periodonticos (PANKAJ et al., 2011).

Derivados químicos de *A. indica* apresenta ampla gama de efeitos contra pestes, incluindo aqueles fisiológicos como regulação do crescimento de insetos e esterilidade. (MORDUE [LUNTZ] et al., 2005).

Os limonóides são conhecidos pelo fato de apresentarem atividade contra insetos, seja interferindo no crescimento, seja pela inibição de sua alimentação. Uma

das atividades mais relevantes relatadas para plantas da família Meliaceae é a ação fago-inibidora (SIMÕES et al., 2010).

Segundo estudos realizados por Carneiro et al. (2012), a cromatografia em camada delgada das frações hexano, diclorometano e acetato de etila apresentaram predominância de terpenos. Os limonóides ou tetranortriterpenoides que são muito comuns em folhas e frutos de *A. indica* pertencem a esta classe de substâncias (SHUMUTTERER, 2002; ROY and SARAF, 2006).

Extratos de sementes e folhas de *Azadirachta indica* são também amplamente aplicados como pesticidas e repelentes de insetos. A eficácia de cada extrato tem sido associado com seu teor de limonoides (tetranortriterpenoides C₂₆), Azadiractina – A e análogos (MORGAN, 2009; VEICHT et al., 2008).

2.3. Micro-organismos e atividade antimicrobiana de *A. indica*

A resistência bacteriana constitui atualmente um problema de saúde pública em todo o mundo. Para os profissionais de saúde, tem se tornado um desafio crescente, na medida em que as opções terapêuticas para o tratamento de algumas infecções causadas por Microrganismos Resistentes (MR) são cada vez mais restritas. Adicionalmente, a constatação de que cerca de 70% dos patógenos isolados em hospitais americanos são resistentes a pelo menos um antimicrobiano, reafirma a preocupação com tal cenário (SIGEL et al., 2007).

Um representante Gram-negativo de grande interesse clínico é a espécie *Escherichia coli*. Este bacilo flagelado, facultativo é membro da microbiota gastrintestinal de animais homeotérmicos, e alguns sorotipos são capazes de desencadear infecções intestinais por diferentes mecanismos. Outras cepas podem causar infecções extraintestinais (urinárias, pulmonares, meningites e abscessos), sendo a espécie *E. coli* o principal micro-organismo implicado em casos de infecções urinárias e um dos três de maior ocorrência em infecções hospitalares (TORTORA et al., 2012).

Os estafilococos tipicamente ocorrem em agregados irregulares ou em forma de cacho de uva. Destaca-se o *Staphylococcus aureus*, assim denominada pela pigmentação amarelada das suas colônias, devido a sua alta virulência e grande prevalência nas instituições de saúde (WHO, 2002). Os membros dessa espécie são facultativos e Gram-positiva. Algumas características dos estafilococos são responsáveis por sua patogenicidade, que apresenta várias formas. Eles crescem comparativamente bem sob

condições de pressão osmótica elevada e baixa umidade, o que explica parcialmente porque podem crescer e sobreviver nas secreções nasais e na pele. Esta cepa produz muitas toxinas que contribuem para a patogenicidade da bactéria, aumentando sua capacidade de invadir o corpo e danificar os tecidos; e a capacidade de desenvolver rapidamente resistência a antibióticos como a penicilina contribui para seu perigo para pacientes em ambientes hospitalares (TORTORA et al., 2012).

Segundo Nicolau & Stein (2010) complicações nos pés são comuns em pacientes diabéticos; úlceras nos pés estão entre as mais sérias consequências. Estas úlceras frequentemente tornam-se infectadas, e se não tratadas imediatamente e adequadamente, infecções em pés diabéticos podem levar para gangrena séptica e amputação. *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais comum nestas infecções, e o aumento da incidência de *S. aureus metilina-resistente* (MRSA) ao longo das duas últimas décadas tem ainda complicado ainda mais o tratamento antibiótico.

A cárie dental é uma doença de etiologia multifatorial relacionada à dieta, microbiota bucal, hábitos de higiene, características salivares e, constitui-se, juntamente à doença periodontal, nos problemas bucais mais frequentes na saúde pública do Brasil (PINTO, 2000). Do ponto de vista microbiológico, o aparecimento de lesões da doença está ligado à complexa estrutura do biofilme dental que envolve a participação de vários micro-organismos como o *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus sanguis* os quais colonizam a superfície dos elementos dentários pouco tempo após a irrupção dos mesmos na cavidade bucal (KAWASHIMA et al., 2003; SVENSATER et al., 2003; LINDQUIST & EMILSON, 2004; MARSH, 2004; SEKI et al., 2006).

Os enterococos, bactérias gram-positivas, são adaptados a áreas do corpo ricas em nutrientes, mas pobres em oxigênio, como o trato gastrointestinal, a vagina e a cavidade oral. Eles também são encontrados em grandes quantidades nas fezes humanas. Como são micro-organismos relativamente resistentes, eles persistem como contaminantes em ambientes hospitalares, mãos, jogos de cama e até nos gases fecais. Nos anos recentes, eles se tornaram a principal causa de infecções nosocomiais, especialmente por sua alta resistência à maioria dos antibióticos. Entre as espécies, o *Enterococcus faecalis* é responsável pela maioria das infecções de feridas cirúrgicas e do trato urinário. Em cenários médicos, esta cepa frequentemente entra na corrente sanguínea por meio de procedimentos invasivos como os cateteres (TORTORA et al., 2012).

Candida é um importante gênero de patógenos oportunistas com alta frequência de infecções em indivíduos imunodeficientes, tais como, pacientes com câncer, que recebem um amplo espectro de antibióticos (ELLEPOLA & SAMARANAYAKE, 1998; EGUSA et al., 2000).

Para reduzir doenças e danos econômicos causados por micro-organismos patogênicos, o uso de produtos naturais como compostos antimicrobianos parece ser uma maneira interessante de controlar a presença de bactérias patogênicas e estender a vida de prateleira de alimentos processados (COWAN, 1999; FILOCHE et al., 2005; NEDOROSTOVA et al., 2009), principalmente devido à prevalência de micro-organismos resistentes a antissépticos e antibióticos convencionais e também pelo aumento do conceito popular sobre qualidade de alimentos e do potencial impacto negativo dos aditivos sintéticos na saúde. Assim, a crescente demanda do consumidor por produtos naturais efetivos e seguros tem levado a investigações com relação aos efeitos dos metabólitos secundários (DORMAN & DEANS, 2000; DRAUGHON, 2004; FILOCHE et al., 2005).

Vários métodos são utilizados na determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo aplicados em estudos piloto na triagem de novas substâncias ativas. A técnica de difusão em ágar e métodos de diluição em tubo são comumente utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos. As técnicas de microdiluição, desenvolvidas em microplacas, possibilitam a utilização de volumes reduzidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de produtos químicos que são de grande valia quando se trata de produtos naturais, especialmente os de origem vegetal que são extraídos em pequenas quantidades. Estas técnicas permitem a análise de vários compostos e de uma ampla variedade de espécies bacterianas concomitantemente, utilizando pequenos volumes de extratos, sendo ainda de baixo custo e apresentando resultados reprodutíveis (CHAND et al., 1994; COWAN, 1999; DEVIENNE e RADDI, 2002).

Vários estudos de atividade antimicrobiana vêm sendo realizados com a utilização das técnicas de diluição em microplacas e demonstram que esta é uma metodologia adequada para tal finalidade com aspectos vantajosos como a utilização de pequenas quantidades de produtos naturais e a possibilidade de se utilizar mais de um extrato, bem como diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio. Essas técnicas que determinam a concentração inibitória mínima são quantitativas, pois possibilitam demonstrar qual a mínima concentração do extrato necessária para inibir o crescimento

bacteriano (CHAND et al., 1994; HAMMER et al., 1998; COWAN, 1999; DEVIENNE & RADDI, 2002; SUFFREDINI et al., 2004; MIGLIATO, 2005; ALVES, 2006).

Para a determinação do perfil de sensibilidade, várias metodologias estão disponíveis, porém aquelas consideradas padrão-ouro, como a diluição em ágar e a microdiluição em caldo, são laboriosas para serem executadas por um laboratório de rotina, embora forneçam resultados quantitativos (concentração inibitória mínima [CIM]) (CAMPANA et al., 2011).

Tanto a técnica de difusão em ágar, quanto a diluição em tubos, requerem grande quantidade da substância-teste, isso restringe seu uso em bioensaios para compostos antimicrobianos de origem vegetal, pois na grande maioria são extraídos em pequenas quantidades, limitando assim o número de réplicas do ensaio (OSTROSKY et al., 2008).

Para o tratamento de infecções leves, a determinação da CIM nem sempre é necessária. No entanto, para o tratamento de infecções graves, principalmente as que acometem pacientes em unidades de terapia intensiva (UTIs), a determinação da CIM auxilia não somente na seleção da terapia antimicrobiana, mas orienta o esquema posológico mais adequado. A determinação da CIM também é necessária para micro-organismos ou combinações de micro-organismos/antimicrobianos, em que o teste de disco difusão não é confiável, por exemplo, para glicopeptídeos e *S. aureus* (TENOVER et al., 2001). Dessa maneira, metodologias de fácil execução que forneçam a CIM com acurácia são altamente desejáveis (CAMPANA et al., 2011).

Utilizando técnicas como diluição em tubos, método de diluição em placas e método de diluição em Agar, um considerável efeito antibacteriano do extrato de neem tem sido relatado contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella infantis* (ALZOREKY & NAKAHARA, 2003), *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp. (VANKA et al., 2001), entre outras. A planta também foi estudada por Ahmad (2001) quanto à sua ação antibacteriana, tendo obtido resultados positivos para *S. aureus* e *E. coli*.

De acordo com Patel & Venkatakrishna-Bhatt (1988), o extrato de *Azadirachta indica* é um poderoso agente inibidor contra o aumento e estabelecimento de micro-organismos que causam doenças infecciosas na cavidade bucal. Isto incentiva o estudo da atividade antibacteriana contra as espécies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis*.

Estudos envolvendo o uso de extrato de folhas de neem em formulações de gel dental mostram redução da placa bacteriana e elas têm sido utilizadas também no tratamento de gengivites e periodontites (PAI et al., 2004).

A descoberta de novas substâncias para serem empregadas no controle de microorganismos é de suma importância para a saúde populacional e campo promissor para o desenvolvimento técnico - científico, visando à descoberta de novas moléculas que apresentem atividades biológicas importantes, como é o caso dos antimicrobianos (FERREIRA et al., 2011).

3. OBJETIVOS

- Estudar e analisar a ocorrência de metabólitos secundários em folhas de *Azadirachta indica* A. Juss, utilizando triagem fitoquímica e cromatografia em camada delgada.
- Avaliar a atividade antimicrobiana desta espécie vegetal frente as cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, utilizando o método de diluição em microplacas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Extratos vegetais

4.1.1. Coleta

A coleta das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. foi realizada no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara, situado nas coordenadas geográficas 21°48'52.44"S e 48°12'07.13"O., realizada no mês de Agosto/2011. Também foi coletado exemplar destinado a preparação de excisata, que foi enviada para tombamento no Herbário de São José do Rio Preto sob número SJRP31236.

4.1.2. Preparo do material vegetal

As folhas coletadas foram lavadas com hipoclorito de sódio (0,2%) e água deionizada, sendo submetidas à secagem em estufa de circulação de ar a 40°C por três dias, seguida por trituração das folhas secas em moinho de facas. Na sequência este material foi passado em tamis de malha 0,42 mm de modo a padronizar o tamanho das partículas, por isso, o material retido na malha 0,42 mm foi novamente triturado no moinho de facas e passado novamente pela malha do mesmo tamis, objetivando a composição integral da droga vegetal produzida, para posteriormente, obter maior eficiência no contato entre as partículas e o líquido extrator.

4.1.3. Método de extração

O extrato hidroetanólico foi obtido por percolação da droga vegetal de *A. indica* utilizando-se como solvente uma solução de etanol a 70% (v/v), com fluxo controlado para 10 gotas/minuto, até esgotamento da droga, sendo o volume da solução extrativa obtida reduzido em evaporador rotativo a 40 °C , até a recuperação total do etanol, sendo em seguida retirado do balão, completando-se a secagem do resíduo em placas de petri em estufa a 40 °C, durante 48 horas.

O extrato bruto de acetato de etila foi obtido por maceração. Para isso, foram colocados 100g da droga vegetal umedecida com 200ml do solvente, para em seguida acrescentar mais 200ml de acetato de etila e em manta aquecedora a 30°C, com agitação de 1 em 1 hora durante 3 horas. A solução extrativa foi parcialmente seca em evaporador rotativo, seguido de secagem final em capela e estufa a 40°C.

4.1.4. Fracionamento do extrato hidroalcoólico

As frações a serem testadas foram obtidas solubilizando-se 2,00 g do extrato hidroetanólico seco em 100,00 mL de água destilada, utilizando-se funil de separação de 300,00 mL. Em seguida, iniciou-se a partição líquida/líquida com solventes de polaridades crescentes (*n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol), em proporções iguais de solução aquosa e solvente orgânico, até separação completa das respectivas fases (com duração média de 15 minutos). As frações obtidas foram concentradas até a secura em capela.

4.2. Triagem Fitoquímica

Para caracterizar os principais grupos de metabólitos secundários como taninos, flavonoides, glicosídeos cardiotônicos, saponinas, antraquinonas e alcaloides, foram realizadas reações químicas, em que são observadas o desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico, conforme métodos adaptados de Costa (2001).

4.2.1. Saponinas

Adicionou-se 10,00ml de água deionizada em 2,00g da droga vegetal fervendo-se por 5 minutos. A solução foi filtrada com papel de filtro em tubo de ensaio, o qual foi agitado vigorosamente por 15 segundos. A ocorrência de espuma e sua permanência durante 15 minutos foi considerada como resultado positivo.

4.2.2. Taninos

Foi obtido a solução extrativa a partir de um decocto com 5,00g de droga vegetal e 100,00ml de água deionizada durante 15 minutos. Em seguida, a solução foi filtrada

em papel de filtro e, após esfriar, foi utilizada para a realização de testes com solução de gelatina 2,5% (na qual a formação de precipitado indicaria reação positiva) e com algumas gotas de Cloreto Férrico 1% (a formação de cor azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e de cor verde a presença de taninos condensados).

4.2.3. Flavonoides

Colocou-se 20,00ml de éter de petróleo em 3,00g de droga vegetal e agitou-se durante 10 minutos, em banho-maria, filtrando-se a solução resultante em papel de filtro. O pó desengordurado foi então submetido à extração dos flavonoides utilizando-se 30,00ml de metanol, aquecendo-se por 20 minutos. Filtrou-se a solução ainda quente, e esta foi evaporada até a secura, sendo o resíduo ressuspenso com 10,00ml de metanol.

Após, foram realizadas as reações colorimétricas para identificação de flavonóides, de acordo com as seguintes reações:

- **Reações de Shinoda (reação de cianidina):** Colocar 1 ml do extrato final em tubo de ensaio, adicionar um fragmento de magnésio metálico e juntar gotas de ácido clorídrico concentrado. Resultado positivo: desprendimento de gás hidrogênio e a mudança na coloração para vermelho ou róseo.
- **Reação de Taubock (reação oxalato-bórica):** Evaporar em banho-maria 3 ml do extrato final até a secura, esfriar e umedecer o resíduo com 5 gotas de acetona. Adicionar alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Evaporar (banho-maria) novamente até a secura evitando aquecimento prolongado. Dissolver o resíduo em 5 ml de éter etílico e observar sob luz UV. Resultado positivo: fluorescência amarelo-esverdeada quando exposta à luz ultravioleta – UV.
- **Reação de Pew:** Evaporar (banho-maria) 3 ml do extrato final em tubo de ensaio até a secura. Ao resíduo adicionar 3 ml de metanol e uma pequena porção de zinco metálico. Em seguida, adicionar cerca de 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado. Resultado positivo: coloração vermelha

- **Reação com Cloreto Férrico:** Adicionar a 1 ml do extrato final algumas gotas de solução metanólica de cloreto férrico a 2%. Resultado positivo: coloração verde, amarela ou violácea, dependendo do flavonóide presente.
- **Reação com Cloreto de Alumínio:** Umedecer 4 áreas diferentes de pedaço de papel de filtro com o extrato final. Colocar sobre uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. Resultado positivo: sob luz UV observa-se intensificação da fluorescência ou fluorescência verde-amarelada.

4.2.4. Antraquinonas

Para a pesquisa de compostos antraquinônicos livres, 10,00ml de éter etílico foram agitados com 1,00g da droga vegetal em um béquer, filtrando-se a solução obtida para tubo de ensaio, ao qual adicionou-se 1,00ml de amônia diluída. A mudança de coloração da camada aquosa para róseo indica reação positiva.

Já para os Glicosídeos Antraquinônicos, o pó residual da extração anterior foi fervido com 20,00ml de água deionizada, filtrando-se a solução em seguida. A seguir, realizou-se a reação de Borntrager, na qual a formação de coloração rósea na camada aquosa indica reação positiva.

4.2.5. Alcaloides

Alcalinizou-se 5,00g da droga vegetal com carbonato de sódio 10% para posterior extração com 25,00ml de clorofórmio com auxílio do pistilo. A solução resultante foi filtrada com papel de filtro previamente umedecido com clorofórmio, e foi colocada em um funil de separação. Adicionou-se 7,00ml de ácido clorídrico 2% no funil de separação e foi agitado cuidadosamente, ficando em repouso até a separação completa das fases. Separou-se a fase aquosa ácida (superior) que contém os alcaloides na forma de sal, e essa solução foi utilizada para realizar as reações com os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand, colocando-se uma gota do reagente ao lado de outra da solução extrativa aquosa ácida em uma lâmina de microscópio e juntando-as, sendo o resultado positivo a formação de precipitado ou turvação da solução extrativa.

4.2.6. Glicosídeos Cardiotônicos

Colocou-se 5,0g da droga vegetal juntamente com 50,00ml de etanol:água (70:30, v/v) e submeteu-se a aquecimento em banho-maria durante 10 minutos. Esfriou-se a solução e filtrou com papel de filtro, logo completou-se o volume até 30,00ml, sendo o resíduo e o filtro lavado com a solução etanol:água.

Para a purificação, adicionou-se ao filtrado 30,00ml de água deionizada e 15,00ml de solução de Acetato de Chumbo 10%. Agitou-se e logo após deixar de repouso, filtrou-se em papel de filtro, e ao filtrado adicionou-se 10,00ml de solução de Fosfato Ácido de Sódio 10%, agitou-se e filtrou em papel de filtro. Transferiu-se o filtrado para funil de separação e a extração prosseguiu-se com Clorofórmio em duas etapas utilizando-se 15,00ml em cada etapa. Juntou-se as fases orgânicas (extrato clorofórmico), tratou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou até metade do volume.

Para a identificação dos Glicosídeos Cardiotônicos, fez-se três tipos de reações: Reações com o anel lactônico insaturado; Reações com os Desóxi-Açúcares e Reações com o núcleo esteroidal.

A) Reações com o anel lactônico insaturado

- **Reação de Legal**

Evaporou-se 2,00ml do extrato clorofórmico em tubo de ensaio, logo dissolveu-se o resíduo em 1,00ml de Piridina e acrescentou-se 0,5ml de solução de Hidróxido de Sódio 10% e 0,5ml de solução de Nitroprussiato de Sódio 10%. O resultado positivo é a coloração vermelha intensa (vinhosa).

- **Reação de Kedde**

Evaporou-se 2,00ml de extrato clorofórmico em tubo de ensaio, em seguida o resíduo foi dissolvido com 0,5ml do reagente de Kedde e logo foi acrescentado 1,00ml da mistura de solução de Hidróxido de Sódio 10% em Metanol 1:1 (v/v). O resultado positivo é coloração vermelha violácea até castanho.

A) Reações com os Desóxi-Açúcares

- **Reação de Pesez**

Evaporou-se 2,00 mL do extrato clorofórmico em tubo de ensaio e adicionou-se ao resíduo 1,00 ml do reagente de Pesez A , aquecendo-se aproximadamente a 100 °C

por 3 minutos. Esfriou-se e colocou o reagente de Pesez B, sendo o resultado positivo coloração vermelha.

- **Reação de Keller-Killiani**

Evaporou-se 2,00 mL do extrato clorofórmico em tubo de ensaio e logo o resíduo foi tratado com 1,00 mL de Ácido Acético, 2 gotas de solução de Cloreto Férrico 2% foram adicionadas e o conteúdo deste tubo foi transferido para outro tubo contendo 2,00 mL de Ácido Sulfúrico concentrado. O resultado positivo ocorre na zona de contato dos líquidos onde deve aparecer um anel castanho avermelhado, e a camada acética deve ter coloração verde-azulada.

A) Reações com o Núcleo Esteroidal

- **Reação de Liebermann-Burchard**

Em um tubo de ensaio 2,00 mL do extrato clorofórmico foram evaporados, e no resíduo foi adicionado 1,00 mL de anidrido acético e 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O resultado positivo se dá pelo aparecimento de coloração castanha.

4.3. Cromatografia em camada delgada

De muitos métodos cromatográficos disponíveis, a Cromatografia em camada delgada (CCD) é amplamente utilizada por sua rápida análise e preparações de drogas (WAGNER, 1996). Há muitas razões para isso:

- o tempo exigido para demonstração de muitos constituintes característicos da droga ser muito pequeno;
- para detecção qualitativa, a CCD também fornece informação semi-quantitativa do maior constituinte ativo da droga ou preparação da droga, deste modo capacitando uma avaliação da qualidade da droga. (WAGNER, 1996).

- **Análise por Cromatografia em Camada Delgada para detecção de flavonoides.**

Para confirmar a presença de Flavonoides, foi feita a análise por Cromatografia em Camada Delgada, utilizando como fase estacionária sílica gel e fase móvel Acetato

de Etila/Ácido Fórmico/ Ácido Acético Glacial/Água, nas seguintes proporções 100:11:11:27 (v/v/v/v), utilizando como revelador soluções de ácido bórico 3% e ácido oxálico 10% (15:5).

Após a realização dos testes, percebeu-se a interferência da grande presença de clorofila, portanto foi realizado um processo de purificação obtendo-se primeiramente o extrato metanólico, para posterior passagem deste extrato em uma coluna contendo algodão e carvão, podendo assim reter a clorofila, e obter resultados confiáveis.

- **Análise por Cromatografia em Camada Delgada para detecção de alcaloides.**

Alcalinizou-se o restante da solução extrativa aquosa ácida com Amônia diluída no funil de separação e adicionou-se 15,00ml de Clorofórmio, agitou-se e separou a fase clorofórmica contendo os alcaloides na forma de base livre. Após evaporação da solução extrativa clorofórmica até *secura*, ressuspendeu-se em 2,00ml de metanol e realizou-se a técnica de CCD com fase estacionária sílica gel GF₂₅₄ e fase móvel acetona:água:amônia (90:7:3, v/v/v), utilizando como revelador Dragendorff.

A técnica de CCD também foi empregada com objetivo de tentar identificar os grupos constituintes químicos presentes no extrato hidroetanólico e suas frações e no extrato acetato de etila.

4.3.1. Técnicas cromatográficas

Após a obtenção dos extratos e frações (item 4.1), foi preparada uma solução de cada amostra em uma concentração de 5mg/ml com determinados solventes (extrato hidroetanólico, fração acetato de etila e extrato acetato de etila: solvente acetato de etila; fração hexano, fração *n*-butanol e fração aquosa : solventes em proporções iguais de metanol:acetato de etila). Em seguida, empregou-se a técnica de CCD, em que foi desenvolvida com fase estacionária em placas de sílica gel comerciais de alumínio (60 F₂₅₄/Merck), utilizando sistemas de fase móvel diferente devido a especificidade dos extratos e frações testadas (Tabela 1).

Tabela 1: Fase móvel e reagentes utilizados para determinação de metabólitos secundários utilizando-se técnica de cromatografia em camada delgada.

Metabólito secundário	Fase móvel	Reagente utilizado
Flavonoides	<i>n</i> -butanol:ácido acético:água (63:33:4)	NP-PEG+UV
Alcaloides	<i>n</i> -butanol:ácido acético:água (70:28:2)	Dragendorff
Terpenos	<i>n</i> -hexano:ac. etila:isopropanol (70:28:2)	Anisaldeído sulfúrico
Taninos	ac. etila:ác. fórmico:água (90:10:10)	Solução etanólica de cloreto férrico 1%

4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.4.1. Preparo dos extratos vegetais

Os extratos e frações de *Azadirachta indica* A. Juss. obtidos no item 4.1 foram preparados em solução estoque de 2000µg/ml, utilizando como solvente o DMSO a 10% para as amostras extrato hidroetanólico, fração hexano, fração *n*-butanol e fração aquosa, e DMSO 20% para fração acetato de etila e extrato acetato de etila.

Para as bactérias testadas no laboratório do Prof. Dr. Carlos (UNIFRAN), sendo estas *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *Enterococcus faecalis*, os extratos e frações foram preparados em solução estoque de 1600µg/ml, utilizando solvente DMSO 20%.

Para os testes antifúngicos, os extratos e frações de *Azadirachta indica* foram diluídos nos seguintes solventes: extrato hidroetanólico e fração hexano – etanol 20% acrescido de Tween 10% ; fração acetato de etila – etanol 5% acrescido de Tween 10% ; fração *n*-butanol – etanol 20% ; fração aquosa – água ; extrato acetato de etila – etanol 10%.

4.4.2. Espectro de absorção dos extratos vegetais

Os extratos vegetais e frações que apresentam coloração foram adequadamente dissolvidos e submetidos à leitura em espectrofotômetro (Abs) num intervalo de leitura de 400 a 655nm, para a determinação do comprimento de onda de absorção.

Estas análises permitiram avaliar o melhor comprimento de onda utilizado nas leituras de absorbância para a determinação da CIM dos extratos e frações, sem a interferência da cor destes e do meio de cultura.

4.4.3. Micro-organismos utilizados

Tabela 2: Micro-organismos utilizados nos testes.

Micro-organismos	ATCC
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Streptococcus mutans</i>	25175
<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Enterococcus faecalis</i>	4082
<i>Candida albicans</i>	18804

Os testes para as cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara, sob supervisão da Profa. Dra. Taís Maria Bauab. Para as cepas *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e *Enterococcus faecalis* os testes foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca – UNIFRAN, sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

4.4.3.1. Estocagem e manutenção dos micro-organismos

As cepas bacterianas foram mantidas em caldo Müeller-Hinton acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20 °C. Para o uso, as cepas bacterianas foram repicadas em 2 mL de caldo Müeller-Hinton, incubados por 24 horas a 37 °C, e posteriormente foram

repicadas em meio sólido (Blood Agar Base), incubados por 24 horas a 37°C e mantidos em geladeira.

As culturas de *Candida albicans* foram semeadas em caldo Sabouraud dextrose (Difco) acrescido de 50% de glicerol e mantidos a -20°C. Para o uso, foi replicada em 2ml de Caldo Sabouraud dextrose e incubado a 37°C por 48h.

4.4.3.2. Preparo das substâncias controle positivo

Foram utilizados como controle positivo a ampicilina sódica a concentração de 1250µg/ml. Este antibiótico foi utilizado para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, sendo que as concentrações finais utilizadas foram: 39,06µg/ml para *Escherichia coli* e 3,9µg/ml para *Staphylococcus aureus*.

Para as bactérias *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. mutans* e *E. faecalis* o controle positivo utilizado foi Clorexidina a 59µg/ml para as três primeiras cepas e a 14,75µg/ml para a última cepa bacteriana.

Para o controle positivo da levedura foi preparada uma solução de fluconazol com concentração final de 16µg/ml e anfotericina B com concentração final de 0,125µg/ml.

4.4.3.3. Controle negativo

Para o controle negativo relacionado aos testes antibacterianos, foi utilizada solução aquosa de DMSO 10% e 20%.

Para os testes antifúngicos, foi preparado os controles negativos com os seguintes solventes: etanol 20% + tween 10% ; etanol 5% + tween 10% ; etanol 20%; água ; etanol 10%.

4.4.3.4. Preparo e padronização das suspensões bacterianas e fúngica

4.4.3.4.1. Suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram padronizadas adicionando-se uma cultura preparada a partir do crescimento bacteriano decorrido de 24 horas em caldo MH a 37°C e, posteriormente, após agitação, uma alíquota da suspensão foi transferida para outro tubo contendo solução salina estéril (PBS) até atingir uma turvação comparável à

suspensão do tubo da Escala McFarland correspondente 0,5 unidade (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

A seguir, foi realizada a leitura espectrofotométrica a 620 nm com absorbância na faixa de 0,10 a 0,15, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Posteriormente, foi diluído 1/10 em tubo com solução salina estéril (PBS), obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ UFC/ml utilizada nos ensaios.

O inóculo das bactérias *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *E. faecalis* foi ajustado para uma concentração de 5×10^5 UFC/ml (LAMOUNIER, 2011).

4.4.3.4.2. Suspensão fúngica

Culturas de 48 horas cultivadas em caldo Sabouraud dextrose foram transferidas para solução PBS pH 7,2 e ajustada a turbidez até a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente 5×10^6 UFC/ml) que foi confirmada por leitura espectrofotométrica a 530 nm com valor de absorbância entre 0,12 a 0,15, como confirmação da concentração das leveduras. Em seguida, foi diluída 1:100, seguida de outra diluição 1:20, em PBS, até atingir a concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/ml, que foi, então, utilizada nos testes (CLSI, 2008).

4.4.3.5. Determinação da atividade antibacteriana (CLSI, 2006)

4.4.3.5.1. Realização do teste

Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando a técnica de diluição em microplacas, segundo a Norma M7-A6 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com modificações.

4.4.3.5.1.1. Método de diluição em microplacas

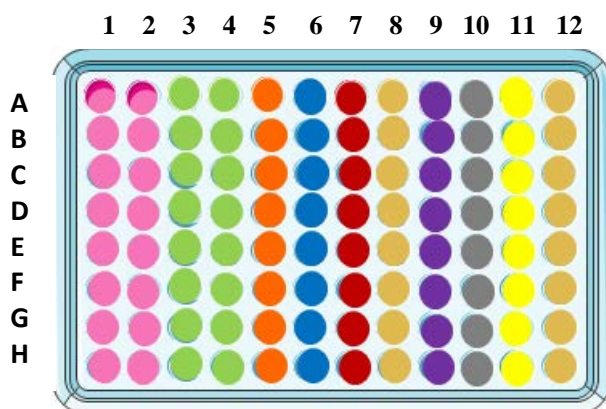
Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 μ L de CMH. Em seguida foram acrescentados 100 μ L das soluções dos extrativos vegetais e realizada

a diluição seriada de 1000 a 7,8 μ g/ml para os extratos à concentração de 2000 μ g/ml e de 400 a 0,19 μ g/ml para a concentração de 1600 μ g/ml. Adicionalmente foram distribuídos 20 μ L das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado a ampicilina para as cepas de *S. aureus* e *E.coli* e clorexidine para *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *E. faecalis* sendo este usado em concentrações adequadas para cada micro-organismo, visando alcançar a concentração inibitória mínima (CIM). Também foram realizados o controle do meio de cultura, de crescimento bacteriano, dos extrativos vegetais e o controle negativo (solventes).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Em cada microplaca foram testados dois extrativos vegetais em duplicata. Os testes foram realizados em triplicata.

A figura 3 esquematiza os testes realizados:

Figura 3: Representação esquemática do teste de diluição em microplaca.



- **Colunas 1 e 2:** Testes: meio de cultura + amostra vegetal + bactérias.
- **Colunas 3 e 4:** Testes: meio de cultura + amostra vegetal + bactérias.
- **Colunas 5:** Controle positivo: meio de cultura + antibiótico + bactérias.
- **Coluna 6:** Controle negativo: meio de cultura + solvente + bactérias.
- **Coluna 7:** Meio de cultura Müeller- Hinton + bactérias.
- **Coluna 8:** Meio de cultura Müeller- Hinton.
- **Coluna 9:** {
- **Coluna 10:** { Controle das amostras vegetais: meio de cultura + amostras vegetais
- **Coluna 11:** Meio de cultura Müeller- Hinton + solvente.
- **Coluna 12:** Meio de cultura Müeller- Hinton .

Referente as cepas bacterianas *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *E. faecalis*, foi utilizada a mesma técnica de diluição em microplaca, realizadas em triplicata, com concentração estoque das amostras de 1600µg/ml, tendo como controle positivo clorexidina a 59µg/ml (para as três primeiras cepas) e a 14,75µg/ml (*E. faecalis*), sendo o controle negativo o DMSO 20%.

4.4.3.5.2 Leitura do teste

4.4.3.5.2.1. Leitura espectrofotométrica

Ao término da incubação, as microplacas em que foram testadas *S. aureus* e *E. coli*, foram submetidas à leitura em leitor de microplacas a 595nm, onde obtiveram seus valores registrados, para a avaliação da atividade antibacteriana e CIM (ELLOF, 1998; NCCLS, 2003). Para as demais cepas (*S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *E. faecalis*), não foi realizada leitura espectrofotométrica mas sim a leitura colorimétrica.

4.4.3.5.2.2.1. Cálculo da viabilidade microbiana

A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a viabilidade microbiana para cada micro-organismo. Esta foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações das substâncias testadas (extratos e frações), para cada micro-organismo de acordo com a equação (GUDIÑA, 2010):

$$\% \text{ inibição de crescimento microbiano} = [1 - (A_c / A_0)] \times 100$$

Em que A_c = Absorbância do poço contendo a amostra vegetal,

A_0 = Absorbância crescimento bacteriano (controle crescimento)

4.4.3.5.2.3. Leitura com revelador

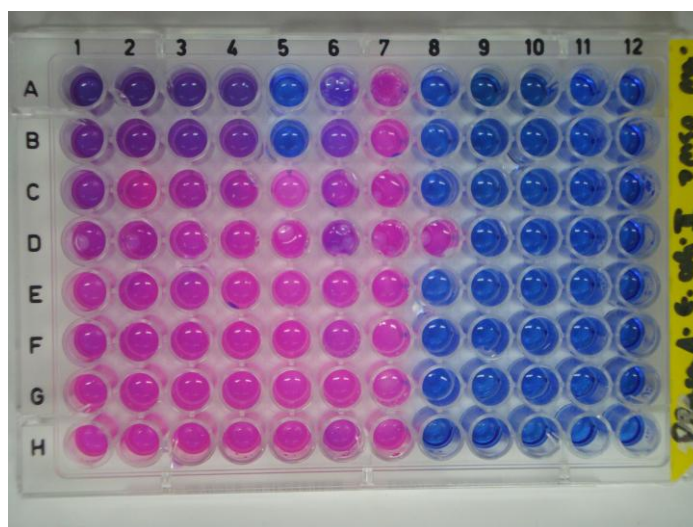
Segundo Palomino et al. (2002) e Montejano et al. (2005), a resazurina é um revelador diferencial que permite avaliar de forma relativa a viabilidade, contaminação bacteriana e a atividade antimicrobiana em função da mudança de cor no corante. A manutenção da coloração azul nos orifícios foi interpretada como ausência de

crescimento bacteriano e, o desenvolvimento de cor rosa como presença de crescimento bacteriano.

Após a leitura espectrofotométrica, adicionou-se 30 μ L em todos os orifícios das microplacas, uma solução de resazurina com concentração de 0,5 μ g/5ml em água miliQ. A resazurina é um indicador de oxirredução, em que se apresenta de coloração azul em meio oxidado e de coloração rósea em meio reduzido. Posteriormente, as microplacas foram incubadas em estufa à temperatura de 37°C, por no máximo duas horas, para a viragem de coloração. A CIM foi então determinada e definida como a menor concentração da amostra vegetal capaz de impedir a mudança de cor, ou seja, de inibir o crescimento celular (PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO et al., 2005).

A seguir uma imagem dos testes realizados após a revelação com resazurina (Figura 4).

Figura 4: Teste realizado com a bactéria *Escherichia coli* revelada com resazurina.



4.4.3.6. Determinação da atividade anti-*Candida* (CLSI, 2008)

4.4.3.6.1. Realização do teste

A avaliação da atividade antifúngica e determinação da CIM foram realizadas pela técnica de microdiluição de acordo com a metodologia descrita segundo a Norma M27-A3 da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

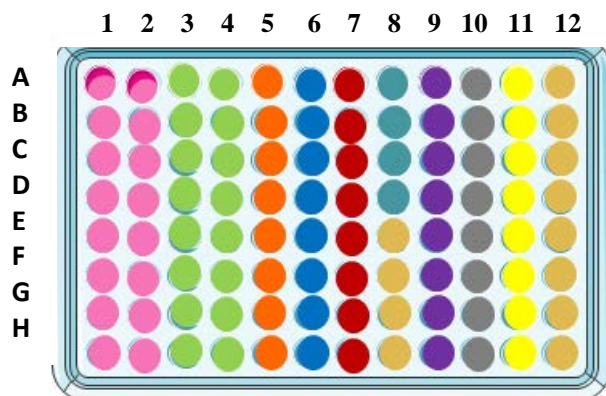
4.4.3.6.1.1. Método de diluição em microplacas

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 μ L de RPMI-1640 (tamponado com MOPs) para *C. albicans*. Em seguida, foram acrescentados 100 μ L das soluções dos extrativos vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 μ g/ml. Adicionalmente foram distribuídos 100 μ L da suspensão de levedura em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B e o fluconazol, de concentrações 0,063 μ g/ml e 4 μ g/ml respectivamente. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extrativos vegetais e o controle negativo (solventes).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Em cada microplaca foram testados dois extrativos vegetais em duplicata. Os testes foram realizados em triplicatas.

A figura 5 apresenta o esquema de uma das placas dos testes com *C. albicans*.

Figura 5: Esquema da técnica de microplaca para *Candida albicans*.



- Colunas 1 e 2:** Testes: meio de cultura + amostra vegetal + leveduras.
- Colunas 3 e 4:** Testes: meio de cultura + amostra vegetal + leveduras.
- Coluna 5:** Controle positivo: meio de cultura + fluconazol + leveduras.
- Coluna 6:** Controle negativo: meio de cultura + solvente (Etanol 20% + Tween 80 10%)+ leveduras.
- Coluna 7:** Meio de cultura RPMI + leveduras.
- Coluna 8 (A a D):** Controle positivo: meio de cultura + anfotericina B + leveduras.
- Coluna 8 (E a H):** Meio de cultura RPMI.
- Coluna 9:** }
- Coluna 10:** } Controle das amostras vegetais: meio de cultura + amostras vegetais
- Coluna 11:** Meio de cultura + solvente (Etanol 20% + Tween 80 10%).
- Coluna 12:** Meio de cultura RPMI.

4.4.3.6.2. Leitura do teste

4.4.3.6.2.1. Visual

A leitura visual das microplacas foi feita imediatamente após a retirada das placas da estufa, 48 horas após a realização dos testes. Esta leitura é feita observando-se a turvação dos orifícios, sendo que a turvação representa crescimento microbiano, e o orifício límpido representa que não houve crescimento microbiano.

4.4.3.6.2.2. Leitura espectrofotométrica

Ao término da incubação, as microplacas foram submetidas à leitura em leitor de microplacas a 595nm, onde obtiveram seus valores registrados, para a avaliação da atividade antibacteriana e CIM.

4.4.3.6.2.2.1. Cálculo da viabilidade microbiana

A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a viabilidade microbiana para cada micro-organismo. Esta foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações das substâncias testadas (extratos e frações), para *C. albicans* de acordo com a equação (GUDIÑA, 2010):

$$\% \text{ inibição de crescimento microbiano} = [1 - (A_c / A_0)] \times 100$$

Em que A_c = Absorbância do poço contendo a amostra vegetal,

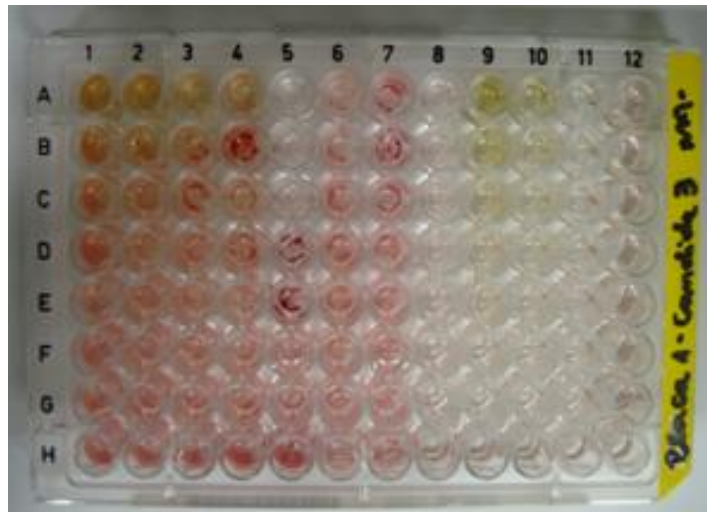
A_0 = Absorbância crescimento bacteriano (controle crescimento)

4.4.3.6.2.3. Revelação Colorimétrica

A avaliação colorimétrica foi realizada utilizando cloreto de trifetil tetrazólico (TTC) como revelador a uma concentração de 2%. Com o uso desse revelador os poços que apresentam atividade permanecem incolores, enquanto os poços onde há crescimento microbiano se coram de vermelho. (DUARTE, 2005).

A figura abaixo mostra o resultado para a revelação com TTC para a levedura *Candida albicans* (Figura 6).

Figura 6: Teste realizado com *Candida albicans* revelado com TTC.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Triagem Fitoquímica

Os resultados obtidos na triagem fitoquímica estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Triagem fitoquímica da droga vegetal obtida de *Azadirachta indica*.

Metabólito secundário	Resultados
Saponinas	+
Taninos	→ Gelatina 2,5% - → Cloreto Férrico 1% -
Flavonoides	+
Antraquinonas	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-
Alcaloides	-

Os resultados dos testes confirmam a presença de flavonoides e saponinas, o que justifica esta espécie possuir atividades biológicas como anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, antivirais, entre outras.

Dentre os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais, as saponinas constituem uma das classes de maior destaque devido à sua ampla distribuição no reino vegetal e suas importantes atividades biológicas (SCHENKEL et al., 2003).

Flavonoides são compostos polifenólicos naturais largamente distribuídos nos vegetais superiores (angiospermas), principalmente. Muitos deles apresentam atividade biológica como, por exemplo, podem-se citar as atividades antioxidantes, anti-inflamatória, antibacteriana e tanante (PACKER, 2007). Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas. Dentre elas podem-se citar: a) proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias; b) atração de animais com finalidade de polinização; c) antioxidantes; d) controle da ação de hormônios vegetais; e) agentes alelopáticos; e f) inibidores de enzimas (HARBORNE, 1989; HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Portanto, destaca-

se a presença desta classe de metabólitos secundários na planta estudada tendo como base todas as atividades atribuídas a este composto.

Plantas que contém compostos ativos, nomeados fenólicos e polifenólicos, tem aumentado o interesse público em seu potencial como antioxidante. Compostos fenólicos constituem um grande, heterogêneo grupo de metabólito secundário derivados de fenilalanina ou tirosina e extensivamente distribuída no reino das plantas. Há numerosos estudos que provam a relação positiva de consumo de frutos e vegetais contendo fenólicos para a prevenção de doenças relacionadas com o envelhecimento causadas pelo estresse oxidativo (LING, 2010).

5.2. Cromatografia em camada delgada

Os resultados apresentados foram obtidos de acordo com cada fase móvel e reveladores seletivos para cada metabólito secundário. Estes resultados foram positivos para terpenos (figura 7A) no extrato acetato de etila; e as frações oriundas do extrato hidroetanólico, sendo estas hexano e fração acetato de etila e podendo observar algumas manchas claras no extrato hidroetanólico; flavonoides (figura 7B) no extrato acetato de etila, extrato hidroetanólico e suas frações hexano, *n*-butanol, acetato de etila e aquosa. Para taninos (figura 7C), pode considerar o resultado como sendo negativo mesmo que observado algumas manchas azuis na fração acetato de etila, que provavelmente se deve a presença de outros fenólicos, ou então há taninos, porém em baixa concentração, pois na triagem fitoquímica, os resultados para os testes de precipitação foram negativos.

Observando a composição dos extratos e frações, pode-se dizer que o extrato acetato de etila, extrato hidroetanólico, a fração hexano e acetato de etila oriundas do extrato hidroetanólico foram as amostras que apresentaram em sua composição terpenos e flavonoides. A fração *n*-butanol e aquosa obtiveram resultado positivo apenas para flavonoides, desta forma observa-se a diferença de composição dos extratos e frações testadas.

Este resultado confirma com o estudo realizado por Mossini & Kimmelmeier (2005), em que descreve a presença de terpenos e compostos fenólicos.

Corroborando com os testes fitoquímicos, as amostras testadas não apresentaram resultado positivo para alcaloides (figura 7D), sendo que estes podem ter sido perdidos durante a etapa de fracionamento, ou os solventes utilizados na preparação dos extratos (álcool 70% e acetato de etila) não foram capazes de extrair essa classe de metabólitos.

Figura 7: Perfil cromatográfico de metabólitos secundários em *A. indica* por cromatografia em camada delgada. A) terpenos no extrato acetato de etila, fração hexano e fração acetato de etila. (Fase móvel: *n*-hexano:acetato de etila:isopropanol / 70:28:2. Revelador anisaldeído sulfúrico). B) Flavonoides no extrato hidroetanólico, extrato acetato de etila, frações *n*-butanol, hexano, acetato de etila e aquosa. (Fase móvel: *n*-butanol:ácido acético:água / 63:33:4. Revelador NP-PEG). Amostras na sequência da esquerda para direita: EBH – extrato bruto hidroetanólico; EAE – extrato acetato de etila; FB – fração *n*-butanol; FH – fração hexano; FAE – fração acetato de etila; FAQ – fração aquosa.

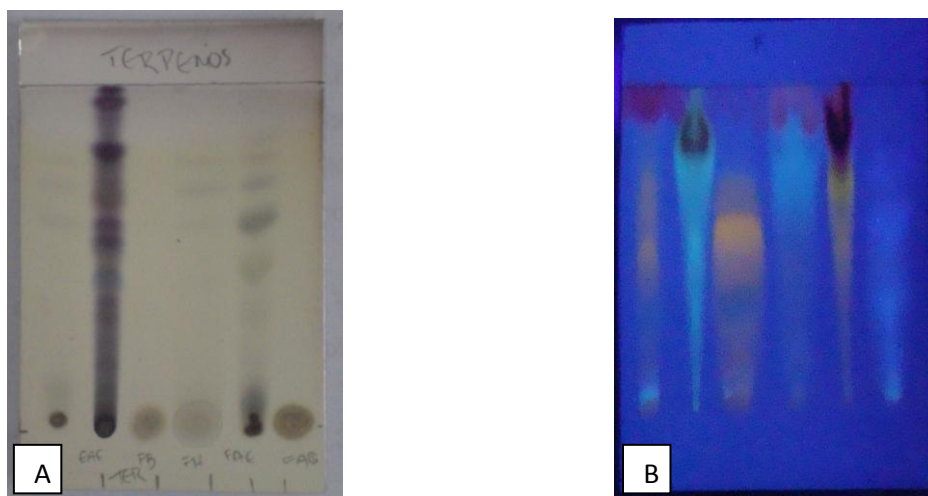
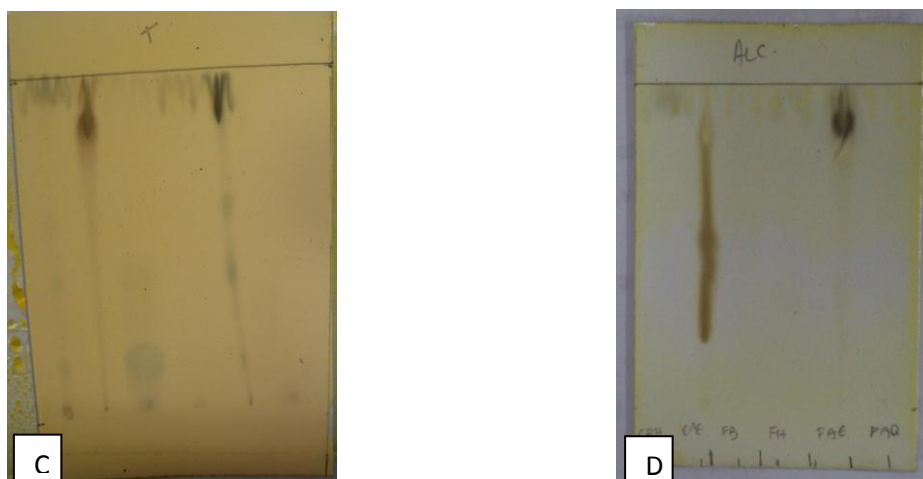


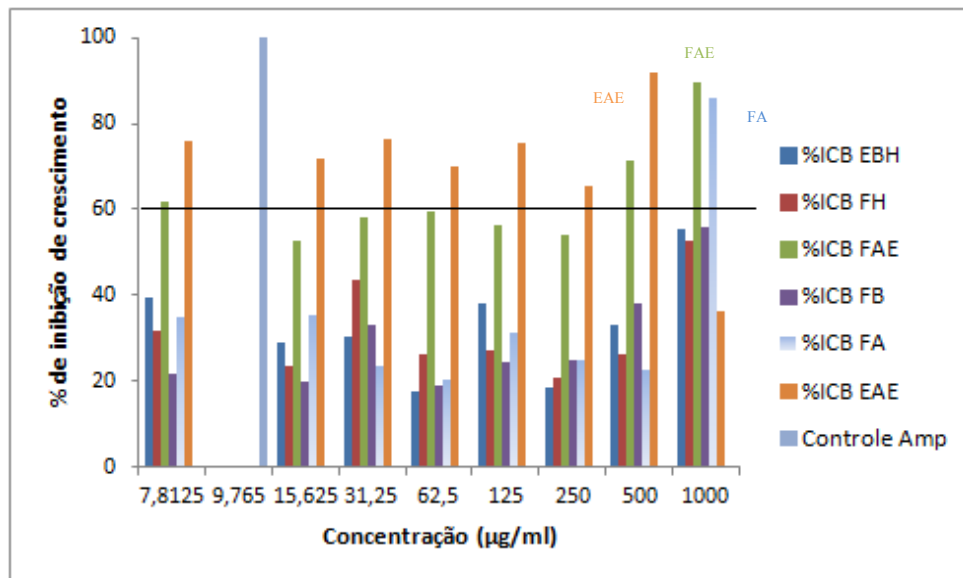
Figura 7: Perfil cromatográfico de metabólitos secundários em *A. indica* por cromatografia em camada delgada. C) Taninos: Placa revelada com solução etanólica de cloreto férrico 3%, porém com resultado negativo (Fase móvel: acetato de etila:ácido fórmico:água / 90:10:10). D) Alcaloides: Placa revelada com revelador Dragendorff, porém com resultado negativo (Fase móvel: *n*-butanol:ácido acético:água / 70:28:2). Amostras: EBH – extrato bruto hidroetanólico; EAE – extrato acetato de etila; FB – fração *n*-butanol; FH – fração hexano; FAE – fração acetato de etila; FAQ – fração aquosa.



5.3. Atividade antimicrobiana

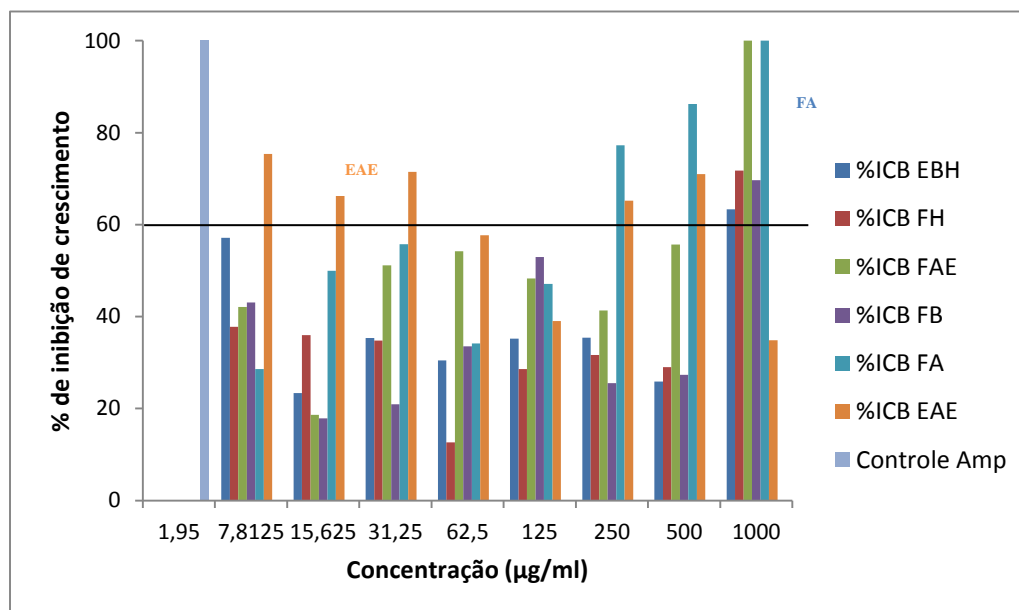
5.3.1. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas com leitura espectrofotométrica.

Figura 8: Atividade anti-*E. coli* do extrato hidroetanólico e suas frações e o extrato acetato de etila.



EBH – Extrato bruto hidroetanólico; FH – Fração hexano; FAE – Fração acetato de etila; FB – Fração *n*-butanol; FA – Fração aquosa; EAE – Extrato acetato de etila; Controle Amp – Controle Ampicilina

Figura 9: Atividade anti-*S. aureus* do extrato hidroetanólico e suas frações e o extrato acetato de etila.



EBH – Extrato bruto hidroetanólico; FH – Fração hexano; FAE – Fração acetato de etila; FB – Fração *n*-butanol; FA – Fração aquosa; EAE – Extrato acetato de etila; Controle Amp – Controle Ampicilina

Considerando-se uma boa atividade antibacteriana, quando há inibição de crescimento acima de 60% segundo a padronização adotada no laboratório de microbiologia, pode-se constatar que a amostra vegetal com maior atividade frente a *E. coli* foi o extrato acetato de etila, apresentando inibição de crescimento em todas as concentrações; seguida da fração acetato de etila com porcentagem de inibição até a concentração de 500µg/ml e pela fração aquosa com atividade a concentração de 1000µg/ml, porém nas demais concentrações não obteve atividade relevante. Com isso pode-se dizer que as amostras testadas com acetato de etila como líquido extrator apresentaram maior atividade contra *E. coli*. Sendo assim, a purificação dessas amostras pode levar a determinação de uma substância ativa, podendo ser estudado para um futuro medicamento fitoterápico.

Frente a *S. aureus*, o extrato acetato de etila apresentou uma atividade moderada em algumas concentrações, a fração aquosa apresentou uma atividade boa nas concentrações de 1000µg/ml, 500µg/ml e 250µg/ml, e a fração acetato de etila apresentou uma inibição somente na concentração de 1000µg/ml.

Observa-se que, para *E. coli* e *S. aureus*, foram as mesmas amostras que apresentaram resultados consideráveis (extrato acetato de etila, fração aquosa e fração acetato de etila), fazendo-se uma ressalva de que o solvente extrator utilizado na fração

e no extrato bruto acetato de etila pode ter extraído substâncias semelhantes, pois estas duas amostras apresentaram atividade contra ambas as cepas.

5.3.2. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador.

Portanto, a CIM foi definida como a menor concentração dos extratos e frações capaz de impedir a mudança de coloração azul para a rósea.

Tabela 4: Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) em $\mu\text{g/ml}$ para *S. aureus*, *E. coli*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. mutans* e *E. faecalis*, pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador.

Micro-organismo	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. faecalis</i>
Extrato hidroetanólico	>1000	>1000	400	≥ 400	≥ 400	50
Fração hexano	>1000	>1000	200	≥ 400	400	>400
Fração acetato de etila	>1000	>1000	100	400	400	>400
Fração <i>n</i> -butanol	>1000	>1000	50	100	50	>400
Fração aquosa	>1000	>1000	400	≥ 400	≥ 400	25
Extrato acetato de etila	>1000	>1000	50	100	50	>400
Ampicilina	1,950	9,765	-	-	-	-
Clorexidina	-	-	3,688	3,688	19,530	14,75

Segundo Sartoratto et al. (2004) é considerada uma atividade forte quando CIM apresenta valores entre 50 - 500 $\mu\text{g/ml}$, atividade moderada para valores de CIM de entre 600 - 1500 $\mu\text{g/ml}$ e uma fraca atividade acima 1500 $\mu\text{g/ml}$. Sendo assim, pode-se dizer que os dois extratos e as frações testadas apresentam atividade moderada, pois obtiveram CIM > 1000 $\mu\text{g/ml}$.

O fato de haver porcentagens de inibição significativas em concentrações muito baixas dos extratos, sendo que concentrações maiores do mesmo não apresentaram atividade inibitória, pode ser devido ao desenvolvimento lento do micro-organismo por este não se encontrar em condições adequadas de sobrevivência (fatores intrínsecos ao

micro-organismo) ou por falha em sua manipulação, porém, nesses casos, não se considera esse retardo do crescimento como atividade do extrato estudado.

Existem vários fatores que podem interferir qualitativamente e quantitativamente nos resultados, na presença dos metabólitos, na atividade antimicrobiana, e um desses fatores pode ser a sazonalidade, podendo considerar o período de coleta das folhas, que pode não ser o período de maior produção dos metabólitos ativos contra estes micro-organismos estudados, sendo assim, sugere-se um estudo mais aprofundado, podendo iniciar o estudo realizando os testes em todas as estações e épocas do ano.

Segundo o estudo de Moraes (2006), o teste de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica foi o mais sensível, já que demonstrou valores de CIM menores para os extratos vegetais para a maioria dos micro-organismos testados. Entretanto, essa metodologia pode apresentar alguns interferentes na leitura como uma possível sedimentação do extrato ou da suspensão bacteriana.

Em concordância com a literatura pode-se verificar que as técnicas de diluição em microplacas são adequadas para tais ensaios enfatizando a grande vantagem de se utilizar volumes reduzidos, principalmente em relação aos produtos de origem vegetal que geralmente são extraídos em pequenas quantidades. Um dos poucos inconvenientes que essas técnicas de microdiluição apresentam é em relação à leitura realizada em leitor de microplacas que pode apresentar variação dada a sensibilidade do equipamento além do custo para aquisição do mesmo (MORAES, 2006).

Segundo Rios & Recio (2005), o maior problema com as pesquisas sobre atividade antimicrobiana ainda continua sendo a falta de uniformidade nos critérios selecionados para avaliar tal atividade. Isso frequentemente leva a relevantes contradições entre os resultados obtidos por diferentes grupos e mesmo para os mesmos autores estudando a mesma amostra com diferentes métodos.

Em um estudo feito por Moraes (2006), os resultados obtidos nas técnicas utilizadas, sendo elas diluição em microplacas (com leitura espectrofotométrica e leitura visual colorimétrica) e diluição em tubos, observou-se diferença entre estes resultados, em que a diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica foi a mais sensível, já que demonstrou valores de CIM menores para os extratos vegetais para a maioria dos micro-organismos testados.

De acordo com Gibbons (2004) e Van Vuuren (2008), extratos brutos de produtos naturais com um CIM abaixo de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados relevantes e extratos com um CIM abaixo de $100\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados promissores como agentes potenciais antimicrobianos. Portanto, pode-se dizer que a fração *n*-butanol e o extrato acetato de etila obtiveram um resultado extremamente promissor com um CIM = $50\mu\text{g mL}^{-1}$ frente às cepas *S. mitis* e *S. mutans*. Estas mesmas amostras apresentaram CIM = $100\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. sanguinis*, sendo também considerada como potencial promissor. Para *S. mitis*, a fração hexano apresentou CIM = $200\mu\text{g mL}^{-1}$ podendo ser considerada relevante, o extrato hidroetanólico e fração aquosa apresentaram um CIM = $400\mu\text{g mL}^{-1}$, tendo também um resultado considerável.

Para *S. sanguinis* a fração acetato de etila apresentou CIM = $400\mu\text{g mL}^{-1}$, extrato hidroetanólico, fração hexano e fração aquosa apresentaram CIM $\geq 400\mu\text{g mL}^{-1}$, também podendo ser considerados como agentes antimicrobianos relevantes. Para *S. mutans* a fração hexano e fração acetato de etila apresentaram um CIM = $400\mu\text{g mL}^{-1}$, extrato hidroetanólico e fração aquosa CIM $\geq 400\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo também um resultado importante.

Sendo assim, os resultados corroboram com Patel & Venkatakrishna-Bhatt (1988), que diz que o extrato de *A. indica* é um poderoso agente inibidor contra o aumento e estabelecimento de micro-organismos que causam doenças infecciosas na cavidade bucal, sendo que *S. mutans* é o principal agente causador da cárie.

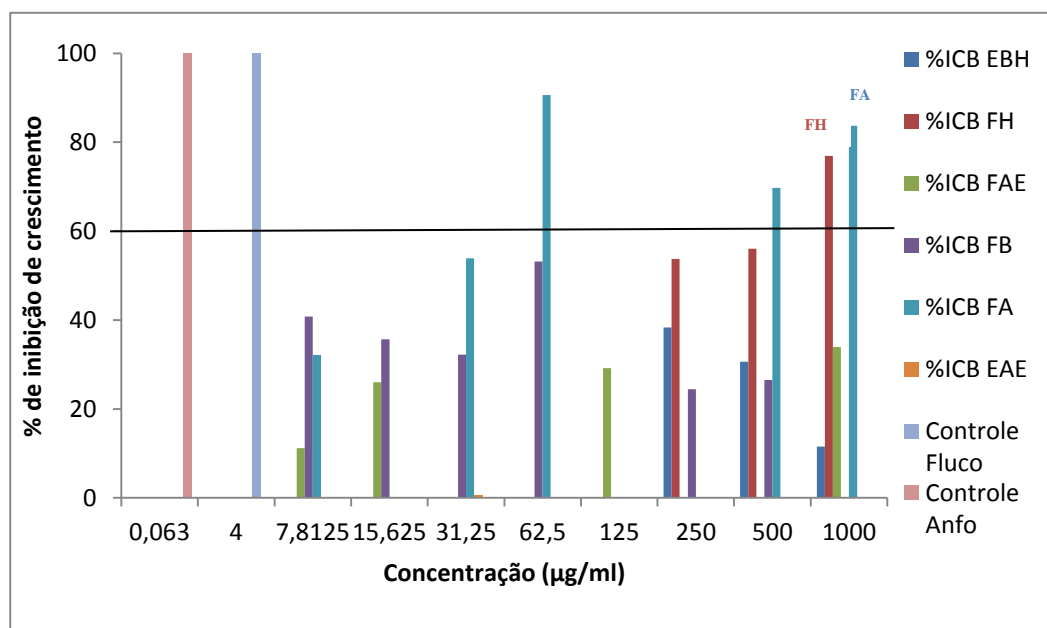
Os resultados obtidos para *E. faecalis* das amostras referente ao extrato hidroetanólico e a fração aquosa foram promissores, pois apresentou, respectivamente, um valor de CIM = $50\mu\text{g mL}^{-1}$ e CIM = $25\mu\text{g mL}^{-1}$, destacando as atividades destas amostras vegetais para esta cepa. Os restantes das amostras apresentaram um CIM $> 400\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo considerados relevantes.

Com isso, pode-se incentivar a continuação deste estudo com as referidas cepas, que comprovaram a atividade antimicrobiana desta planta para estas bactérias.

5.3.3. Determinação da atividade antifúngica e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas com leitura espectrofotométrica.

Abaixo segue a figura referente ao resultado de porcentagem de inibição de crescimento fúngico dos extratos e frações testadas, sob leitura espectrofotométrica.

Figura 10: Atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico e suas frações e o extrato acetato de etila frente a *Candida albicans*.



Legendas das amostras:

EBH – Extrato bruto hidroetanólico; FH – Fração hexano; FAE – Fração acetato de etila; FB – Fração *n*-butanol; FA – Fração aquosa; EAE – Extrato acetato de etila; Controle Fluco – Controle Fluconazol; Controle Anfo – Controle Anfotericina

Considerando-se uma boa atividade antifúngica, quando há inibição de crescimento acima de 60% segundo a padronização adotada no laboratório de microbiologia, a amostra vegetal que obteve um resultado mais promissor foi a fração aquosa seguido da fração hexano. Os restantes das amostras vegetais testadas não obtiveram uma atividade significativa.

5.3.4. Determinação da atividade antifúngica e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas utilizando TTC como revelador.

Esse revelador mostra onde há atividade os poços permanecem incolores, enquanto onde há crescimento microbiano os orifícios se coram de vermelho. (DUARTE, 2005).

Os resultados obtidos com revelador TTC a 2% encontram-se na tabela 5.

Tabela 5: Determinação da atividade antifúngica contra *Candida albicans* e da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a técnica de diluição em microplaca e TTC como revelador.

CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)							
Extrato hidroetanólico	Fração hexano	Fração acetato de etila	Fração <i>n</i> -butanol	Fração aquosa	Extrato acetato de etila	Fluconazol	Anfotericina B
>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	4	0,063

Não existe um padrão de nível de inibição aceitável nos produtos naturais quando comparados com antifúngicos padrões (BRAGA, et al., 2011), então um estudo feito por Aligianis et al. (2001), propôs a classificação dos materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como forte inibição um CIM até $500\mu\text{g mL}^{-1}$, inibição moderada um CIM entre 600 e $1500\mu\text{g mL}^{-1}$ e como fraca inibição um CIM acima de $1600\mu\text{g mL}^{-1}$, portanto, pode-se considerar que todas as amostras vegetais testadas contra *C. albicans* apresentaram inibição moderada apresentando um CIM $> 1000\mu\text{g mL}^{-1}$.

Segundo um estudo feito por Polaquini (2005), o extrato aquoso de *Azadirachta indica* não inibiu o crescimento de cepas como *C. albicans* em concentrações de $0,1\text{g/ml}$. Neste estudo, como pode ser observado na tabela 6, todas as amostras vegetais testadas apresentaram CIM $> 1000\mu\text{g mL}^{-1}$.

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico e a análise realizada pela técnica de cromatografia em camada delgada detectou a presença de metabólitos responsáveis pela atividade antibacteriana e antifúngica, e para garantir a identidade e qualidade da planta estudada.

Pode-se dizer que ocorre a presença de flavonoides, saponinas e terpenos, sendo os dois primeiros confirmados também com os resultados obtidos na triagem fitoquímica.

A atividade antibacteriana de *Azadirachta indica* pode ser comprovada frente às bactérias orais, como *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguinis*, tendo encontrado valores de CIM relevantes especificamente para *S. mitis* e *S. mutans*, referente a fração *n*-butanol e extrato acetato de etila, podendo dizer que, para estas duas cepas, estas amostras possuem alguns compostos ativos que provocaram a inibição de seus crescimentos. Estes resultados incentivam a continuidade do estudo, podendo isolar esta substância para um posterior desenvolvimento de medicamento fitoterápico.

Destaca-se a atividade da fração aquosa e do extrato hidroetanólico frente a *E. faecalis*, com um CIM = 25 µg mL⁻¹ e CIM = 50 µg mL⁻¹, respectivamente, dando ênfase nestes valores de concentrações de inibição de crescimento.

Sugere-se a continuação deste estudo com propósitos de otimizar a técnica de cromatografia em camada delgada no extrato hidroetanólico e suas frações e no extrato acetato de etila, com objetivo de identificar e separar compostos ativos presentes, utilizando condições seletivas e específicas para cada amostra e metabólito secundário.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 113-123. 2001.

AJAYI, F. A. Formulation and promotion of neem – seed derived Biopesticides as alternative to persistent organic pollutants (POPs) for the control of vegetable crop pests. In: Ukwe CN, Folorunso AO, Ibe AC, Z Z, N. E. S. NES, Sieghart L (eds) Sustainable industrial utilization of neem tree (*Azadirachta indica*) in Nigeria. UNIDO Regional Development Centre, Lagos, pp. 83-90. 2002.

ALBUQUERQUE, U. P. The use of medicinal plants by the cultural descendants of African people in Brazil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 20, p. 139-144. 2001.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, E. G. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos brutos de *Miconia rubiginosa* e *Miconia fallax*. Estudo comparativo de quatro técnicas de “screening”. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Química Biológica) – Universidade de Franca, Franca, 2006.

ALVES, P. D.; BRANDÃO, M. G. L.; NUNAN, E. A.; VIANNA-SOARES, C. D. Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2B, p. 510-515. 2009.

ALZOREKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 223-230. 2003.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992-1000. 2010.

Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U 2002. Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*). *Curr Sci India* 82: 1336-1345.

BRAGA, T. V.; PINTO, J. T.; BARROS, M. E. S.; OLIVEIRA, T. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Atividade antifúngica das folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* frente a *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. **RBAC.**, v. 43, n. 3, p. 222-225, 2011.

BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D.; ORIANI, M. A. G. Efeito de genótipos de Tomateiro e de extratos aquosos de folhas de *Melia azedarach* e de sementes de *Azadirachta indica* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical Entomology.**, v. 39, n. 5, p. 784-791. 2010.

CAMPANA, E. H.; CARVALHAES, C. G.; BARBOSA, P. P.; MACHADO, A. M. O.; PAULA, A. M.; GALES, A. C. Avaliação das metodologias M.I.C.E.[®], Etest[®] e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.**, v. 47, n. 2, p. 157-164, 2011.

CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. A.; SANTANA, L. C. L. R.; SOUSA, A. P. L.; NETO, J. M. M.; CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A. Juss.). **Biological Research.**, v. 45, n. 2, p. 111-116. 2012.

CARVALHO, C. M.; MACEDO-COSTA, M. R.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; CARVALHO, L. F. P. C.; COSTA, L. J. *In vitro* antimicrobial effect of jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg] extract on *Streptococcus* from the oral cavity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, v. 11, n. 1, p. 79-83. 2009.

CHAND, S.; LUSUNZI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P. Rapid screening of antimicrobial activity of extracts and natural products. **Journal Antibiotics.**, v. 47, p. 1295-1304, 1994.

CHATTOPADHYAY, R. R.; BHATTACHARYYA, S. K.; MEDDA, C.; CHANDA, S.; BAG, A. A comparative evaluation of antibacterial potential of some plants used in Indian traditional medicine for the treatment of microbial infections. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, v. 52, n. 5, p. 1123-1128. 2009.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards - 6^a ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility tests for yeasts; approved standards, CLSI document M27-A3, Wayne, PA., 2008.

CONNOLLY, J. D. Chemistry of the Limonoids of the Meliaceae and Cneoraceae. In: WATERMAN, P. G.; GRUNDON, M. F. (ed.). Chemistry and chemical taxonomy of the rutales. London: Academic, 1983. p. 175.

CONSERVA, A. M. Constituintes químicos e ensaios farmacológicos de *Aristolochia Birastris* Ducht. 1985. 192f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1985.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHRE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal Ethnopharmacology.**, v. 106, n.3, p. 290-302. 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia: farmacognosia experimental.** 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 3, p. 303, 308-309.

COWAN, M. M. Plant products and antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 12, n. 4, p. 564-582. 1999.

CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. Lawrence, Printed by Allen Press, Inc., 555p.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v. 33, p. 166-168, 2002.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology.**, v. 88, n. 2, p. 308-316. 2000.

DRAUGHON, F. A. Use of botanicals as biopreservatives in foods. **Food Technology.**, v. 58, n. 2, p. 20-28. 2004.

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, p.305-311. 2005.

EGUSA, H.; ELLEPOLA, A. N. B.; NIKAWA, H.; HAMADA, T.; SAMARANAYAKE, L. P. Sub-therapeutic exposure to polyene antimycotics elicits a post-antifungal effect (PAFE) and depresses the cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans* isolates. **Journal of Oral Pathology & Medicine.**, v. 29, n. 5, p. 206-213. 2000.

ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. The effect of limited exposure to antimycotics on the relative cell-surface hydrophobicity and the adhesion of oral *Candida albicans* to buccal epithelial cells. **Archives of Oral Biology.**, v. 43, n. 11, p. 879-887. 1998.

ELOFF, J. N. A proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts – a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care. **South African Journal of Science.**, v. 96, p. 116 – 118. 2000.

FERREIRA, F. S.; SANTOS, S. C.; BARROS, T. F.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de *Rhizophora mangle* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**, v. 13, n. 3. p. 305-310. 2011.

FILOCHE, S. K.; SOMA, K.; SISSONS, C. H. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidine digluconate. **Oral Microbiology and Immunology.**, v. 20, n. 4, p. 221-225. 2005.

FRANTAMICO, P. M.; BHUNIA, A. K. J.; SMITH, L. Food – borne pathogens: microbiology and molecular biology. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 60, n. 24, p. 1180. 2007.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports.**, v. 21, n. 2, p. 263-277, 2004.

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology.**, v. 50, p. 419 – 424, 2010.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. A. In-vitro activity essential oils, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and tea tree oils products against *Candida* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 42, n. 5, p. 591-595, 1998.

HARBORNE, J. B. (ed.). Methods in plant biochemistry. Plant phenolics. London: Academic, v. 1, 1989.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry.**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HOUGHTON, P. J. The role of plants in traditional medicine and current therapy. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine.**, v. 1, n. 2, p. 131-143. 1995.

JAIN, A.; SINGH, A. K.; LAL, H.; BANERJEE, S. K. **Indian Forester.**, v. 128, p. 786-794. 2002.

KAWASHIMA, M. et al. Real time interaction of oral streptococci with salivary components. **Oral Microbiology Immunology.**, v. 18, p. 220-225. 2003.

KREUGER, M. R. O.; FARIAS, B. G.; MOREIRA, J.; BLIND, L. Z.; AMOAH, S. K. S.; LEITE, A. S.; BIAVATTI, M. W.; HOOF, T. V.; D'HERDE, K.; CRUZ, A. B. Effects of the topical application of n-ethyl acetate fraction from *Vernonia scorpioides* on excisional wounds infected with *Staphylococcus aureus* in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v. 22, n. 1, p. 123-130. 2012.

LAMOUNIER, K. C.; CUNHA, L. C. S.; DE MORAIS, S. A. L.; DE AQUINO, F. J. T.; CHANG, R.; DO NASCIMENTO, E. A.; DE SOUZA, M. G. M.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity, and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012. 2011.

LEE, S. M.; OLSEN, J. I.; SCHWEIZER, M. P.; KLOCKE, J. A. 7- Deacetyl-17 β -hydroxyazadione, a new limonoid insect growth inhibitor from *Azadirachta indica*. **Phytochemistry**, v. 27, p. 2773-2775. 1988.

LEGRAMANDI, V. H. P. *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Raym.-Hamet ; H. Perrier e *Kalanchoe pinnata* Pers. (Crassulaceae): atividade antifúngica e estudo farmacognóstico comparativo. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2011.

LEHIR, A. Farmácia Galênica. Manuales de Farmácia. Ed. Masson S.A.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). **Plantas medicinais**: sob a óptica da química medicinal moderna. Chapecó: ARGOS. p. 483-501. 2001.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. **Caries Research**, v. 38, p. 95-103. 2004.

LING, L. T.; RADHAKRISHNAN, A. K.; SUBRAMANIAM, T.; CHENG, H. M.; PALANISAMY, U. D. Assessment of antioxidant capacity and cytotoxicity of selected Malaysian plants. **Molecules**, v. 15, p. 2139-2151. 2010.

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial film. **Caries Research**, v. 38, p. 204-211. 2004.

MARTINEZ, S. S. O nim – *Azadirachta indica*: Natureza, Usos Múltiplos, Produção. Publicado pelo IAPAR – Londrina. 2002.

MIGLIATO, K. F. *Syzygium cumini* (L.) Skeels – Jambolão: estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade anti-séptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. 2005. 179f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2005.

MORAES, H. P. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonima* spp e *Alchornea* spp: estudo comparativo entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas. 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2006.

MORDUE (LUNTZ), A. J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an update. **Journal Insect Physiology.**, v. 39, n. 11, p. 903-924, 1993.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; MORGAN, E.D.; NISBET, A.J. Azadirachtin, a natural product in insect control. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 117-134.

MORGAN, E. D. Azadirachtin, a scientific gold mine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 17, p. 4096-4105. 2009.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farmaceutica Bonaerense.**, v. 24, n. 1, p. 139-148. 2005.

MOSSINI, S. A. G. Efeitos de extratos de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) na produção de micotoxinas e na morfologia de fungos. 2006. 49f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2006.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. NCCLS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2. ed. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pa. 2002.

NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against food-borne bacteria. **Food Control.**, v. 20, n. 2, p. 57-60. 2009.

NICOLAU, D. P.; STEIN, G. E. Therapeutic options for diabetic foot infections: a review with an emphasis on tissue penetration characteristics. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, v. 100, p. 52-63. 2010.

OLIVEIRA, R. A. G. Ação farmacológica sobre o sistema nervoso central de alcaloides da *Solanum pseudo-quina* St. Hill. 1986. 97f. Dissertação (Mestrado em Produtos

Naturais) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1986.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control.**, v. 18, n. 5, p. 414-420. 2007.

PACKER, J. F.; Luz, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, P. 102-107. 2007.

PAI, M. R.; ACHARYA, L. D.; UDUPA, N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel—a 6-week clinical study. **Journal Ethnopharmacology.**, v. 90, n. 1, p. 99-103, 2004.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 46, n. 8, p. 2720 – 2722. 2002.

PAMPLONA-ZOMENHAN, L. C.; PAMPLONA, B. C.; DA SILVA, C. B.; MARCUCCI, M. C.; MIMICA, L. M. J. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of an ethanol extract of Brazilian classified propolis on strains of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Microbiology.**, v. 42, n. 4, p. 1259-1264. 2011.

PATEL, V. K.; VENKATAKRISHNA-BHATT, H. Folklore therapeutic indigenous plants in periodontal disorders in India (review, experimental and clinical approach). **International Journal of Clinical Pharmacology.**, v. 26, n. 4, p. 176-184, 1988.

PENTEADO, S. R. Defensivos alternativos e naturais para uma agricultura saudável. Campinas, Cati, 79p.

PEREIRA, D. F.; SANTOS, M.; POZZATTI, P.; ALVES, S. H.; CAMPOS, M. M. A.; ATHAYDE, M. L. Antimicrobial activity of a crude extract and fractions from *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze leaves. **Latin American Journal of Pharmacy.**, v. 26, n.6, p. 893-896. 2007.

PINTO, V. G. P. Saúde bucal coletiva. 4. ed. São Paulo: Livraria e Editora Santos. 202p. 2000.

POLAQUINI, S. R. B.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KEMMELMEIER, C.; GASPARETTO, A. Effect of aqueous extract from Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on hydrophobicity, biofilm formation and adhesion in composite resin by *Candida albicans*. **Archives of Oral Biology.**, v. 51, p. 482-490, 2006.

RANGASAMY, O.; RAOELISON, G.; RAKOTONIRIANA, F. E.; CHEUK, K.; URVERGRATSIMAMANGA, S.; QUETIN-LECLERCQ, J.; GURIB-FAKIM. A.; SUBRATTY, A. H. Screening for anti-infective properties of several medicinal plants of the *Mauritian flora*. **Journal Ethnopharmacology.**, v. 109, n. 19, p. 331-337. 2007.

RICKE, S. C. et al. Alternatives to antibiotics: chemical and physical antimicrobial interventions and food-borne pathogen response. **Poultry Science.**, v. 84, n. 4, p. 667-675. 2005.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacology.**, v. 100, p. 80-84, 2005.

ROOP, J. K.; DHALIWAL, P. K.; GURAYA, S. S. Extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* seeds inhibit folliculogenesis in albino rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 943-947, 2005.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biological & Pharmaceutical Bulletin.**, v. 29, p. 191-201. 2006.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of

essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p.275-280. 2004.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Reviews Entomology**., v. 35, p. 271-297. 2004.

SCHUBERT, A.; PEREIRA, D. F.; ZANIN, F. F.; ALVES, S. H.; BECK, R. C. R.; ATHAYDE, M. L. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Pharmazie**.,v. 62, n. 11, p. 876-880. 2007.

SCHUMUTTERER, H. Protozoa, protozoans: effects on viruses and organisms., The neem tree, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, p. 127, 1995.

SEKI, M. et al. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. **Oral Microbiology Immunology**., v. 21, p. 47-52. 2006.

SERVICE, R. F. Antibiotics that resist resistance. **Science**, v. 270, p. 724-727. 1995.

SHAW, D. Risks or remedies? Safety aspects of herbal remedies in the UK. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 91, n. 6, p. 294-296. 1998.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Ed. UFRGS/Ed. UFSC. Porto Alegre/Florianópolis. p. 711-740. 2003.

SHUMUTTERER, H. The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other meliaceous plants. 2nd ed., International print-o-pac limited. Mumbai, 893pp. 2002.

SIDHU, O. P.; KUMAR, V.; BEHL, H. M. Variability in neem (*Azadirachta indica*) with respect to azadirachtin content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v. 51, n. 4, p. 910-915. 2003.

SIGEL, J. D.; RHINEHART, E.; JACKSON, M.; CHIARELLO, L.; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in healthcare settings, 2006. **American Journal of Infection Control**. Dec., v. 35, ed.10, p.165-93. 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (1999). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Editora UFRGS. Porto Alegre. 2010.

SOBERÓN, J. R.; SGARIGLIA, M. A.; QUIROGA, E. M.; VATTUONE, M. A. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1450-1461. 2007.

SOULSBY, L. Resistance to antimicrobials to humans and animals. *British Journal Medicine*, v. 331, p. 1219-1220. 2005.

SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONÇALVES, A. G.; REIS, A. O.; GALES, A. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Screening of Antibacterial Extracts from Plants Native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 379-384, 2004.

SVENSATER, G. et al. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. **Caries Research**, v. 37, p. 395-403, 2003.

TENOVER, F. C.; BIDDLE, J. W.; LANCASTER, M. V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 327-332. 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. et al. *Microbiologia*. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Editora Artmed. Porto Alegre. 2012.

TRINGALI, C. **Bioactive compounds from natural sources. Isolation, characterisation and biological properties**. Università di Catania, Italy: Taylor & Francis. p. 529-535. 2001.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G., ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57-67. 2011.

VANKA, A.; TANDON, S.; RAO, S. R.; UDUPA, N.; RAMKUMAR, P. The effect of indigenous Neem *Azadirachta indica* [correction of (*Adirachta indica*)] mouth wash on *Streptococcus mutans* and lactobacilli growth. **Indian Journal of Dental Research.**, v. 12, n. 3, p. 133-144, 2001.

VEICHT, G. E.; BOYER, A.; LEY, S. V. The azadirachtin story. **Angewandte Chemie International Edition.** Engl., v. 47, p. 9402-9429. 2008.

VAN VUUREN, S. F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 119, n. 3, p. 462-472, 2008.

WAGNER, H.; BLADT, S.; RICKL, V. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.** 2. ed. Berlin: Springer Verlag, 1996. 384p.

WEWETZER, A. Callus cultures of *Azadirachta indica* and their potential for the production of Azadirachtin. **Phytoparasitica**, v. 26, n. 1, p. 47-52, 1998.

WHO (World Health Organization). **The Global Burden of Disease- 2004 UPDATE.** WHO Press, 146p. 2008.

World Health Organization. **Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide.** 2 ed. Malta (MT): WHO; 2002.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Unã de Gato and Sangre de Gatro. **Altern. Med. Rev.**, Saindpoint, v. 6, n. 6, p. 567-579, 2001.