



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E IMUNOLÓGICA *IN*
***VITRO* DOS EXTRATOS DE *Senna reticulata* (Willd.) Irwin &**
***Barneby* (mata-pasto) E *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre)**

ADAM HERON DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E IMUNOLÓGICA *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (mata-pasto) E *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre)

ADAM HERON DE OLIVEIRA

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

ORIENTADOR: Prof^ª. Dr^ª. HÉRIDA REGINA NUNES SALGADO

ARARAQUARA - SP

2009

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

O48a Oliveira, Adam Heron de
Atividade antimicrobiana e imunológica *in vitro* dos extratos de *Senna reticulata* (Willd). Irwin & Barneby (mata-pasto) e *Vismia guianensis* (Aubl.) (lacre) / Adam Heron de Oliveira. – Araraquara, 2009.
126 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

1. Plantas medicinais. 2. Dermatomicoses. 3. *Senna reticulata*. 4. *Vismia guianensis*. I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient.. II. Título.

CAPES: 40300005

*À minha filha Lara Gabrielle,
fonte de inspiração para novas
conquistas.*

*Aos meus pais, Pedro de Oliveira e
Astréa Rodrigues Valente, espelhos
de sabedoria e moral.*

*Ao amigo Júlio Silva de Almeida
(in memoriam), um Poeta da Vida
que transformava as coisas simples
da vida em um espetáculo e nunca
negou auxílio ao próximo.*

*Aos amigos e parceiros científicos
do Laboratório de Micologia
Médica do Instituto Nacional de
Pesquisas da Amazônia.*

*À minha orientadora, Profa.
Dra. Hérica Regina Nunes Salgado
pelos votos de confiança.*

Agradecimentos

A Deus, ser de inteligência suprema e bondade infinita, pela minha vida e por todas as oportunidades que colocou em minha vida. Muito obrigado, Senhor.

*Obrigado Senhor pelos meus braços perfeitos...Quando há tantos mutilados.
Pelos meus olhos perfeitos...Quando há tantos cegos.
Pela minha voz que canta...Quando tantas emudecem.
Pelas minhas mãos que trabalham...Quando tantas mendigam.
É maravilhoso, Senhor!
Ter um lar para voltar...Quando há tantos que não têm onde ir.
Sorrir...quando há tantos que choram.
Amar...quando há tantos que odeiam.
Sonhar...quando há tantos que se revolvem em pesadelos.
Viver... quando há tantos que morrem antes de nascer.
É maravilhoso, Senhor, ter tão pouco a pedir e tanto para agradecer.
Obrigado, Senhor!*

Aos meus pais Pedro e Astréa. A distância geográfica jamais impediu que eu sentisse a presença de vós comigo. Presença marcante em todos os momentos da minha vida. Com todo amor e carinho, muito obrigado, meus pais.

À minha filha Lara Gabrielle que bem soube compreender o sacrifício da ausência paterna. Te amo

muíto, és minha fonte de inspiração. Obrigado, bonequinha do papai.

Às minhas irmãs, Ana Pietrina e Karla Patrícia, pelo apoio moral e votos de confiança, o que me deixa sempre mais forte. Obrigado, manas.

Ao meu irmão José Eduardo (in memoriam). Meu mano, tenho certeza que se estivesse entre nós, estaria pulando de alegria e orgulho do seu mano. Obrigado pelo carinho que me deste quando em vida.

Às minhas sobrinhas Ayda Patrícia (“preta-do-leite”), Ana Clara (“cabeção”) e Pietra Eduarda (“bocheção”), pequenas notáveis e os anjos do tio. Obrigado pelo carinho revigorante.

À minha amiga Daniela Cristina, companheira de todas as horas (acadêmicas e não acadêmicas). Muito obrigado pela sua cumplicidade.

À Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado. Desde do princípio demonstaste confiança em mim e, por isso me ofertaste teus ensinamentos e amizade. Muito obrigado por esta atenção incondicional.

Ao Dr. José Augusto Almendros de Oliveira, à Professora MsC Ana Cláudia Alves Cortez e ao corpo técnico do Laboratório de Micologia Médica do INPA, Raimunda Nascimento dos Anjos, Eliana Silva dos

Santos, Rosalvo Balbino da Silva, pelo incentivo e ajuda incondicional na realização deste trabalho. Muito obrigado pela amizade e pela disposição em me atender.

À Dr^a. Ieda Leão do Amaral da Coordenação de Pesquisas em Botânica do INPA, pela ajuda na coleta das drogas vegetais e identificação das minhas exsiccatas. Obrigado.

À Dr^a. Cecília Verônica Nunez e ao corpo técnico do Laboratório de Fitoquímica do INPA, pela ajuda no beneficiamento das drogas vegetais. Obrigado.

À amiga Maria de Fátima Rodrigues, técnica do Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Foste minha luz e és de todos os alunos do laboratório. Agradeço infinitamente tua amizade.

Ao Prof. Dr. Luís Vitor Silva do Sacramento, pessoa que irradiava luz para todos que o rodeiam. Muito obrigado, "Pessoa Bonita", pela atenção e amizade.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, que colaborou, sem hesitação, na realização deste trabalho, orientando na cromatografia de camada delgada. Obrigado.

À Prof.^a. Dr.^a. Raquel Regina Duarte Moreira, professora da disciplina de farmacognosia, que me ajudou dando excelentes dicas para realizar este trabalho. Obrigado.

Ao técnico do Laboratório de Farmacognosia, Luís Eduardo, que se dispôs a ajudar na identificação fitoquímica preliminar das espécies estudadas. Obrigado.

À Prof.^a. Dr.^a. Iracilda Zeppone Carlos, do Laboratório de Imunologia e, aos seus alunos Djamile Cordeiro, Lívia Carolina Ribeiro e Lucas Souza Ferreira que me receberam para realizarmos os testes de citotoxicidade. Obrigado.

Ao Prof. Dr. Alexandre Bella Cruz da Universidade do Vale do Itajaí-SC, que não pestanejou em me ensinar os princípios da bioautografia, me recebendo de braços abertos no seu laboratório. Muito obrigado pela ajuda.

Às minhas estagiárias, Camila Reichmann, Débora Furuta e Thais Sato, que muito colaboraram para a realização deste trabalho. Obrigado pela preciosa ajuda.

Aos professores do Exame de Qualificação, Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Instituto de Química e, Prof.^a. Dr.^a. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro, do

Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAR-UNESP, pelas correções e sugestões. Obrigado pela ajuda.

Aos professores da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, pelo respeito, admiração e carinho com os quais sempre me receberam. Obrigado.

Às funcionárias Cláudia, Laura e Sônia da secretaria da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Obrigado pela atenção e paciência.

Aos amigos William Kato e Renata Andreoletti pelo incentivo desde quando optei sair de Manaus para tentar a seleção de mestrado. Obrigado amigos.

Ao casal Isabelle Tavares e Jeferson Fatín, grandes amigos e companheiros de vários momentos de alegria que sempre irradiaram força. Obrigado.

À amiga Marisa Nascimento, irmã dos tempos de colégio militar, ao seu noivo Fabrício Malachias e ao casal Priscila e Alan Rodrigo, que me acolheram e foram a minha família no Estado de São Paulo. Um Obrigado imensurável.

À amiga Eliana Pavan Serafim, companheira de estudo, que muito me incentivou. Obrigado pelo carinho e pela amizade.

Aos companheiros de labuta no Laboratório de Controle de Qualidade, Andréa Moreno, Edith Cristina, Flávia Angélica, Flávia Ribeiro, Josilene, Juliane Farinelli, Ketylin Migliato, Marcelo Hiene, Paula Lacerda e Rudy Bonfílio. Ciência nunca se realiza sozinho. Obrigado pelo companheirismo.

Aos amigos do Laboratório de Farmacotécnica, Ana Luíza, Fernanda, Flávia Chiva, Gustavo, Hílris e Priscileila, companheiros de momentos de alegria. Obrigado.

Aos amigos Leonardo Gorla e Danilo Dignani, cúmplices e companheiros de viagem, nossa amizade será eterna. Muito obrigado por existirem em minha vida.

Ao amigo Marco Antonio, grande companheiro e um grande irmão, pelas horas de apoio e ajuda. Obrigado guerreiro.

Ao amigo Omar Loureiro (in memoriam), amigo e irmão que sempre guardarei no peito, por sempre ter acreditado no meu potencial profissional e pessoal. Obrigado amigo e tenho certeza que o mundo espiritual está satisfeito com a sua luz.

À família da amiga Eva Gabriela: Tia Myrtes, Tio Sérgio, Tereza Raquel e Abraão, pela acolhida em todos

os momentos de alegria e tristeza e pelo apoio incondicional. Muito Obrigado.

A todos os colegas e amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e também pela amizade. Obrigado.

À CAPES, pela bolsa concedida.

*“Estuda sempre, ainda que seja pouco,
porquanto muito pior que estudar
pouco é acomodar-se a criatura nas
trevas da ignorância.”*

Emmanuel

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	16
LISTA DE TABELAS	18
LISTA DE ABREVIATURAS	20
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO	23
REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1 HISTÓRIA DA FITOMEDICINA	29
2.2 ETNOFARMACOLOGIA	31
2.3 FLORA CUTÂNEA E MICRO-ORGANISMOS	32
2.4 MÉTODOS PARA PESQUISA DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	34
2.4.1 Método de difusão	34
2.4.2 Método de microdiluição	35
2.4.3 Método bioautográfico	36
2.5 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS ...	37
2.6 <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	40
2.7 <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.)	42
OBJETIVOS	45
MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1 MATERIAL	48
4.1.1 Equipamentos	48
4.1.2 Solventes, reagentes e soluções	48
4.1.3 Micro-organismos	50
4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	51
4.2.1 Área de coleta	51

4.2.2 <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.)	52
4.2.3 <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	53
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS E FRAÇÕES	54
4.3.1 Frações hexânicas, acetato-etílicas e <i>n</i> -butílicas	55
4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DE <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) E <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	56
4.4.1 Determinação da perda por dessecação em balança de infravermelho	56
4.4.2 Determinação do pH	56
4.4.3 Determinação do teor de cinzas totais	56
4.4.4 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido	57
4.4.5 Determinação da densidade aparente não compactada	57
4.4.6 Determinação de matéria extraível	57
4.4.7 Controle microbiológico dos pós das cascas e folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) e <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	58
4.4.7.1 <i>Contagem total de micro-organismos</i>	58
4.4.7.2 <i>Pesquisa de Salmonella e Escherichia coli</i>	58
4.4.7.3 <i>Pesquisa de Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa</i>	59
4.4.8 Controle microbiológico dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) e de <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	59
4.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR	60
4.5.1 Pesquisa de antraquinonas	60
4.5.1.1 <i>Antraquinonas livres</i>	60
4.5.1.2 <i>Glicosídeos antraquinônicos (Reação de Bornträger)</i>	60
4.5.2 Pesquisa de saponinas	60
4.5.3 Pesquisa de alcaloides	61
4.5.4 Pesquisa de taninos	61
4.5.4.1 <i>Reação da gelatina</i>	61
4.5.4.2 <i>Reação com sais de ferro</i>	61
4.5.4.3 <i>Reação com acetato de chumbo</i>	62
4.5.5 Pesquisa de flavonoides	62
4.5.5.1 <i>Reação de Shinoda</i>	62

4.5.5.2	<i>Reação de Taubock</i>	62
4.5.5.3	<i>Reação de Pew</i>	63
4.5.5.4	<i>Reação de cloreto férrico</i>	63
4.5.5.5	<i>Reação de cloreto de alumínio</i>	63
4.6	BIOENSAIOS	63
4.6.1	Bioautografia	63
4.6.1.1	<i>Preparo da CCD</i>	63
4.6.1.2	<i>Preparo do inóculo bacteriano</i>	64
4.6.1.3	<i>Preparo do inóculo fúngico</i>	64
4.6.1.4	<i>Ensaio bioautográficos</i>	65
4.6.1.5	<i>Revelação das placas</i>	66
4.6.2	Determinação da CIM por microdiluição	66
4.6.2.1	<i>Preparo dos inóculos fúngicos</i>	67
4.6.2.2	<i>Preparo do inóculos bacterianos</i>	67
4.6.2.3	<i>Montagem do ensaio</i>	67
4.6.2.4	<i>Leitura</i>	69
4.7	ATIVIDADE IMUNOLÓGICA	69
4.7.1	Animais	69
4.7.2	Obtenção das células do exsudato peritoneal	70
4.7.3	Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal	71
4.7.4	Determinação da produção de óxido nítrico	72
4.7.5	Determinação da atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i> em culturas de células peritoneais de camundongos quanto à produção de NO	72
4.7.6	Análise estatística dos resultados	73
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL	75
5.2	CONTROLE DE QUALIDADE DE <i>Vismia guianensis</i> (Aubl) E DE <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	76

5.2.1	Determinação da perda por dessecação	76
5.2.2	Determinação do pH	76
5.2.3	Determinação do teor de cinzas totais e insolúveis em ácido	77
5.2.4	Determinação de matéria extraível	77
5.2.5	Controle microbiológico dos pós e dos extratos das cascas e folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl) e <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	78
5.3	EXTRATOS VEGETAIS E FRAÇÕES	81
5.4	TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR	82
5.5	BIOAUTOGRAFIA	90
5.6	DETERMINAÇÃO DA CIM	94
5.7	ATIVIDADE IMUNOLÓGICA	100
5.7.1	Avaliação da citotoxicidade	100
5.7.1.1	<i>Viabilidade celular na presença dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de <u>Vismia guianensis</u> e de <u>Senna reticulata</u></i>	100
5.7.1.2	<i>Viabilidade celular dos macrófagos estimulados por LPS na presença dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de <u>V. guianensis</u> e de <u>S. reticulata</u></i>	102
5.7.2	Avaliação dos efeitos dos extratos sobre os macrófagos	103
5.7.2.1	<i>Determinação da produção de óxido nítrico</i>	103
5.7.2.2	<i>Determinação da atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos das plantas <u>V. guianensis</u> e <u>S. reticulata</u> em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss quanto à produção de NO</i>	104
	CONCLUSÃO	110
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Fontes de agentes terapêuticos	30
FIGURA 2	<i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby: A) árvore; B) detalhe das folhas e flores	41
FIGURA 3	<i>Vismia guianensis</i> (Aubl.): A) copa da árvore; B) detalhe das folhas	44
FIGURA 4	Mapa da cidade de Manaus, representando os locais de coleta do material vegetal	52
FIGURA 5	Procedimento de secagem das cascas (A) e folhas (B) de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.)	53
FIGURA 6	Esquema de obtenção do material vegetal a partir da coleta	54
FIGURA 7	Esquema da partição líquido-líquido para obtenção das frações dos extratos hidroetanólicos de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i>	55
FIGURA 8	Procedimento de padronização dos inóculos fúngicos	65
FIGURA 9	Ensaio bioautográfico dos extratos de <i>V. guianensis</i> e de <i>S. reticulata</i>	66
FIGURA 10	Representação do ensaio de microdiluição para determinação da atividade antifúngica dos extratos de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i>	68
FIGURA 11	Cinética do reagente resazurina para a determinação da CIM por microdiluição	69
FIGURA 12	Análise microbiológica do pó das cascas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl): A) diluição 1:10; B) diluição 1:100	81
FIGURA 13	Pesquisa de antraquinonas livres dos pós das cascas e das folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i>	84
FIGURA 14	Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos dos pós das cascas e das folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i>	85
FIGURA 15	Reação da gelatina para pesquisa de taninos com os pós das cascas e das folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i> ...	88
FIGURA 16	Formação de espuma para pesquisa de saponinas com os pós das cascas e das folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i> ...	89
FIGURA 17	Visualização em luz ultravioleta dos cromatogramas com extratos brutos e frações de acetato de etila das espécies <i>V. guianensis</i> e <i>S. reticulata</i>	91

FIGURA 18	Ensaio bioautográfico dos extratos brutos e das frações hexânicas de <i>S. reticulata</i> frente a <i>S. epidermidis</i>	93
FIGURA 19	Ensaio bioautográfico dos extratos brutos e das frações hexânicas de <i>V. guianensis</i> frente a <i>S. epidermidis</i>	94
FIGURA 20	Ensaio de determinação da CIM dos extratos de <i>V. guianensis</i> e <i>S. reticulata</i> frente a <i>C. albicans</i>	99
FIGURA 21	Viabilidade de células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss na presença dos extratos hidroetanólico das cascas e folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i>	101
FIGURA 22	Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i> e de LPS	102
FIGURA 23	Produção de óxido nítrico em cultura de células do exsudato peritoneal. As células peritoneais foram cultivados em meio RPMI-1640-C (C-) e com o LPS (C+)	104
FIGURA 24	Produção de óxido nítrico em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de LPS. As células peritoneais foram cultivados em meio RPMI-1640-C (C-) e com o LPS (C+)	105

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Micro-organismos utilizados nos bioensaios	51
TABELA 2	Massa das amostras de cascas e folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i>	75
TABELA 3	Controle de qualidade farmacognóstico das amostras de cascas e de folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i>	78
TABELA 4	Análise microbiológica dos pós das cascas e folhas de <i>Vismia guianensis</i> e de <i>Senna reticulata</i>	80
TABELA 5	Massas e rendimentos dos extratos macerados hidroetanólicos (70%) de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) e de <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	82
TABELA 6	Massas e rendimentos das frações dos extratos macerados hidroetanólicos (70%) de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) e de <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	82
TABELA 7	Principais classes de metabólitos secundários identificados nas amostras de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) e de <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	83
TABELA 8	Bioautografia dos extratos das cascas e folhas de <i>Vismia guianensis</i> (Aubl.) e de <i>Senna reticulata</i> (Willd.) Irwin & Barneby	92
TABELA 9	Concentração Inibitória Mínima dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de <i>V. guiananensis</i> e <i>S. reticulata</i> , frente às cepas padrão (ATCC) dos fungos <i>M. canis</i> (<i>M.c</i>) , <i>T. mentagrophytes</i> (<i>T. m</i>), <i>T. rubrum</i> (<i>T. r</i>) e <i>C. albicans</i> (<i>C. a</i>) .	95
TABELA 10	Concentração Inibitória Mínima dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de <i>V. guiananensis</i> e <i>S. reticulata</i> , frente às cepas clínicas dos fungos <i>M. canis</i> (<i>M.c</i>) , <i>T. mentagrophytes</i> (<i>T. m</i>), <i>T. rubrum</i> (<i>T. r</i>) e <i>C. albicans</i> (<i>C. a</i>)	95
TABELA 11	Concentração Inibitória Mínima dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de <i>V. guiananensis</i> e <i>S. reticulata</i> , frente às cepas padrão das bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas	96
TABELA 12	Porcentagem de viabilidade celular em PEC murinas após exposição aos extratos a 50 µg/mL	100
TABELA 13	Porcentagem de viabilidade celular em PEC murinas após exposição aos extratos a 50 µg/mL na presença de LPS	103

TABELA 14	Efeitos dos extratos na produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais	103
TABELA 15	Percentagem de inibição dos extratos sobre a produção de NO em células peritoneais	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AcEt	acetato de etila
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DCM	diclorometano
DAP	diâmetro à altura do peito
DMSO	dimetilsulfóxido
EMB	eosina-azul de metileno
EtOH	etanol
HEX	hexano
MeOH	metanol
MTT	brometo de tiazolil tetrazólio
n-BuOH	<i>n</i> -butanol
TSI	tríplice açúcar-ferro
TTC	cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio
UFC	Unidade Formadora de Colônias
XLD	xilose-lisina-desoxicolato

RESUMO

As espécies *Vismia guianensis* (Aubl.) (Clusiaceae) e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Caesalpiniaceae), conhecidas popularmente por lacre e mata-pasto, respectivamente, são encontradas na região amazônica, onde são utilizadas na medicina popular para o tratamento de diversas moléstias, principalmente infecções e dermatomicoses. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações das referidas espécies vegetais, através da bioautografia e da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição. Foi avaliada também a atividade imunológica dos extratos hidroetanólicos das cascas do caule e das folhas de *Senna reticulata* e de *Vismia guianensis* através da produção e inibição de óxido nítrico por células peritoneais de camundongos. Todos os extratos apresentaram atividade inibitória frente às cepas padrão (ATCC) e clínicas dos fungos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*. O extrato hidroalcoólico das cascas de *V. guianensis* apresentou melhor atividade antimicrobiana, com CIM de 62,5 µg/mL, de 125 µg/mL e de 500 µg/mL frente às cepas padrão de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *M. canis*, respectivamente; CIM de 125 µg/mL para as cepas clínicas de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e, de 15,63 µg/mL frente à cepa clínica de *M. canis*. O extrato hidroetanólico das cascas de *V. guianensis* também apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias testadas, sendo as cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *B. subtilis* foram as mais sensíveis. As cepas de *C. albicans* foram resistentes aos extratos de ambas espécies vegetais. Através dos ensaios de atividade imunológica *in vitro* observou-se que na concentração de 50 µg/mL os extratos não apresentaram citotoxicidade e que apresentaram potencial atividade antiinflamatória.

Palavras-chave: Plantas medicinais, dermatomicoses, atividade antimicrobiana, *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby, *Vismia guianensis* (Aubl.), mata-pasto, lacre.

ABSTRACT

The *Vismia guianensis* (Aubl.) (Clusiaceae) and *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Caesalpinaceae), popularly known as seal and obtusifolia, respectively, are found in the Amazon region, where they are used in folk medicine for the treatment of various diseases, especially infections and dermatomycoses. In this light, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of extracts and fractions of these plant species by bioautography and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution method. We also evaluate the immunological activity of the hydroethanolic from the stem bark and leaves of *Senna reticulata* and *Vismia guianensis* and production through the inhibition of nitric oxide by peritoneal cells of mice. All the extracts showed activity against the standard strains (ATCC) and clinical fungi *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis*. The hydroalcoholic extract of the bark of *V. guianensis* showed better antimicrobial activity, with MIC of 62.5 µg/mL, 125 µg/mL and 500 µg/mL against the standard strains of *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* and *M. canis*, respectively, MIC of 125 µg/mL for clinical strains of *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* and of 15.63 µg/mL against the clinical strain of *M. canis*. The hydroalcoholic extract of the bark of *V. guianensis* also showed antimicrobial activity against all bacteria tested, with strains of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *B. subtilis* were the most sensitive. The strains of *C. albicans* were resistant to the extracts of both species. Through the *in vitro* testing of immune activity was observed that the concentration of 50 µg/mL extracts showed no cytotoxicity and showed potential anti-inflammatory activity.

Key words: Medicinal plants, dermatomycosis, antimicrobial activity, *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby, *Vismia guianensis* (Aubl.), "mata-pasto", "lacre".

1. Introdução

O emprego de plantas na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos desde as formas mais simples de tratamento local, provavelmente utilizada pelo homem das cavernas, até as formas tecnologicamente sofisticadas de fabricação industrial dos medicamentos utilizados pelo homem moderno. Apesar das enormes diferenças entre as duas maneiras de uso das plantas há um fato comum entre elas. Em ambos os casos, o homem percebeu de alguma forma, a presença de algo nas plantas, que administradas sob a forma de mistura complexa (o extrato) ou como substância pura isolada, por qualquer via, têm propriedade de provocar reações benéficas capazes de levar à recuperação da saúde. Tal atividade pode ser resultado da ação de uma única substância da planta ou de um conjunto delas que atuam sinergicamente, quer sejam empregadas da própria planta ou por seus extratos, quer delas sejam retiradas e transformadas em comprimidos, gotas, pomadas ou cápsulas pela indústria farmacêutica.

As comunidades que vivem nas matas fizeram, durante muito tempo e ainda fazem, utilização de plantas medicinais, sobretudo naquelas onde inexistente atendimento médico convencional e onde a terapêutica local tem que suprir as demandas das doenças do cotidiano, bem como daquelas ainda desconhecidas. Por outro lado, a modernização e o desenvolvimento de pesquisas científicas trouxeram substâncias sintéticas e alopáticas capazes de curar as enfermidades. No entanto, os efeitos colaterais provocados pelas substâncias sintéticas, quando associados a fatores como as condições culturais, a dificuldade de acesso a medicamentos quimioterápicos e o alto custo dos mesmos, induz à procura por substâncias que apresentem eficácia e com reações adversas bem menores além do baixo custo (RODRIGUES, 2005).

A planta medicinal pode ser um agente terapêutico quando escolhida corretamente, embora apresente diferenças, quando comparada com o produto industrializado, principalmente com relação à legislação e pela ausência de substâncias adicionadas como conservantes, corantes, adoçantes e aromatizantes.

Diante deste conceito e associado a recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre a utilização de plantas como opção terapêutica, o Prof. Dr. Francisco José de Abreu Matos criou um programa de assistência social farmacêutica, de âmbito regional, denominado Projeto Farmácias Vivas, no estado do Ceará (MATOS, 1997).

No município de Barreirinha (AM), inspirado no modelo de Matos, implantou-se também um projeto, que, além de diminuir os custos com medicamentos, gera renda às comunidades produtoras, já que são beneficiadas com a compra de seus produtos naturais pela prefeitura do local.

Este modelo de Assistência Farmacêutica Social do município de Barreirinha ratifica o dito que a Amazônia, com sua flora rica e singular, com espécies variadas e únicas, pode ser considerada hoje, o maior recurso natural do planeta proporcionando a prática da terapêutica natural, que é bastante forte na região.

O conhecimento popular, entretanto, dá embasamento às pesquisas científicas que buscam novos tratamentos. Ocorre, a cada dia, um estreitamento das relações entre o conhecimento popular e a ciência acadêmica, já que ao compararmos, ambos utilizam-se praticamente dos mesmos critérios para a investigação de novas substâncias ativas, como, por exemplo, as coletas biorracionalis (guiadas pela ecologia) e coletas baseadas no conhecimento tradicional, sendo esta última o foco da Bioprospecção (RODRIGUES, 2005).

As plantas, principalmente de floresta tropical, são reconhecidamente reservas de várias substâncias biologicamente ativas. Assim, nos recentes anos muitos produtos de origem vegetal (extratos, óleos essenciais) têm sido padronizados como potenciais antimicrobianos (GAYOSO et al., 2004).

Até o fim da Segunda Guerra Mundial, no Brasil, os medicamentos derivados de plantas foram amplamente usados, sendo substituídos gradativamente, por compostos sintéticos (LAPA, 2007). Esses medicamentos tiveram um grande

impacto no tratamento de diversas doenças; basta lembrar do sucesso das sulfas e dos antimicrobianos no tratamento de infecções e da cortisona no tratamento de doenças inflamatórias e alérgicas. Consequentemente, a utilização de plantas e seus extratos passaram a ser, continuamente menosprezados e até ridicularizados por profissionais de saúde, já que exibiram pouca eficácia no tratamento de doenças e sintomas (SCHENKEL et al., 2005).

Lentamente, essa postura começou a mudar nas últimas décadas. Schenkel e colaboradores (2005) apontam os motivos dessa mudança:

- As expectativas exageradas criadas em torno de produtos da grande indústria, fazendo crer que para cada moléstia existiria um grande medicamento e que não puderam ser atendidas satisfatoriamente;
- os efeitos indesejáveis e prejuízos causados tanto pelo uso correto como pelo uso abusivo dos medicamentos produzidos sob manto científico (basta lembrar talidomida, hexaclorofeno, practolol, clioquinol, cloranfenicol, etc.);
- o reconhecimento de que para o desenvolvimento de novos medicamentos (antiprotozoários, anticancerígenos, etc.), as pesquisas de plantas medicinais utilizadas na medicina popular apresentam perspectivas inegáveis;
- o reconhecimento de que atualmente amplas camadas da população não têm acesso aos medicamentos.

Partindo destes motivos, as plantas medicinais passaram a ser cogitadas como recurso terapêutico por alguns profissionais da saúde e por órgãos governamentais. No entanto, é *mister* a realização de ensaios de bioprospecção com estas plantas, para padronizar seus cultivos, coletas e beneficiamentos, permitindo a utilização *in natura*, a garantir sua segurança e eficácia medicinal, bem como o descobrimento de novos fármacos.

As espécies vegetais *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby e *Vismia guianensis* (Aubl.) conhecidas, respectivamente, como mata-pasto e lacre foram escolhidas para este estudo por demonstrarem popularmente atividade para diversos usos, como as afecções de pele, destacando-se as micoses (ALBUQUERQUE, 1980; REVILLA, 2001). Devido à escassez de pesquisas realizadas com os extratos dessas plantas, no tocante a atividade antimicrobiana resolveu-se avaliar, através de bioensaios, suas atividades *in vitro*, frente aos fungos *Trichophyton rubrum*, *T.*

mentagrophytes, Microsporum canis e Candida albicans; e frente às bactérias Gram-positivas Staphylococcus aureus Staphylococcus epidermidis, Enterococcus faecalis e Bacillus subtilis, e bactérias Gram-negativas Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa.

2. Revisão da Literatura

2.1 HISTÓRICO

Desde os primórdios, o homem buscou na natureza os recursos necessários para a sua sobrevivência, utilizando as plantas na alimentação e na cura de enfermidades (NIERO et al., 2003).

A história das civilizações é rica nos exemplos da utilização dos recursos naturais nos processos de cura, destacando-se a civilização egípcia, greco-romana e chinesa (VIEGAS Jr. et al., 2006).

Na civilização chinesa as plantas medicinais são parte integrante da medicina tradicional, o que é registrado no mais antigo texto botânico-medicinal, o *Pen Tsao* (2800 a.C.). Esta obra foi reeditada e revisada durante as sucessivas dinastias, sendo que na última edição, chamada de Tratado Médico do Imperador Amarelo, pertencente à Dinastia Han (25-220 d.C.), é descrito de forma detalhada o uso de cerca de 7 mil espécies medicinais. Os egípcios possuíam um profundo conhecimento médico. Isto foi demonstrado através do "Papiro de Ebers" (1700 a.C.) onde se relata a aplicação medicinal de cerca de 700 espécies, entre elas: canafístula como laxante, cominho como tônico e estimulante e a papoula como antitussígeno e sedativo. Os gregos transformaram o conceito mágico-religioso da Fitoterapia em um modelo moderno de observação. A maior figura grega nesta matéria foi Hipócrates (séculos IV e III a.C.), que fundamentou o uso correto das plantas medicinais. Na civilização grega destacam-se também Dioscórides e Galeno (ALONSO, 2008).

Na Idade Média, houve um estancamento e descrédito no uso de plantas medicinais devido à "caça às bruxas" da Santa Inquisição, que mandou queimar homens e mulheres que atuavam como curandeiros, no entanto a arte de curar ficou sendo praticada pelos representantes da Igreja que traduziam do latim e do grego as primitivas obras sobre plantas (ALONSO, 2008).

No Renascimento, a cura através das plantas recebeu um novo impulso por parte dos alquimistas e cientistas, destacando-se Paracelso. Surgem na Itália e na Alemanha as escolas médicas que também impulsionaram a medicina natural. A

relação entre a medicina e a química permitiu um desenvolvimento maior do conhecimento sobre os produtos naturais. Entretanto, no século XIX, Friedrich Wohler, ao sintetizar a uréia a partir de uma substância inorgânica, inaugurou a indústria de síntese química, com isso os produtos naturais foram sendo substituídos por produtos sintéticos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; ALONSO, 2008).

Segundo Hostettmann (2003) estima-se que, cerca de 44% dos medicamentos atualmente disponíveis, foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, a partir de fontes naturais, como plantas, micro-organismos e animais (Figura 1). Além disso, estima-se que das 252 substâncias consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas, e um número significativo está representado por fármacos obtidos de precursores naturais. Nos países industrializados, 25% dos medicamentos prescritos são originários de plantas. Isto evidencia que o interesse populacional pelas terapias naturais tem aumentado significativamente, principalmente em países em desenvolvimento, devido à pobreza e à falta de acesso aos medicamentos modernos (HOSTETTMANN, 2003; BRASIL, 2005; SCHENKEL et al., 2005).

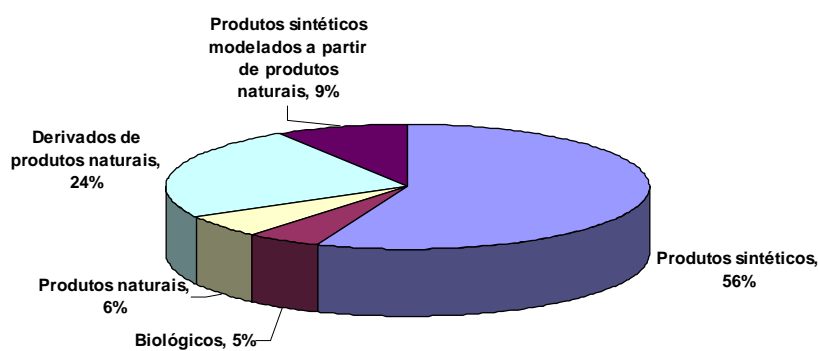


Figura 1 – Fontes de agentes terapêuticos.
Fonte: adaptado de Hostettmann, 2003.

2.2 ETNOFARMACOLOGIA

As pesquisas com plantas podem ser realizadas através de três modelos: o modelo clássico da Farmacologia dos Produtos Naturais, pelo modelo químico e pelo

modelo da Etnofarmacologia. No primeiro, aborda-se de forma inespecífica as características químicas e farmacológicas das substâncias naturais; o segundo objetiva a identificação das moléculas, ativas ou não, presentes no vegetal. O terceiro objetiva o estudo das plantas empregadas na medicina popular valorizando, sobretudo, os aspectos étnicos e culturais. Tal diferenciação é de suma importância com relação às plantas utilizadas na medicina tradicional, pois o planejamento de um modelo experimental que comprove uma propriedade terapêutica deve considerar o contexto no qual as plantas estão inseridas, conhecendo suas formas específicas de cultivo, coleta, preparo e administração (SIXEL; PECINALLI, 2005).

Entende-se como Etnofarmacologia, "a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem" (ELISABETSKY, 2003).

O conhecimento sobre plantas medicinais representa, muitas vezes, o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos com dificuldades de acesso a medicamentos industrializados, sendo esta uma das mais antigas formas da prática da medicina tradicional (MACIEL et al., 2002; GONÇALVES et al., 2005).

A importância das plantas medicinais para a pesquisa de princípios ativos e o desenvolvimento de novas drogas pode ser verificado quanto ao uso de seus constituintes como agentes terapêuticos ou também, como matéria-prima para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos.

O Brasil, além de ser detentor da maior diversidade vegetal, estimada em 15 a 20% do total mundial (60.000 espécies), possui uma rica diversidade cultural e étnica que resulta no acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, destacando-se o vasto acervo de conhecimentos sobre o manejo e uso de plantas medicinais. No entanto, apenas 8% das espécies catalogadas foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies avaliadas em propriedades medicinais (BRASIL, 2005).

2.3 FLORA CUTÂNEA E MICRO-ORGANISMOS

A pele íntegra é um dos maiores órgãos do corpo, em termos de área, e é responsável por aproximadamente 16% do peso corporal. É o manto de revestimento do organismo e tem por função isolar componentes orgânicos do meio exterior, impedir a ação de agentes externos, evitar a perda de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno, dar proteção imunológica, fazer termo-regulação, propiciar a percepção e função secretória (BRASIL, 1989; TORTORA et al., 2006).

É constituída por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme, quando íntegra, funciona como barreira física eficaz contra microrganismos, por estar em contato direto com o ambiente externo. A derme contém os folículos pilosos, ductos de glândulas sudoríparas e sebáceas, os quais possibilitam a passagem de microrganismos da pele para os tecidos mais profundos. A superfície íntegra da epiderme saudável raramente é penetrada por micro-organismos, porém, quando rompida, infecção subcutânea, muitas vezes, se desenvolve (ALCAMO, 2001; TORTORA et al., 2006).

Na epiderme encontramos uma camada, tida como a mais externa e composta por queratina e proteína fibrosa. Esta camada, o estrato córneo, é uma importante barreira elétrica, térmica, química e microbiológica e sofre processo de renovação constante, no entanto é colonizada por micro-organismos (PRUNIERAS, 1994; CUNHA et al., 2004).

A pele humana normal se encontra colonizada por múltiplos microorganismos que vivem como saprofíticos na superfície e nas fissuras entre as escamas do estrato córneo e dentro dos folículos pilosos, os quais em algumas ocasiões podem tornar-se patógenos. A flora da pele tem muitas funções importantes na homeostase, desde a degradação de lipídios sobre a superfície da pele até ser diretamente responsável

pelo odor e degradar componentes do suor apócrino (GONZÁLEZ; DELGADILLO, 2002).

A flora cutânea é formada por bactérias, fungos e parasitas, e divide-se em dois grandes grupos: a flora residente e a flora transitória (ROTH; JAMES, 1989; FITZPATRICKS, 1999).

Os organismos que apresentam a capacidade de multiplicar e sobreviver aderidos à superfície cutânea são chamados residentes e constituem a microbiota dominante da pele (GONZÁLEZ; DELGADILLO, 2002). A microbiota cutânea residente, estende-se por toda a pele, concentrando-se nas áreas mais úmidas e quentes como axilas e períneo, chegando em torno de 10^6 UFC/cm² e nas demais regiões, em torno de 10^4 UFC/cm². Os micro-organismos da flora residente não são totalmente removidos através do processo de lavagem das mãos, no entanto alguns autores relatam que os anti-sépticos conseguem inativá-los. Fazem parte da flora residente os gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*, sendo os micro-organismos mais comuns o *S. epidermidis*, o *S. aureus* e o *P. acnes*. A flora residente possui baixa virulência e raramente causa infecção, contudo pode ocasionar infecções sistêmicas em pacientes imunodeprimidos e após procedimentos invasivos, sendo responsável por infecções cirúrgicas (BRASIL, 1989; ALCAMO, 2001; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; BUCALEM; WEI, 2008).

A flora fúngica residente está representada por leveduras do gênero *Malassezia*, organismos lipofílicos que se colonizam áreas sebáceas, sendo a *M. furfur* a principal levedura deste gênero que se encontra na pele. Algumas leveduras do gênero *Candida* também fazem parte da flora residente, como é o caso da *C. glabrata*, assim como *Pityrosporum ovale* e *P. orbiculares* (MURRAY, 1992; GONZÁLEZ; DELGADILLO, 2002).

Os componentes da flora transitória são simplesmente depositados sobre a superfície da pele através do meio ambiente, mas não têm a capacidade de aderir a

ela, pois aderem fracamente à pele por contato e encontra-se mais superficialmente, junto à gordura e às sujidades e sobrevive por curto período de tempo, sendo freqüentemente constituída por *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* (BRASIL, 2007; BUCALEM, WEI, 2008) e é responsável pelas infecções hospitalares de origem cruzada (BRASIL, 1989).

A flora fúngica transitória é constituída por *C. albicans* que é patógena se isolada na pele. Além desta levedura, encontra-se os fungos dermatofíticos como *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum* (SIDRIM, 1999).

2.4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O estudo de plantas medicinais leva à necessidade de verificar os extratos, frações ou isolados apresentam alguma ação terapêutica. Dentre elas, pode-se pesquisar a atividade antimicrobiana e isto pode ser realizado através de alguns métodos *in vitro* específicos. Os principais métodos utilizados são: difusão, diluição e autobiográfico (SOUZA et al., 2003).

2.4.1 Método de difusão

É um método utilizado para determinação da suscetibilidade de um micro-organismo a substâncias antimicrobianas, desenvolvido em meados dos anos 60 por Kirby e Bauer (TRABULSI, 1991).

Neste método, a substância pesquisada é colocada num reservatório, que pode ser disco de papel, cavidade no meio de cultura ou cilindro sobre a superfície, em contato com meio de cultura sólido inoculado com o micro-organismo. Após o período de incubação obtém-se uma resposta qualitativa e quantitativa medindo-se o halo de inibição (zona clara onde não houve crescimento microbiano, ao redor da substância em pesquisa). É um método útil para estabelecer a sensibilidade do micro-organismo, estabelecendo uma comparação da potência antimicrobiana da

amostra e dos antibióticos. Uma zona de inibição de certo tamanho indica suscetibilidade, zonas de tamanhos menores e se halo indicam resistência ao antibiótico testado (BARRY, 1991; MURRAY et al., 1995; ZACCHINO, 2001; KRUGER; MOURA, 2003).

Os fatores envolvidos neste teste devem ser cuidadosamente controlados. Estes fatores incluem o tamanho do inóculo, a distribuição do inóculo na placa, o tempo de incubação, profundidade do ágar, a taxa de difusão (apresenta problemas com substâncias que não difundem no meio de cultura) e a concentração da substância teste (KRUGER; MOURA, 2003).

Segundo a normativa M2-A8 da CLSI (2003), não são aceitáveis testes baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos.

2.4.2 Método de microdiluição

Este método foi validado em 1992 e constitui uma técnica que emprega placas de 96 poços com a transferência seriada da substância a ser testada. A microplaca é incubada durante 24-72 h em temperatura adequada ao crescimento do micro-organismo usado no teste. Depois deste período, é analisada visualmente e/ou espectrofotometricamente quanto ao crescimento microbiano, através da turvação do meio de cultura. Também pode ser realizada leitura através do uso de corante. (KOLODZIEJ et al., 1999).

A pesquisa da atividade antimicrobiana de extratos vegetais é realizada preferencialmente pela técnica de microdiluição em placa, empregada para determinar a CIM (menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo) do extrato em inibir o micro-organismo e utilizando o Alamar Blue como

revelador da sensibilidade microbiana às substâncias (COLLINS; FRANZBLAU, 1997; FRANZBLAU et al., 1998; BOLLELA et al., 1999), sendo denominada pela técnica do MABA (Microplate Alamar Blue Assay). A técnica do MABA tem sido empregada por diversos autores para determinar atividade antimicrobiana de princípios ativos naturais (PIETRO et al., 2000; JANUÁRIO et al., 2002) e de novos compostos sintéticos (PÍCON et al., 2002; CANTRELL et al., 2001). A resazurina, um indicador de óxido-redução, tem sido utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana, principalmente por se tratar de um reagente de menor custo que o Alamar Blue (PALOMINO, 2002).

Tem vantagem de ser quantitativo e ser usado tanto para amostras solúveis em água, quanto lipossolúveis. Também fornece informações sobre a concentração microbicida mínima, através de subculturas dos meios que apresentaram inibição na determinação da CIM (BARON; FINEGOLD, 1990). Além disso, o método de microdiluição pode ter vantagens especiais como a facilidade de execução, economia ou resultados mais rápidos (CLSI M27-A2, 2002).

2.4.3 Método bioautográfico

Método útil para a localização de compostos de ação antimicrobiana em um cromatograma, permitindo o isolamento biodirecionado de compostos ativos. Na bioautografia, um meio de cultura sólido fundido e inoculado é aplicado sobre a placa cromatográfica, na qual foi eluído o extrato ou fração (HAMBURGUER; CORDELL, 1987; SARTORATTO et al., 2004; SOUZA et al., 2007). Em 1946 Goodall e colaboradores desenvolveram um cromatograma de papel, o qual foi coberto com ágar inoculado, tendo-se o primeiro registro da bioautografia.

O princípio do ensaio consiste em aplicar uma suspensão de um micro-organismo a uma placa de CCD desenvolvida. Incubação em um ambiente úmido permite o crescimento dos micro-organismos. Zonas de inibição em seguida, são visualizadas pela aplicação de reagentes, como um sal de tetrazólio. Os micro-organismos metabolicamente ativos convertem o sal de tetrazólio em formazan,

resultando em um colorido intenso sobre a colônia. Assim, compostos antimicrobianos aparecem como manchas claras contra um fundo colorido (HAMBURGUER; CORDELL, 1987; WEDGE; NAGLE, 2000).

A bioautografia tem sido um método útil para encontrar novas substâncias antimicrobianas. Por outro lado, esta técnica depende do micro-organismo que se deseja avaliar e requer conhecimento das condições inerentes ao crescimento deste (COLORADO, 2007).

2.5 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS

O arsenal terapêutico disponível no mercado é variado, tanto para o tratamento tópico como para o tratamento sistêmico das micoses. Ainda assim, encontram-se dificuldades na terapêutica de algumas delas, devido ao surgimento de novos patógenos (ZAITZ et al., 1998). Além disso, os fármacos antifúngicos disponíveis no mercado nem sempre são efetivos na terapêutica das micoses, pois produzem recorrência, podem promover resistência microbiana, além de apresentarem efeitos tóxicos indesejáveis. Por esta razão, se observa uma busca contínua de novos fármacos mais potentes e, sobretudo, mais seguros (ZACCHINO, 2001).

Os produtos de origem natural passaram a receber maior atenção dos cientistas em virtude de que a maioria dos antifúngicos conhecidos é de origem sintética (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001). As informações de como as plantas são utilizadas por diferentes grupos étnicos e os estudos farmacológicos das preparações utilizadas servem como ferramentas na busca de novos modelos moleculares (RATES, 2001).

Fenner e colaboradores (2006), ao estudarem plantas da flora brasileira com atividade relacionada às infecções fúngicas, encontraram, na literatura, relatos sobre

409 espécies vegetais que já eram utilizadas pela população brasileira para esta finalidade.

A atividade medicamentosa de plantas contra fungos causadores de micoses pode ser observada e relatada por alguns pesquisadores. Souza e colaboradores (2002) mostraram que extratos etanólicos de plantas do cerrado brasileiro (*Hyptis ovalifolia* e *Eugenia uniflora*) mostraram-se inibidores do desenvolvimento de dermatófitos, tais como *Trichophyton rubrum*, espécie que se mostrou resistente em diversos ensaios realizados por outros pesquisadores. Souza e colaboradores (2003) mostraram a suscetibilidade dos fungos dermatofíticos frente ao óleo essencial de *Hyptis ovalifolia*, também confirmado por Oliveira e colaboradores (2004).

No nordeste brasileiro, as plantas medicinais são usadas frequentemente pela população para o tratamento de doenças infecciosas da pele (LIMA et al., 1997). Cruz e colaboradores (2006) verificaram a eficácia de extratos do caule de *Ziziphus joazeiro* e das folhas de *Caesalpinia pyramidalis*, ambos obtidos por infusão, contra duas espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. guilliermondii*) e *Trichophyton rubrum*. Estes resultados foram considerados mais eficazes, quando comparados com a atividade apresentada por anfotericina B. Lima (1996) constatou a ação fungistática do extrato etanólico das cascas de *Cinnamomum zeylanicum* e dos óleos essenciais das folhas de *Althea rosa*, de todas as partes de *Conyza bonariensis*, das folhas de *Croton regelianus*, das flores de *Ocimum gratissimum* e das folhas e flores de *Turnera ulmiflora* contra os fungos dermatofíticos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*. Gayoso e colaboradores (2004) demonstraram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* frente aos fungos *Candida albicans* e *C. tropicalis*. Araújo (2005) observou atividade antifúngica utilizando extratos das cascas do *Anacardium occidentale* frente às leveduras *Candida tropicalis* e *C. stellatoidea*.

Duarte e colaboradores (2004), ao estudarem a atividade de óleos essenciais e extratos etanólicos de 35 plantas da medicina popular brasileira, mostraram que 13 delas, *Aloysia triphylla*, *Anthemis nobilis*, *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon*

winterianus, *Cyperus articulatus*, *Cyperus rotundus*, *Lippia Alba*, *Mentha arvensis*, *Mikania glomerata*, *Mentha piperita*, *Mentha* sp., *Stachys byzantina* e *Solidago chilensis* apresentaram atividade contra o gênero *Candida*.

Salvador e colaboradores (2004), testando extratos etanólicos das partes aéreas de *Alternanthera maritima* e, Pretto (2005) com extratos metanólicos de *Calophyllum brasiliense*, validaram a atividade destas plantas contra fungos dermatofíticos (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*). Sartori (2005) verificou a suscetibilidade dos fungos dermatofíticos *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* frente a extratos hidroalcoólicos das flores de *Acmela brasiliensis*.

Fenner e colaboradores (2005), estudando várias espécies vegetais do gênero *Hypericum* frente a fungos causadores da "tinea pedis", constataram que apenas uma espécie mostrou-se promissora para estes fungos, incluindo *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*.

Com relação às plantas medicinais da Amazônia pode-se citar trabalhos realizados por Barbosa e colaboradores (1988), que verificaram a atividade contra *Candida*, dos extratos hexânicos e clorofórmicos de cálices e frutos de *Aniba riparia* e de cálices de *Aniba* sp. Oliveira e colaboradores (2000) mostraram a atividade inibitória dos extratos diclorometânicos e metanólicos de *Arrabidaea chica* e *Cecropia leucocoma* frente aos fungos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*. Cortez (2004) constatou atividade fungicida do extrato metanólico das vagens de *Caesalpinia ferrea* frente aos fungos dermatofíticos *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*. Correia e colaboradores (2008) demonstraram a atividade antimicrobiana dos extratos brutos de sete espécies amazônicas – *Geissospermum argenteum*, *Uncaria guianensis*, *Brosimum acutifolium*, *Copaifera reticulata*, *Licania macrophylla*, *Ptycopetalum olacoides*, *Dalbergia subcymosa* – frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, multirresistentes a agentes antimicrobianos.

A atividade antimicrobiana de espécies vegetais da Amazônia também foi estudada, recentemente, por Carneiro e colaboradores (2008) que realizaram a avaliação da atividade antimicrobiana de espécies constantes da Reserva Adolpho Ducke, em Manaus, e demonstraram, através do método de difusão em disco e de bioautografia, a boa atividade dos extratos de *Diclinanona calycina* e *Lacmellea gracilis* na inibição do crescimento de *Streptococcus oralis* e *Mycobacterium smegmatis*.

Cabral e colaboradores (2003) isolaram dois quassinóides com atividade antimalárica, a partir das cascas do caule de *Simaba guianensis*. Andrade Neto e colaboradores (2007) isolaram a neosergeolida, a elipticina, a aspidocarpina e o 4-nerolidilcatecol, respectivamente, a partir de quatro espécies vegetais da Amazônia *Picrolemma sprucei*, *Aspidosperma vargasii*, *Aspidosperma desmanthum* e *Pothomorphe peltata* e; demonstraram que estas substâncias apresentaram atividade inibitória *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum* superior a quinina e a cloroquina.

2.6 *Senna reticulata* (Willd.) IRWIN & BARNEBY

Pertence à família Leguminosae e é conhecida popularmente na Amazônia pelo nome de matapasto grande (SILVA et al., 1977). Pertence à subfamília Caesalpiniaceae. As espécies desta subfamília estão distribuídas em 4 tribos: **Caesalpinieae**, que inclui o gênero *Caesalpinia*; **Cassieae**, que inclui os gêneros *Cassia*, *Dialium* e *Senna*; **Cercidae**, que inclui o gênero *Bauhinia*; **Detarieae**, que inclui o gênero *Copaifera* (Di STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). O gênero *Senna* é pantropical com 260 espécies, sendo que 200 espécies ocorrem no continente americano (RODRIGUES et al., 2005).

A espécie *Senna reticulata* apresenta-se como uma árvore de pequeno porte, com altura variando de 3 a 8 metros (Figura 2A). Suas folhas possuem de 7 a 13 cm

de comprimento por 2 a 4 cm de largura, articuladas, com folíolos longos de 9 a 12 pares e arredondadas na base e no ápice. A inflorescência é racemosa, terminal ou auxiliar, com flores amarelas (Figura 2B). O fruto é uma fava linear longa, de 15 cm de comprimento por 2 cm de largura, fina, plana e glabra (REVILLA, 2001).

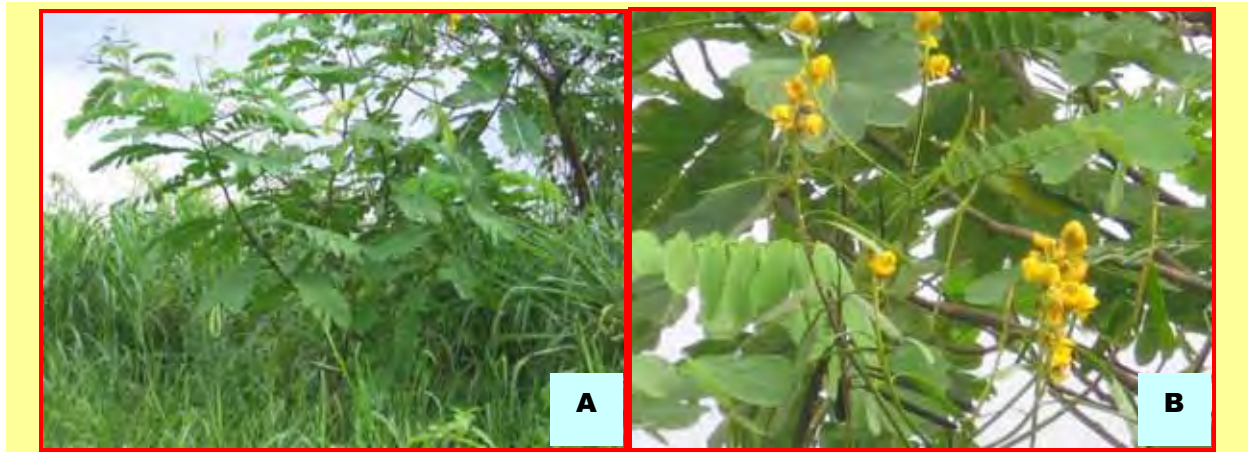


Figura 2 – *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby: A) árvore; B) detalhe das folhas e flores.

Fonte: Autor

Originalmente brasileira, encontra-se distribuída pelos estados do Norte, principalmente na Região Amazônica, em solos areno-argilosos, em terrenos inundáveis ou não, pastagens e campo aberto e sombreado, formando touceiras de indivíduos ocupando grandes áreas da várzea alta (REVILLA, 2001).

A *Senna reticulata* tem dominância, em relação às outras árvores e arbustos, pelas adaptações e estratégias de crescimento características da espécie, isto é, uma altíssima tolerância à inundação das raízes e capacidade de rebroto. O seu rápido crescimento nas planícies da Amazônia impede a formação de pastos, o que a torna inimiga dos fazendeiros. Estas características fazem com que seja considerada como uma das espécies colonizadoras mais eficientes nas áreas abertas e inundáveis da Amazônia, especialmente as que sofreram impacto antropofílico forte, e propiciaram a denominação popular de matapasto (PAROLIN, 2001).

A população utiliza o matapasto para as mais diversificadas doenças e finalidades. Destacam-se os usos em doenças da pele, como micoses, erupção cutânea, sarna, eczema e verruga. Também é utilizada como purgante, diurético, antidiabético, laxante e abortivo, e para hipertensão, helmintíase, espasmos, prisão de ventre e febre. Vale ressaltar seu uso como inseticida e repelente. Geralmente, dependendo das indicações de tratamento, as partes utilizadas são as folhas, sementes e raízes (REVILLA, 2001).

Santos e colaboradores (2008) identificaram em *Senna reticulata* seis antraquinonas (crisofanol; fisciona; aloe-emodina; emodina; 1,3,8-triidroxiantraquinona; 1,6,8-triidroxi-3-metoxiantraquinona), um flavonoide (campferol), uma biantrona do crisofanol, dois esteroides (β -sitosterol; estigmasterol) e dois triterpenos (α -amirina; β -amirina). Este foi o primeiro registro das substâncias 1,3,8-triidroxiantraquinona e 1,6,8-triidroxi-3-metoxiantraquinona em plantas superiores, antes só isoladas de micro-organismos.

2.7 *Vismia guianensis* (AUBL.)

Conhecida popularmente como "lacre", pau-de-lacre, árvore-da-febre, caapiá e caopiá, pertence à família Clusiaceae (também denominada Guttiferae) (Di STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A família Clusiaceae compreende aproximadamente 1370 espécies, distribuídas em 45 gêneros de ocorrência em regiões tropicais. No Brasil ocorrem em todo o território, somando 131 espécies que estão distribuídas em 21 gêneros. Os gêneros são distribuídos em três subfamílias (Hypericoideae, Calophylloideae e Bonnetioideae), destacando-se alguns com importância medicinal no Brasil, como *Hypericum*, *Vismia*, *Clusia*, *Calophyllum*, *Garcinia* e *Kielmeyera*. Além da importância medicinal, esses gêneros apresentam importantes espécies econômicas para a produção de madeira, gomas, pigmentos, óleos essenciais e resinas (Di STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

O gênero *Vismia* possui aproximadamente 35 espécies, distribuídos restritamente na América tropical, e algumas na África. Foi descrito por Domingos Vandelli e o nome é dedicado a Visme, comerciante português que se dedicava à Botânica. A maioria das espécies deste gênero fornece resinas de colorações diferentes e várias têm valor medicinal (Di STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

A espécie *Vismia guianensis* encontra-se comumente nas capoeiras, não tendo sido vista em abundância nas matas. É encontrada nas regiões do Norte e Nordeste do Brasil. Trata-se de arbusto ou árvore pequena (Figura 3A), com folhas ovais, oblongas, inflorescência em panículas terminais e frutos globosos, carnosos e indeiscentes (ALMEIDA, 1993). Seus diásporos são dispersos por animais (zoocoria) (PINHEIRO; RIBEIRO, 2001).

É utilizada pela aplicação de seu látex (resina amarelo-avermelhada denominada goma-lacre ou goma-guta) e da infusão das folhas, no combate das afecções dermatológicas denominadas "impingens" causadas por fungos, além de outras aplicações, como purgativo (ALBUQUERQUE, 1980). O decocto e infusão das suas folhas (Figura 3B) e cascas são utilizados para reumatismo, como tônico e febrífugo (ALMEIDA, 1993).

Estudos têm revelado a atividade de *Vismia guianensis* no combate a células cancerígenas. Pasqua e colaboradores (1995) mostraram que a vismiona, metabólito presente em *V. guianensis* e em outras espécies do gênero, mostrou atividade *in vitro* contra linhagem de tumores experimentais – carcinoma de ovário M5076 e melanocarcinoma B16. Suffredini e colaboradores (2007) mostraram uma acentuada atividade letal dos extratos orgânicos e aquosos de *V. guianensis* frente a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humana.

Em *Vismia guianensis* foi detectada a presença de diversos compostos, como a vismiona e a ferruginina; além de xantonas, antraquinonas, benzofenonas e benzocumarinas. A vismiona apresenta potencial atividade antimalárica (Di STASI;

HIRUMA-LIMA, 2002). Seo e colaboradores (2000), a partir de extratos das raízes de *V. guianensis* isolaram cinco benzofenonas (vismiaguiononas A, B, C, D e E) e duas benzocumarinas (vismiagianinas A e B). Monache e colaboradores (1980) identificaram na composição química dos frutos de *V. guianensis* dois antranoides prenilados (γ -hidroxi-ferruginina A e γ,γ -dihidroxi-ferruginina A).

Mais recentemente, compostos fenólicos presentes nos extratos dos frutos de *V. guianensis* têm mostrado atividade antioxidante, como é o caso dos antranoides prenilados ferruginina A e γ -hidroxiferruginina e da antraquinona vismiona A (ÁLVAREZ et al., 2008).



Figura 3 – *Vismia guianensis* (Aubl.): A) copa da árvore; B) detalhe das folhas, onde se observa o verso ferruginoso.

Fonte: Autor

3. Objetivos

Devido ao uso popular e à escassez de pesquisas realizadas com extratos de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby e de *Vismia guianensis* (Aubl.), no tocante à atividade antimicrobiana, o presente trabalho tem como objetivos:

- ❖ Avaliar através de bioensaios a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos das cascas do caule e das folhas de ambas as espécies frente aos fungos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Candida albicans*; e frente às bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, e bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.
 - Identificar, através de bioautografia, a atividade antimicrobiana das frações dos extratos das cascas do caule e das folhas de *Senna reticulata* e de *Vismia guianensis*.
 - Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos vegetais de *Senna reticulata* e de *Vismia guianensis*.
- ❖ Avaliar a citotoxicidade dos extratos hidroetanólicos das cascas do caule e das folhas de *Senna reticulata* e de *Vismia guianensis*.
- ❖ Avaliar a atividade imunológica *in vitro* dos extratos hidroetanólicos das cascas do caule e das folhas de *Senna reticulata* e de *Vismia guianensis* através da produção e inibição de óxido nítrico por células peritoneais de camundongos.

4. Material e Métodos

4.1 MATERIAL

4.1.1 Equipamentos

- Agitador de tubos PHOENIX[®]
- Autoclave vertical PHOENIX[®]
- Balança analítica BEL MARK[®]
- Balança de infravermelho GEHAKA[®]
- Câmara de fluxo laminar VECO[®]
- Câmara de Neubauer BOECO[®]
- Centrífuga FANEN[®]
- Contador de Colônias PHOENIX[®]
- Espectrofotômetro BECKMAN[®] modelo DU-530
- Espectrofotômetro UV/Visível de microplacas Multiskan Ascent Labsystems
- Evaporador rotativo MA 120 – MARCONI[®]
- Estufa para esterilização 400/ 5 SD NOVA ÉTICA[®]
- Estufa para cultura bacteriológica 1.2 digital ECB ODONTOBRÁS[®]
- Moinho de facas TECNAL[®]
- Liofilizador CHRISTH APPHA[®]

4.1.2 Solventes, reagentes e soluções

- 2 β-mercaptoetanol SIGMA
- Acetato de etila SynthLab[®]
- Acetato de chumbo
- Acetona SynthLab[®]
- Ácido acético SynthLab[®]
- Ácido bórico SynthLab[®]
- Ácido clorídrico SynthLab[®]
- Ácido oxálico SynthLab[®]
- Ágar bismuto sulfito DIFCO[®]
- Ágar cetrimida DIFCO[®]

- Ágar eosina azul de metileno (EMB) DIFCO®
- Ágar Mac Conkey DIFCO®
- Ágar Mueller Hinton DIFCO®
- Ágar Sabouraud ACUMEDIA®
- Ágar tioglicolato DIFCO®
- Ágar tríplice açúcar ferro (TSI) DIFCO®
- Ágar verde brilhante DIFCO®
- Ágar Vogel Johnson (VJ) DIFCO®
- Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD) DIFCO®
- Água oxigenada 30%
- Brometo de tiazolil tetrazólio (MTT) SIGMA-ALDRICH®
- Carbonato de cálcio
- Caldo lactosado DIFCO®
- Caldo selenito-cistina DIFCO®
- Caldo soja caseína DIFCO®
- Caldo tetrionato DIFCO®
- Ciprofloxacino SIGMA-PHARMA®
- Cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) SIGMA-ALDRICH®
- Cloreto férrico
- Cloreto de alumínio
- Clorofórmio SynthLab®
- Cromatoplasmas de alumínio de gel de sílica ALUGRAM® SIL G
- Estreptomicina SIGMA
- Etanol SynthLab®
- Éter etílico SynthLab®
- Éter petróleo SynthLab®
- Hexano SynthLab®
- Isopropanol SynthLab®
- Itraconazol (ITRASPOR) SIGMA-PHARMA®
- L-glutamina SIGMA
- Magnésio metálico
- Meio de cultura RPMI-1640 SIGMA

- Metanol SynthLab[®]
- *n*-butanol SynthLab[®]
- Penicilina SIGMA
- Placas de 96 poços
- Reativo de Bertrand
- Reativo de Bouchardat
- Reativo de Dragendorff
- Reativo de Mayer
- Resazurina SIGMA- ALDRICH[®]
- Soro fetal bovino CUTILAB
- Tioglicolato de sódio DIFCO[®]
- Zinco metálico

4.1.3 Micro-organismos

Foram utilizadas cepas fúngicas obtidas da coleção da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cepas clínicas constantes da micoteca do Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). As bactérias utilizadas também foram do tipo padrão ATCC (*American Type Culture Collection*) constantes da bacterioteca do Laboratório de Controle de Qualidade de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (Tabela 1).

Tabela 1 – Micro-organismos utilizados nos bioensaios

FUNGOS		
Espécie	Padrão ATCC	Cepa
		Clínica INPA
<i>Trichophyton rubrum</i>	28.189	U. 897/07
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	9.533	Tp. 394/07
<i>Microsporum canis</i>	2.903	T. cap 279/07
<i>Candida albicans</i>	36.232	T. cruris 72/03
BACTÉRIAS		
Espécie	Cepa padrão ATCC	
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	
<i>Escherichia coli</i>	10536	
<i>Enterococcus faecalis</i>	7080	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	

4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

4.2.1 Área de coleta

O material vegetal, composto por folhas e cascas de *Senna reticulata* e de *Vismia guianensis*, foi coletado na área urbana da cidade de Manaus-AM, nos bairros Flores (Zona Centro Oeste), Novo Aleixo (Zona Leste), Cidade Nova (Zona Norte) e Coroado (Zona Leste), conforme apresentado na Figura 4.

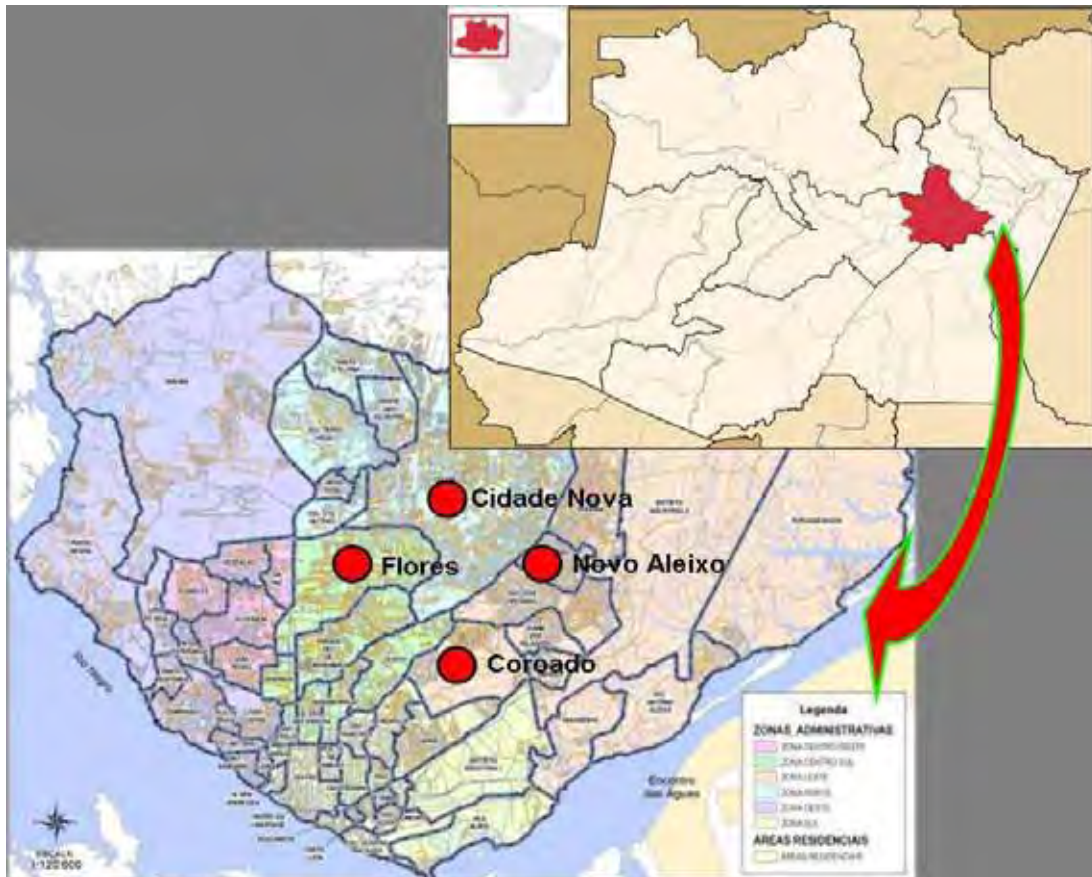


Figura 4 – Mapa da cidade de Manaus, representando os locais de coleta do material vegetal.

Fonte: WWW.arsam.am.gov.br

4.2.2 *Vismia guianensis* (Aubl.)

A coleta das amostras de *Vismia guianensis* foi realizada no mês de dezembro de 2008 a partir de dois indivíduos encontrados em torno do Instituto de Ciências Humanas e Letras (ICHL) e da Faculdade de Estudos Sociais (FES)/Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), bairro Coroadó, sendo coletadas cascas do caule e folhas.

Os indivíduos, adultos, foram avaliados quanto ao porte em relação à altura e ao DAP (Diâmetro a Altura do Peito). Representantes férteis foram utilizados na confecção de exsicata, para identificação botânica e depósito no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. A exsicata foi registrada sob o número 213.331.

As cascas e folhas (Figura 5A e 5B) foram submetidas à triagem visível com a finalidade de selecionar os representantes mais íntegros (ausência de fungos, degradação por insetos, entre outros). Antes de serem lavadas para retirada das sujidades, foi medida a massa no estado fresco. Em seguida foram deixadas para secar, ao ar, em superfície limpa e ao abrigo da luz, nas dependências do Laboratório de Micologia Médica/CPCS/INPA. Após a secagem, fez-se uma nova pesagem, para a determinação da perda de água e substâncias voláteis.



Figura 5 – Secagem das cascas (A) e folhas (B) de *Vismia guianensis* (Aubl.).

Fonte: Autor

4.2.3 *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

A coleta de *Senna reticulata* foi realizada no mês de janeiro de 2009, nos bairros Flores (Zona Centro Oeste), Novo Aleixo (Zona Leste) e Cidade Nova (Zona Norte), da cidade de Manaus/AM. Os indivíduos adultos foram submetidos aos mesmos procedimentos de confecção de exsiccatas, triagem, secagem e moagem realizado com a espécie *Vismia guianensis*, descritos no item 4.2.2.

A exsiccata para a identificação botânica da espécie *Senna reticulata* está depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, sob o número 212.539.

A Figura 6 esquematiza a metodologia empregada para obtenção do material vegetal.

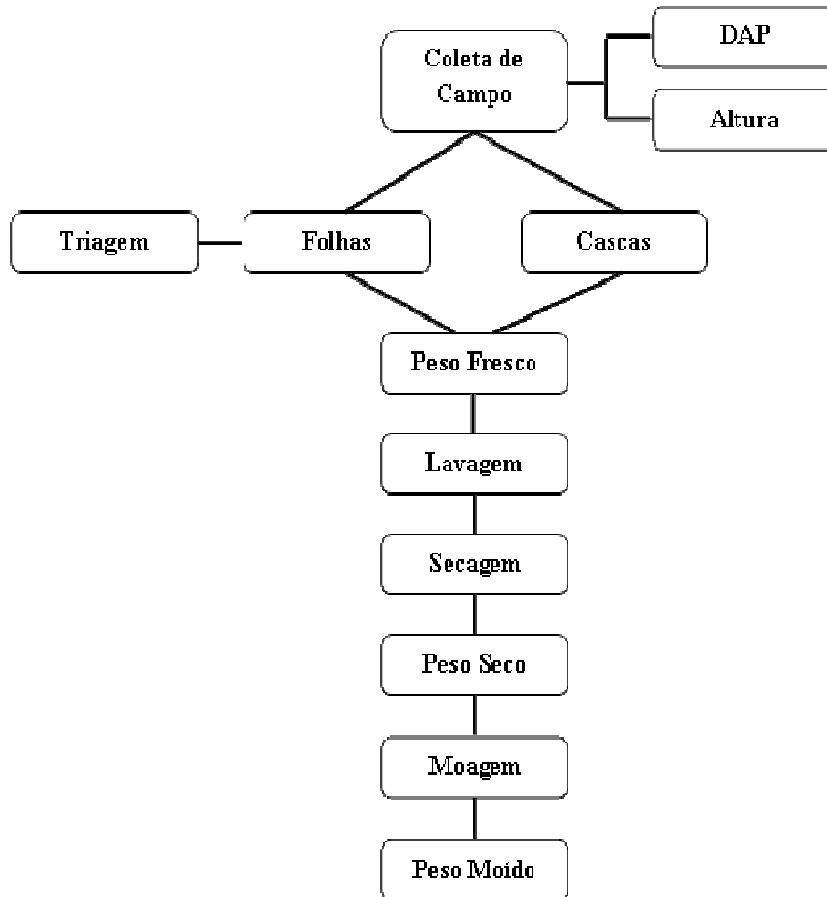


Figura 6 – Esquema de obtenção do material vegetal a partir da coleta.

A moagem do material vegetal seco foi realizada no Laboratório de Química da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais do INPA (CPPN/INPA). As extrações foram realizadas no laboratório de Controle Microbiológico de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS E FRAÇÕES

Os extratos hidroetanólicos 70% (EB) das cascas e folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata* foram obtidos por maceração durante 7 dias ao

abrigo da luz, com agitação ocasional. A proporção empregada entre a droga vegetal pulverizada e o líquido extrator foi 10% (p/v). A solução extrativa obtida após filtragem em papel filtro foi concentrada em evaporador rotatório com temperatura não superior a 40 °C, obtendo-se assim os extratos brutos. Em seguida, os extratos foram liofilizados, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara. Os extratos foram utilizados nos ensaios de bioautografia e para a determinação da concentração inibitória mínima dos fungos e bactérias.

4.3.1 Frações hexânicas, acetato-etílicas e *n*-butílicas

Os extratos macerados foram fracionados, utilizando os solventes hexano (Hex), acetato de etila (AcEt) e *n*-butanol (*n*-BuOH), os quais originaram, respectivamente, as frações FHex, FAcEt e FBut (Figura 11). A fração restante, após as extrações com os solventes, foi denominada fração final (FF). As frações foram utilizadas nos ensaios de bioautografia.

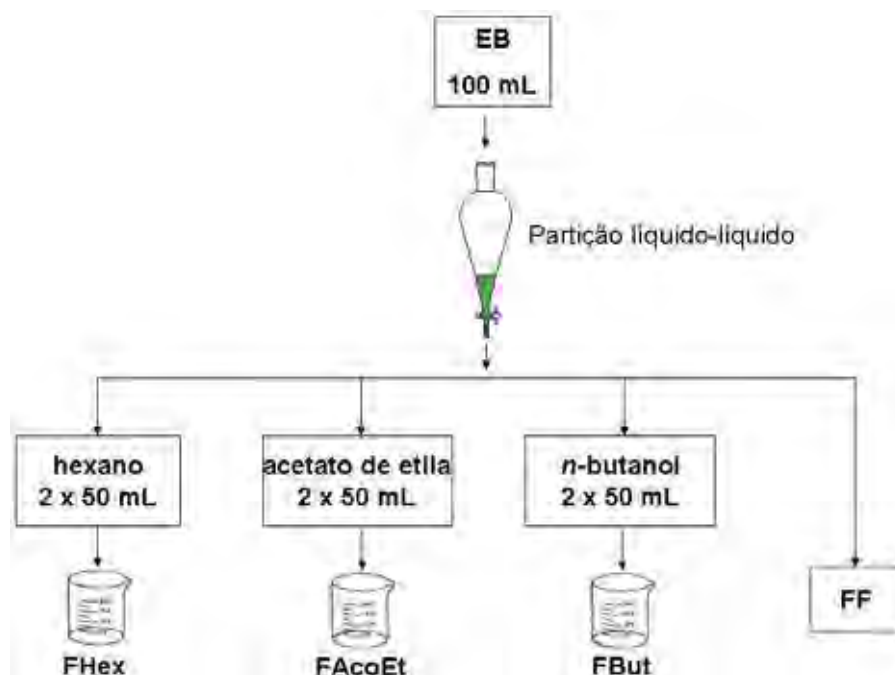


Figura 7 – Esquema da partição líquido-líquido para obtenção das frações dos extratos hidroetanólicos de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*.

4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DE *Vismia guianensis* (Aubl) E DE *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (FARMACOPÉIA, 1988; COSTA, 1994; WHO, 1998)

4.4.1 Determinação da perda por dessecação em balança de infravermelho (COSTA, 1994)

Amostras de 4 g das cascas e folhas pulverizadas de *V. guianensis* e de *S. reticulata* foram submetidas ao aquecimento (110 °C) através de raios infravermelhos pelo período de aproximadamente 1 h. Após 1 h foi feita a primeira leitura e o procedimento foi repetido de hora em hora até que a massa não variasse mais do que 0,25 g. Os valores foram expressos em porcentagem (% p/p), pela média de três determinações.

4.4.2 Determinação do pH (FARMACOPÉIA, 1988)

Em erlenmeyer, 99,00 g de água foram colocados em chapa-elétrica até ebulição por 5 min, posteriormente procedeu-se o método extrativo de infusão por 15 min com 1 g da droga vegetal. O extrato foi filtrado com algodão e após esfriamento verificou-se o pH em peagômetro, previamente calibrados em pH 4 e pH 9. Para uma melhor reprodutibilidade deste teste o pH da água também foi verificado como parâmetro para posteriores análises. O resultado representa a média de 3 determinações.

4.4.3 Determinação do teor de cinzas totais (FARMACOPÉIA, 1988)

A determinação do teor de cinzas totais foi realizada segundo a Farmacopéia Brasileira (1988) com amostras pulverizadas das cascas e folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*. O cadinho de porcelana foi previamente calcinado em mufla a 450 °C por 30 min. O mesmo foi resfriado em dessecador (15 min) e seu peso (tara) determinado em balança analítica. Posteriormente, adicionou-se

exatamente 3 g de cada amostra que foram incineradas e submetidas à calcinação em mufla à temperatura de 450 °C por 2 h. Após arrefecimento em dessecador, foram pesados até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de peso de cinzas na droga (% p/p) e equivalem à média de três determinações para cada amostra.

4.4.4 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido (COSTA, 1994)

As cinzas previamente obtidas no ensaio de cinzas totais foram aquecidas à ebulição por 5 min com 25 mL de solução de ácido clorídrico 10% (p/v) e posteriormente completou-se o volume de 100 mL com água destilada. A solução obtida foi filtrada em papel de filtro isento de cinzas, lavando com água quente até o filtrado se mostrar límpido. Transferiu-se o papel de filtro com as cinzas retidas para um cadinho e incinerou em mufla a 800 °C até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de peso de cinzas insolúveis em ácido (% p/p) e equivalem à média de 3 determinações.

4.4.5 Determinação da densidade aparente não compactada (FARMACOPÉIA, 1988)

A densidade aparente não compactada das cascas e das folhas pulverizadas de *V. guianensis* e de *S. reticulata* foi determinada pela razão entre a massa da droga vegetal seca e pulverizada e o volume fixo de 250 mL verificado em proveta graduada. Os resultados representam a média de 3 determinações.

4.4.6 Determinação de matéria extraível (WHO, 1998)

Amostras de 4 g do pó das cascas e das folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*, exatamente pesadas, foram colocadas para macerar, por 6 horas, em erlenmeyer com 100 mL de álcool 70°GL, agitando frequentemente. Após este período o extrativo foi deixado em repouso por 18 horas e em seguida foi filtrado. Uma alíquota de 25 mL do filtrado foi transferida para placa de Petri e posta para

evaporar até secar em banho-maria. Em seguida o material foi seco a 105 °C por 6 horas. Após este período o material foi resfriado em dessecador por 30 minutos e pesado. Os resultados em foram expressos mg/g de matéria extraível no material seco e representam as médias de 3 determinações.

4.4.7 Controle microbiológico dos pós das cascas e das folhas de *Vismia guianensis* (Aubl) e de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

4.4.7.1 Contagem total de micro-organismos

Foram transferidos, assepticamente, 10,0 g da droga vegetal moída para 90,0 mL de solução tampão fosfato pH 7,2 (Solução A) para contagem de micro-organismos totais. A Solução A foi agitada durante 10 min. Após a homogeneização, foram pipetados 0,1 mL e 1,0 mL da amostra 1:10 para placas de Petri e adicionados 20,0 mL de ágar tioglicolato para a contagem de bactérias e ágar Sabouraud para a contagem de fungos. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C ± 1 °C por 24 h e a 25 °C ± 1 °C por 7 dias para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem do número de colônias com o auxílio de contador de colônias, calculando o número de unidades formadoras de colônias (UFC/g).

4.4.7.2 Pesquisa de Salmonella sp e Escherichia coli

Para a pesquisa de *Salmonella* e *E. coli*, 10,0 mL da Solução A foram transferidos, assepticamente, para 90,0 mL de caldo lactosado e incubados a 35 °C ± 1 °C durante 24 a 48 h. Após este período, 1,0 mL de caldo lactosado foi transferido para 2 tubos contendo caldo tetrionato e caldo selenito cistina, os quais foram incubados a 35 °C ± 1 °C por 24 h. Em seguida, uma alçada do caldo tetrionato e do caldo selenito cistina foi semeada em três placas de Petri, uma contendo ágar verde brilhante, uma contendo agar xilose-lisina-desoxicolato e outra contendo ágar bismuto sulfito. As placas foram incubadas a 35 °C ± 1 °C por 24 h. O

crescimento e as características das colônias foram observados. As colônias suspeitas foram semeadas em tubo contendo ágar tríplice açúcar-ferro (TSI) e incubado a 35 °C ± 1 °C por 24 h. A confirmação da *Salmonella* foi feita por método de Gram.

Na pesquisa de *E. coli*, 1,0 mL do caldo lactosado foi transferido para placa contendo ágar Mac Conkey e incubado a 35 °C ± 1 °C por 24 h. Após este período, as colônias suspeitas foram semeadas em ágar eosina-azul de metileno (EMB) e incubadas a 35 °C ± 1 °C por 24 h. A confirmação de *E. coli* foi realizada pelo método de Gram.

4.4.7.3 Pesquisa de Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa

Assepticamente, 10,0 mL da Solução A foram transferidos para 90,0 mL de caldo soja-caseína para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e incubados a 35 °C ± 1 °C por 24 a 48 h. Em seguida, uma alçada foi semeada em placas de Petri contendo ágar Vogel Johnson, para a pesquisa de *S. aureus* e ágar cetrimida, para a pesquisa de *P. aeruginosa*, as quais foram incubadas a 35 °C ± 1 °C por 24 h. As características das colônias foram observadas após este período e a confirmação foi realizada pelo método de coloração de Gram.

4.4.8 Controle microbiológico dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) e de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

Foi realizada a análise microbiológica dos extratos hidroetanólicos liofilizados das cascas e das folhas das espécies vegetais estudadas, conforme descrito no item 4.4.7.

4.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR (COSTA, 1994 ; MATOS, 1997)

4.5.1 Pesquisa de antraquinonas

4.5.1.1 Antraquinonas livres

Agitou-se 1 g do material vegetal com 10 mL de éter etílico, filtrando posteriormente. À solução etérea, foi adicionado 1 mL de amônia diluída, agitando em seguida. A camada aquosa deve tornar-se rósea indicando resultado positivo.

4.5.1.2 Glicosídeos antraquinônicos (reação de Bornträger)

Adicionou-se 20 mL de água destilada ao material vegetal anterior seco e fervendo posteriormente por 5 min. Ao filtrado obtido desta extração foram adicionados 10 mL de ácido clorídrico e 3 mL de água oxigenada 30%. A solução foi submetida à ebulição por 5 min e após resfriamento e filtragem efetuou-se duas extrações com 5 mL de éter etílico. As duas fases etéreas obtidas foram reunidas agitando-as com 3 mL de amônia diluída. O desenvolvimento de coloração rósea na camada aquosa indica a presença de glicosídeos antraquinônicos.

4.5.2 Pesquisa de saponinas

A solução extrativa para pesquisa de saponinas foi obtida pela adição de 10 mL de água destilada em 2 g do material vegetal e posterior aquecimento à ebulição por 3 min, filtrando através de algodão para um tubo de ensaio. Em seguida agitou-se verticalmente e vigorosamente o tubo de ensaio contendo a solução extrativa durante 20 s. O resultado positivo é indicado pela presença de espuma persistente por 20 min e resistente à adição de 1 mL de HCl 2*N*.

4.5.3 Pesquisa de alcaloides

Foram colocados 5 g do material vegetal pulverizadas alcalinizando-as com carbonato de sódio a 10% e posteriormente adicionou-se 25 mL de clorofórmio. A mistura obtida foi filtrada em funil de separação através de papel previamente embebido com clorofórmio e particionada com 7 mL de ácido clorídrico 2%. A camada ácida foi separada e utilizada nas reações de caracterização. Uma gota da solução foi aplicada em lâmina de microscópio ao lado de uma gota dos reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer ou Bertrand unindo-as posteriormente. O resultado positivo é observado pela precipitação da mistura sobre fundo escuro.

4.5.4 Pesquisa de taninos

Inicialmente preparou-se decoctos com 5 g do material vegetal em 100 mL de água destilada.

4.5.4.1 Reação da gelatina

Foram adicionados 2 gotas de ácido clorídrico (HCl) em 2 mL da solução extrativa e posteriormente solução de gelatina 2,5% gota a gota. A formação de precipitado indica a presença de taninos.

4.5.4.2 Reação com sais de ferro

Foram adicionados 10 mL de água destilada em 2 mL da solução extrativa e 4 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl_3) a 1% em metanol. O desenvolvimento de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, enquanto a coloração verde indica a presença de taninos condensados.

4.5.4.3 Reação com acetato de chumbo

À 5 mL da solução extrativa foram adicionados 10 mL de solução de ácido acético 10% e 5 mL de solução de acetato de chumbo 10%. A formação de precipitado esbranquiçado indica reação positiva para taninos hidrolisáveis.

4.5.5 Pesquisa de flavonoides

A extração foi realizada com 3,00 g do material vegetal e 20 mL de éter de petróleo sob aquecimento em banho-maria filtrando logo em seguida. O resíduo obtido após filtração foi transferido para béquer e após secagem adicionou-se 20 mL de metanol, aquecendo por 10 min em banho-maria. Filtrou-se ainda a quente e o filtrado foi evaporado até *secura* e o resíduo foi tratado com 10 mL de etanol, obtendo assim o extrato final.

4.5.5.1 Reação de Shinoda

Do extrato final transferiu-se uma alíquota de 1 mL para tubo de ensaio e posteriormente adicionou-se um fragmento de magnésio metálico e ácido clorídrico concentrado gota a gota. O resultado positivo é observado pelo aparecimento de coloração rósea ou vermelha após o desprendimento de hidrogênio.

4.5.5.2 Reação de Taubock

Evaporaram-se até *secura* em banho aquecimento, 3 mL do extrato, esfriando e umedecendo o resíduo com algumas gotas de acetona. Posteriormente, foram adicionados alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico evaporando posteriormente em banho-maria até *secura* evitando aquecimento prolongado. O resíduo obtido foi dissolvido em 5 mL de éter etílico e a mistura obtida observada sob luz ultravioleta (254 nm). O aparecimento de fluorescência amarelo-esverdeada indica a presença de flavonoides.

4.5.5.3 Reação de Pew

Em banho-maria foram evaporados até secura 3 mL do extrato final em tubo de ensaio e ao resíduo foram adicionados 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico e algumas gotas de ácido clorídrico concentrado. O resultado positivo é confirmado pelo surgimento de coloração vermelha.

4.5.5.4 Reação do cloreto férrico

Adicionaram-se algumas gotas de cloreto férrico a 2% a 1 mL do extrato final. Dependendo do flavonóide presente, a coloração varia entre verde, amarelo ou ainda violáceo.

4.5.5.5 Reação do cloreto de alumínio

Foram umedecidas diferentes áreas de papel de filtro com o extrato colocando sobre cada uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. O aparecimento de fluorescência verde-amarelada sob luz ultravioleta indica resultado positivo.

4.6 BIOENSAIOS

4.6.1 Bioautografia

4.6.1.1 Preparo da CCD

Foram utilizadas placas de sílica-gel (ALUGRAM[®] SIL G) de 8 x 4 cm. As placas foram colocadas em estufa à temperatura de 38 °C ± 1 °C por 30 minutos para ativação e eliminação da umidade. Os extratos brutos das cascas e folhas de *S. reticulata* e de *V. guianensis* e as frações foram diluídos em metanol e, com o auxílio de capilar, foram aplicados sobre as placas, que foram colocadas para eluir em cuba

previamente preparada e saturada com os solventes da fase móvel. Foram testados vários sistemas de solventes: (I) clorofórmio-metanol (75:25, v/v), (II) clorofórmio-metanol (9:1, v/v), (III) hexano-acetato de etila (85:15, v/v), (IV) hexano-acetato de etila (7:3, v/v), (V) hexano-acetato de etila (6:4, v/v), (VI) hexano-acetona (6:4, v/v), (VII) hexano-acetato de etila-isopropanol (4:4:2, v/v), (VIII) acetato de etila-isopropanol-água (100:17:13, v/v) e (IX) *n*-butanol-ácido acético-água (65:15:25, v/v). Após a eluição, as placas foram secas ao ar ambiente, observadas sob luz ultravioleta em comprimentos de onda de 254 e 360 nm e as bandas cromatográficas foram marcadas com lápis.

4.6.1.2 Preparo do inóculo bacteriano

Para os ensaios foram utilizadas cepas padrão de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, descritas na Tabela 1. A ativação da bactéria foi realizada em ágar Mueller-Hinton (Difco), a 35 °C ± 1 °C por 24 horas de incubação. Posteriormente, entre 4 e 5 colônias foram suspensas em solução salina estéril (0,85%). A padronização do inóculo foi realizada por comparação com a escala de MacFarland 0,5 e com auxílio de espectrofotômetro em comprimento de onda de 520 nm (T = 75 e 80%), obtendo-se o correspondente a 1,5 x 10⁸ UFC/mL. O espectrofotômetro foi zerado utilizando solução salina. Posteriormente, 100 µL do inóculo foram adicionados ao meio de cultivo (diluição 1/100), obtendo-se suspensão de 1,5 x 10⁶ UFC/mL utilizada nos ensaios.

4.6.1.3 Preparo do inóculo fúngico

Foram utilizadas cepas padrão e clínicas dos dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e da levedura *Candida albicans*, descritos na Tabela 1.

De cada cultivo de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* em ágar Sabouraud, entre 10 e 15 dias de desenvolvimento, e *C. albicans* com 24 horas de desenvolvimento, tomou-se uma alçada (3 mm Ø), que foi colocada em tubo

contendo pérolas de vidro, as quais foram submetidas à agitação em vortéx com a finalidade de desagregar as unidades formadoras de colônias (UFC) e logo em seguida suspensas em 4 mL de solução fisiológica esterilizada (0,85%) e novamente submetidas à agitação. Para padronização dos inóculos, utilizou-se o espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm e transmitância entre 65% e 70% (FERNÁNDEZ-TORREZ *et al.*, 2001; PUJOL *et al.*, 2002) para os dermatófitos, *C. albicans* 75% a 77%, obtendo-se o correspondente a 10^6 UFC/mL de inóculo (Figura 8).

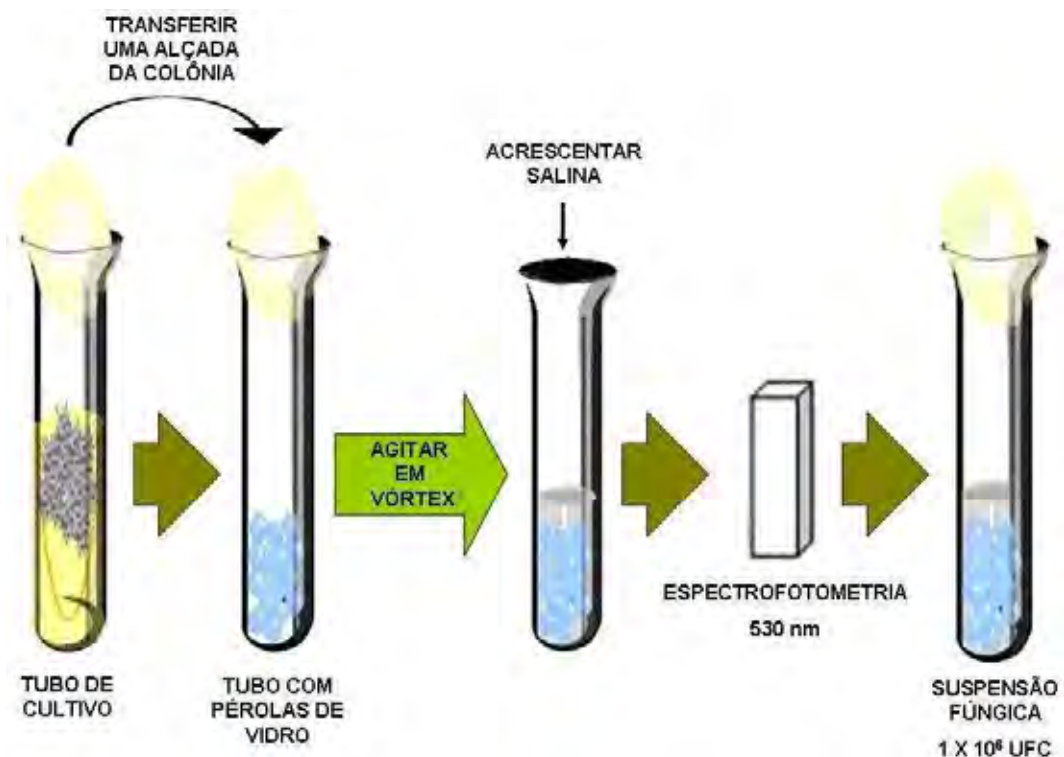


Figura 8 – Procedimento de padronização dos inóculos fúngicos.

4.6.1.4 Ensaios bioautográficos

As placas cromatográficas com os extratos brutos de *S. reticulata* e de *V. guianensis* e as frações eluídas foram colocadas em placas de Petri e, as quais foram adicionadas de uma fina camada de 5 mL de meio de cultivo (ágar Mueller Hinton para bactérias e ágar Sabouraud para leveduras) inoculado com cada um dos microorganismos (Figura 9), com o auxílio de pipetador automático e pipeta graduada

estéril. Após a solidificação, as placas foram acondicionadas em ambiente úmido, sendo colocadas dentro de saco plástico contendo compressa de gaze embebida em água destilada estéril. As placas foram incubadas em estufa de crescimento microbiológico a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h para bactérias e leveduras, e a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h para os dermatófitos. Ciprofloxacino e itraconazol foram utilizados como controle positivo para bactérias e fungos, respectivamente. Os ensaios foram realizados em triplicata.

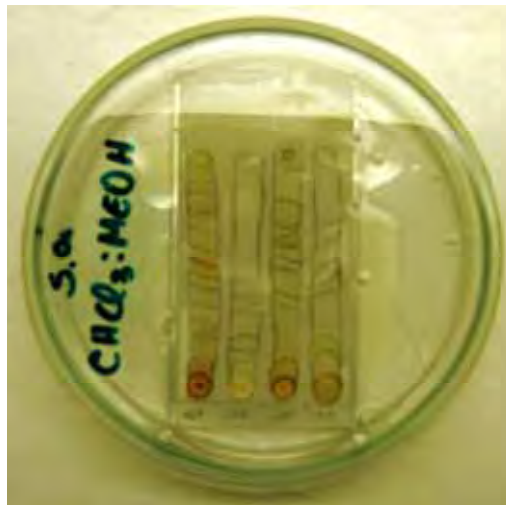


Figura 9 – Ensaio bioautográfico dos extratos de *V. guianensis* e de *S. reticulata*.

4.6.1.5 Revelação das placas

Para verificar a formação dos halos de inibição de crescimento microbiano foi aplicada sobre as placas solução aquosa (20 mg/mL) de cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio (TTC) para a bactéria, e solução aquosa (2,5 mg/mL) de brometo de tiazolil tetrazólio (MTT) para a levedura e fungos dermatofíticos, a fim de revelar o crescimento microbiano, revelando as regiões inibitórias dos extratos.

4.6.2 Determinação da CIM por microdiluição

Para os ensaios de microdiluição foram utilizados extratos hidroalcoólicos (álcool 70 °GL) das folhas e das cascas de ambas as espécies, preparados por maceração (100 mg/mL). Foi utilizada microplaca de 96 poços e resazurina, como

indicador de desenvolvimento microbiano. Foram feitas sucessivas diluições (1:2) nos próprios poços, a fim de obter as concentrações testes dos extratos que variaram de 100 mg/mL a 0,39 mg/mL e de 1 mg/mL a 0,0039 mg/mL.

Para os testes de atividade antifúngica foi utilizado como controle positivo o itraconazol. Foi preparada uma solução estoque de 4 mg/mL, na qual 100 mg do antifúngico foram diluídas em 25 mL de água destilada estéril. Desta solução foi retirada uma alíquota de 220 µL que foi diluída em 25 mL de água destilada obtendo-se a solução teste na concentração de 35,2 µg/mL antifúngico.

Para os ensaios de atividade antibacteriana foi utilizado como controle positivo o ciprofloxacino, preparado nas mesmas condições do itraconazol.

4.6.2.1 Preparo dos inóculos fúngicos

As suspensões fúngicas foram preparadas conforme descrito no item 4.5.1.3. A partir delas procedeu-se à diluição 1:50 em meio de cultivo líquido para os dermatófitos, e 1:2.000 para *C. albicans*, procedimentos recomendados por CLSI/M38-A e MP-27A2.

4.6.2.2 Preparo do inóculos bacterianos

As colônias de bactérias foram cultivadas em caldo Mueller Hinton por um período de 24 horas. Após este período foi feita a padronização do inóculo em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 530 nm e transmitância entre 25%, a fim de se obter 1×10^6 UFC.

4.6.2.3 Montagem do ensaio

Os testes de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados em placas de 96 poços, distribuídos em 8 fileiras horizontais (A-H) e 12 colunas verticais (1-12), aos quais foram adicionados os reagentes conforme a seguir descritos:

Meio de cultura: em todos os poços, foram adicionados 100 µL de caldo Sabouraud para os testes de atividade antifúngica e 80 µL para os testes de atividade antibacteriana.

- Extratos: foram adicionados 100 µL dos extratos nos poços das colunas 2 e 3.
- Controle positivo: os poços de 12E a 12H receberam 100 µL de itraconazol e ciprofloxacino para os testes de atividade antifúngica e antibacteriana, respectivamente.
- Diluições: a partir da coluna 3 até a coluna 11 foram realizadas as sucessivas diluições do extrato teste.
- Inóculo: da coluna 3 até a coluna 12 todos os poços receberam 100 µL de inóculo fúngica e 20 µL de inóculo bacteriano.

A Figura 10 esquematiza como foram preparadas as microplacas. As placas foram incubadas à 35 °C ± 1 °C por 24 h para a levedura e para as bactérias; e à 25 °C ± 1 °C por 72 horas para os dermatófitos. Os ensaios foram feitos em triplicata.

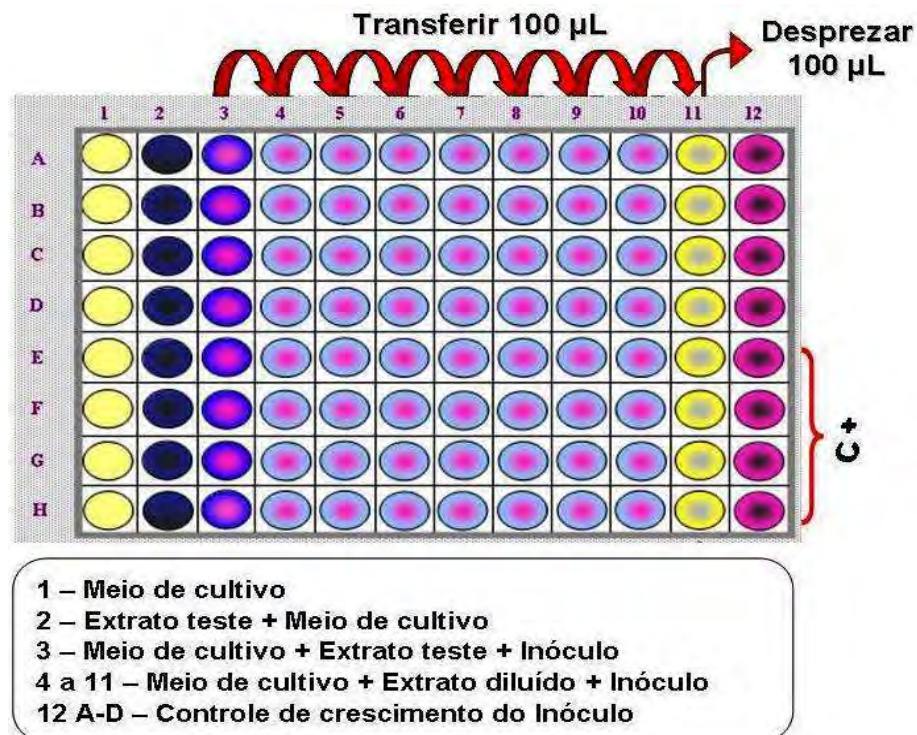


Figura 10 – Representação do ensaio de microdiluição para determinação da atividade antifúngica dos extratos de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*.

4.6.2.4 Leitura

Após o período de incubação foi feita a leitura dos resultados. Primeiramente, foi feita a leitura visual com lupa, onde foi possível observar o crescimento microbiano nos poços, demonstrado pela turbidez do meio. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução aquosa (0,05%) de resazurina como substância óxido-reutora indicadora de crescimento microbiano, para revelar o crescimento fúngico. Para as bactérias foram adicionados 50 µL de solução aquosa (0,01%) de resazurina. A Figura 11 demonstra o mecanismo do corante.

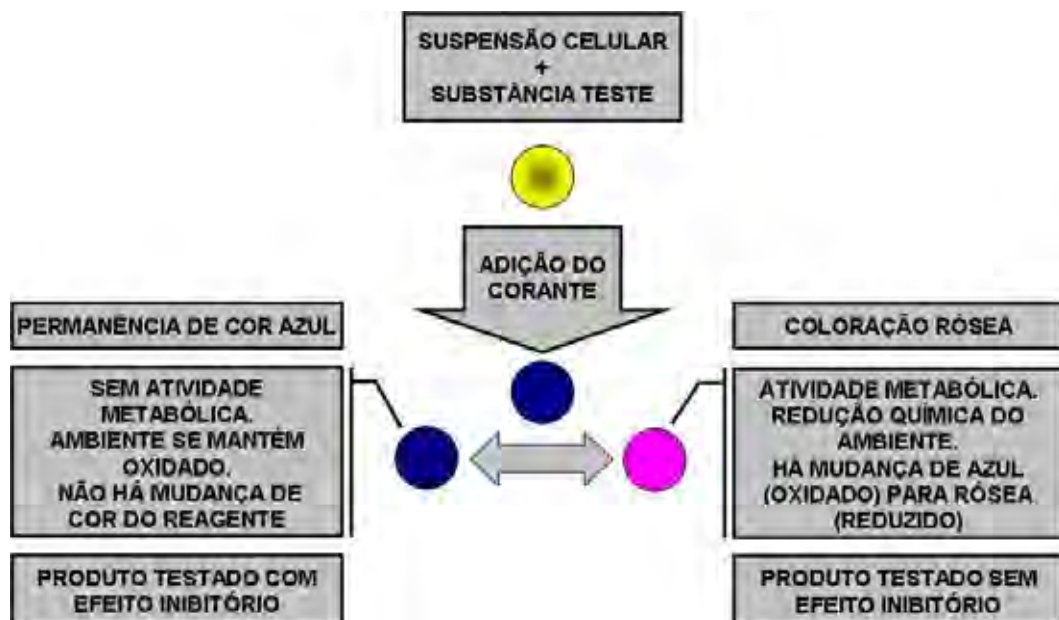


Figura 11 – Mecanismo do reagente resazurina para a determinação da CIM por microdiluição.

4.7 ATIVIDADE IMUNOLÓGICA

4.7.1 Animais

Em cada experimento foram utilizados 5 camundongos Swiss machos de 6 semanas, pesando entre 18 e 15 g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, situado na cidade de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, com água e ração *ad libitum* em local climatizado ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $56 \pm 2\%$ de umidade relativa do ar), com controle de claro e escuro a cada período de 12 horas. Parecer do Comitê de Ética nº 06/2005.

4.7.2 Obtenção das células do exsudato peritoneal

Os animais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0 mL de tioglicolato de sódio a 3,0%, três dias antes da coleta de células. Após esse período, os animais foram eutanasiados por inalação em câmara de CO_2 . Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar e o peritônio exposto. Na porção mediana superior do abdômen foram injetados 5,0 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril em pH 7,2 e a 4°C , com auxílio de seringa e agulhas também estéreis. Uma leve massagem manual foi realizada e as células do exsudato peritoneal foram coletadas com a mesma seringa e dispensadas em tubo cônico estéril para preparo da suspensão celular. As células do exsudato peritoneal foram lavadas três vezes com 5 ml de PBS (pH 7,2) e centrifugadas a $400 \times g$ por 5 minutos em centrífuga à temperatura ambiente. As células sedimentadas foram ressuspendidas em 1,0 mL de meio de cultura RPMI-1640 contendo 2β -mercaptoetanol a $2 \times 10^{-5} M$, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL, L-glutamina 2 Mm e 5% de soro fetal bovino, sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C). O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica de Neubauer com a utilização de 10 μL da suspensão celular diluída em 90 μL do Líquido de

Lázarus. As células foram ajustadas à concentração ideal para cada ensaio em meio RPMI-1640-C.

4.7.3 Avaliação da viabilidade celular de células do exsudato peritoneal

Foi empregada para a determinação da viabilidade celular a técnica colorimétrica utilizando uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia na verificação da atividade e integridade mitocondrial, interpretada como uma medida de viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Esta metodologia baseia-se na redução do sal de MTT por enzimas microssomais e também pela enzima succinato desidrogenase mitocondrial das células viáveis. Os produtos dessa redução são cristais de formazana, insolúveis e de cor púrpura, acumulando-se nas células devido à sua incapacidade de atravessar a membrana celular. O álcool isopropílico, por sua vez, é utilizado para a solubilização da formazana, produzindo uma solução homogênea que possibilita a medição da densidade óptica em espectrofotômetro UV/Visível.

Foram utilizadas suspensões de PEC, ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL. 100 μ L dessas suspensões foram adicionados em placas de 96 cavidades. As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C e 5% de CO₂. Após este período, o sobrenadante foi descartado. Alíquotas de 100 μ L de RPMI-C e 100 μ L dos extratos em diferentes concentrações: 50, 100, 200 e 400 μ g/mL, LPS a 10 μ g/mL ou somente o meio de cultura RPMI-1640 foram pipetados. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 5% de CO₂. Após esse período, foram adicionados sobre a cultura celular, 100 μ L de uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) a 1,0 mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após este período, o conteúdo da placa foi vertido e 100 μ L de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais de formazana

formados. Somente células e meio de cultura RPMI-1640-C foram utilizados como controle, equivalendo a 100% de viabilidade dos macrófagos. A leitura foi feita em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas a 540 nm com filtro de referência a 620 nm (MOSMANN, 1983).

4.7.4 Determinação da produção de óxido nítrico

O óxido nítrico foi quantificado pelo acúmulo de nitrito em meio de cultura e medido espectrofotometricamente utilizando o reagente de Griess com NaNO_2 como padrão (GREEN et al., 1982).

A suspensão celular obtida foi ajustada a 5×10^6 células/mL em meio de RPMI-1640. Foram distribuídos 100 μL dessa suspensão celular em placa de 96 cavidades estéreis. Após este período, o sobrenadante foi descartado. Em algumas cavidades da placa, foram adicionados 100 μL dos extratos na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, em outras, 100 μL da solução de LPS a 10 $\mu\text{g/mL}$ como agente estimulante (controle positivo), e em outras cavidades ainda, foram adicionadas 100 μL de meio RPMI-1640 à suspensão celular, como controle de células (controle negativo). A placa assim constituída foi incubada por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de CO_2 (5%). Após a incubação, foram retiradas alíquotas de 50 μL de cada amostra, sendo passadas para outra placa e adicionados mais 50 μL /cavidade de reagente de Griess, constituído de 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina, 0,1% de sulfanilamida em solução ácido fosfórico a 3%. Após 10 minutos à temperatura ambiente no escuro, as placas foram lidas em espectrofotômetro UV/Visível de microplacas com filtro de 540 nm. As concentrações de nitrito de sódio foram calculadas a partir de uma curva padrão previamente estabelecida com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio em meio RPMI-1640. Os testes foram realizados em triplicata e os valores expressos em μmols de $\text{NO}/5 \times 10^6$ células.

4.7.5 Determinação da atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata* em culturas de células peritoneais de camundongos quanto à produção de NO

Células do exsudato peritoneal (PEC), na concentração de 5×10^6 células/mL, foram utilizadas. As células foram incubadas em presença concomitante de 100 μ L de solução de LPS (10 μ g/mL) e 10 0μ L dos extratos na na concentração de 50 μ g/mL. A incubação foi feita por 24 horas em estufa a 37°C com tensão constante de 7,5% de CO₂. A produção de NO foi medida espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess de acordo com o item 4.7.4.

4.7.6 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada por intermédio do programa estatístico GraphPad InStat aplicando-se análise de variância com determinação do nível de significância para $p < 0,05$, através de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados usando cinco animais e cada determinação foi executada em triplicata.

5. Resultados e Discussão

5.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A Tabela 2 demonstra os resultados da coleta do material vegetal.

Tabela 2 – Massa das amostras de cascas e folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*

	Cascas		Folhas	
	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
<i>Vismia guianensis</i>	1915,2	302,8	1611,6	229,3
<i>Senna reticulata</i>	1848,8	272,4	1658,8	244,0

Na análise, os indivíduos da espécie *Vismia guianensis* mediram entre 3 e 5 metros de altura, com DAP do caule com cerca de 22 cm. Após a triagem foram obtidos 1611,6 g de folhas e 1915,2 g de cascas "in natura". Depois de secas, as amostras de folhas e cascas foram pesadas, sendo seus pesos secos de 229,3 g e 302,8 g, respectivamente. Após as amostras foram pulverizadas, em moinho elétrico de facas. Finalmente, nova pesagem foi realizada nos pós de folhas e cascas obtendo-se, respectivamente, 221,9 g e 181,0 g.

Os indivíduos de *S. reticulata* mediram cerca de 3 m de altura e DAP do caule na faixa de 14 a 17 cm apresentando muitas folhas, de onde se obteve 1658,8 g de folhas e 1848,8 g de cascas "in natura". Após a secagem, verificou-se que as quantidades de folhas e de cascas secas obtidas foram de 244,0 g e 272,4 g, respectivamente. Após pulverização obteve-se 240,2 g de pó de folhas e 245,9 g de pós de cascas de *S. reticulata*.

A secagem pode aumentar o número de modificações físicas e químicas negativas, alterando a qualidade da matéria-prima para a sua comercialização como, por exemplo, mudanças em aparência (coloração), cheiro e possíveis perdas de constituintes voláteis. Esses fatores requerem trabalhos de pesquisa, cujo objetivo é

estudar os possíveis efeitos da secagem e do armazenamento de plantas medicinais, sob condições pré-estabelecidas (BARITAUX et al., 1992).

A secagem é importante, pois diminui a velocidade de deterioração do material, por meio da redução no teor de água, atuando regressivamente na ação das enzimas possibilitando a conservação das plantas por maior tempo. Com a redução da quantidade de água, aumenta-se, também, a quantidade de princípios ativos em relação à massa seca (SILVA & CASALI, 2000).

5.2 CONTROLE DE QUALIDADE DE *Vismia guianensis* (Aubl) E DE *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

5.2.1 Determinação da perda por dessecação em balança de infravermelho

A determinação da perda por dessecação das folhas e cascas de *V. guianensis* e de *S. reticulata* foi realizada em balança de infravermelho à temperatura de 110 °C por cerca de 3 horas apresentando uma perda de 11,0% para as cascas e 8,7% para as folhas de *V. guianensis* quando ocorreu estabilização do processo. Para as cascas e folhas de *S. reticulata* a perda foi de 9,1% para as cascas e 9,1% para as folhas. Este resultado representa a média de três resultados e encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela Farmacopéia Brasileira (1988), na qual a especificação de umidade para drogas vegetais encontra-se entre 8 e 14%, evitando assim que o material sofra algum tipo de degradação tanto enzimático quanto pela contaminação excessiva por micro-organismos.

5.2.2 Determinação do pH

Outro parâmetro importante para a caracterização de um material vegetal é o pH; os valores obtidos pela média de 3 determinações foi de 6,26 para as cascas e de 4,14 para as folhas de *V. guianensis*, mostrando-se praticamente neutro para as

cascas. Para *S. reticulata* o pH foi de 5,26 para as cascas e de 5,83 para as folhas. O pH da água destilada empregada no preparo do extrato analisado foi de 5,32.

5.2.3 Determinação do teor de cinzas totais e insolúveis em ácido

Os teores de cinzas totais e insolúveis em ácido foram determinados para as cascas e folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*. Os resultados obtidos, representando a média de todas as determinações, para cinzas totais e insolúveis em ácido foram, respectivamente, 6,010% e 0,044% para as cascas de *V. guianensis* e para folhas foram de 2,875% e 0,089%. Para *S. reticulata* os teores de cinzas totais e insolúveis em ácido foram de 8,596% e 0,078% para as cascas e; 7,960% e 0,133% para as folhas. Os valores de cinzas totais e os valores de cinzas insolúveis em ácido quando comparados revelam que a quantidade de impurezas (cinzas não-fisiológicas), como areia e terra aderente à superfície da droga é praticamente nulo.

Segundo a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988), a determinação de cinzas totais destina-se a estabelecer a quantidade de substância residual mineral no processo de incineração especificado. As cinzas totais incluem as derivadas de tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga vegetal (não fisiológica). O método de cinzas insolúveis destina-se à determinação de sílica e constituintes silicosos da droga.

Pela comparação dos resultados de teores de cinzas totais e insolúveis em ácido, das amostras de cascas e folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*, podemos considerar que maioria das cinzas presentes são do tipo fisiológicas e, os materiais estranhos, como areia e terra aderente, são praticamente ausentes.

5.2.4 Determinação de matéria extraível

O teor de matéria extraível é um parâmetro farmacognóstico que indica o rendimento da extração em massa através da relação droga vegetal x resíduo seco (m/m) (SANCHES, 2004). Os teores de extrativos calculados foram de 72,5 mg/g

tanto para as cascas quanto para as folhas de *V. guianensis*. Para as cascas de *S. reticulata* o teor calculado foi de 57,5 mg/g e para as folhas foi de 50 mg/g.

A Tabela 3 resume os resultados do controle de qualidade farmacognóstico para as espécies estudadas.

Tabela 3 – Controle de qualidade farmacognóstico das amostras de cascas e folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*

PARÂMETROS	VGC	VGF	SRC	SRF
Perda por dessecação (%)	11,0	8,7	9,1	9,1
pH	6,52	4,14	5,26	5,83
Teor de cinzas totais (%)	6,010	2,875	8,596	7,960
Teor de cinzas insolúveis (%)	0,044	0,089	0,078	0,133
Densidade	0,48	0,29	0,44	0,31
Teor de extrativos (mg/g)	72,5	72,5	57,5	50,0

VGC: cascas de *V. guianensis*; **VGF:** folhas de *V. guianensis*; **SRC:** cascas de *S. reticulata*; **SRF:** folhas de *S. reticulata*.

5.2.5 Controle microbiológico dos pós e dos extratos das cascas e folhas de *Vismia guianensis* (Aubl) e de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

A contaminação pode ser intensificada com o tempo e não somente comprometer o material em si, mas também o usuário (FARIAS, 2003). Considerando os diversos aspectos impostos para a garantia da qualidade do material botânico, que englobam não somente os aspectos físico-químicos, mas também o microbiológico, e considerando-se ainda, o fato dos materiais vegetais conterem um grande número de fungos e bactérias, pertencentes à sua microflora natural ou mesmo introduzidas durante a manipulação, foi realizado o controle microbiológico dos pós das cascas e folhas de *S. reticulata* e de *V. guianensis*.

Os resultados do controle microbiológico e os limites permitidos são apresentados na Tabela 4, e permitem observar que os níveis de aeróbios totais e

fungos detectados são baixos para as amostras de cascas e folhas de *V. guianensis* e, estão dentro dos limites preconizados na literatura (WHO, 1998). As cascas pulverizadas de *V. guianensis* não apresentaram crescimento de aeróbios viáveis (Figura 12) e mostraram 187 UFC/g de fungos. As folhas pulverizadas de *V. guianensis* apresentaram 77 UFC/g de aeróbios viáveis e 5 UFC/g para fungos. O material analisado foi coletado e selecionado manualmente, o que pode aumentar os riscos de contaminação, no entanto não houve crescimento dos micro-organismos não aceitáveis (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*), o que indica que o material apresenta qualidade e não está contaminado por micro-organismos patogênicos.

Na contagem total das formas viáveis, as cascas pulverizadas de *S. reticulata* apresentaram 115 UFC/g e 290 UFC/g para fungos e bactérias, respectivamente, enquanto que as folhas pulverizadas apresentaram um número incontável de colônias viáveis, tanto de fungos como bactérias, estando acima dos valores preconizados pela WHO (1998).

As amostras de cascas e de folhas pulverizadas de *S. reticulata* mostraram a presença de *Salmonella* sp. Isso é uma preocupação, uma vez que não assegura a utilização das amostras. Por outro lado, o processo extrativo com etanol 70% eliminou a contaminação por aeróbios totais e fungos. Isso significa que nos extratos não foram encontrados micro-organismos e, portanto a carga microbiana detectada nos testes de controle microbiológico com a droga vegetal foi eliminada.

Tabela 4 – Análise microbiológica dos pós das cascas e de folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) e de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

Micro-organismos	<i>Senna reticulata</i>		<i>V. guianensis</i>		Limites*
	Cascas	Folhas	Cascas	Folhas	
Aeróbios viáveis	290 UFC/g	Incontável	< 10 UFC/g	77 UFC/g	$\leq 10^7$ UFC/g
Fungos	115 UFC/g	Incontável	187 UFC/g	5 UFC/g	$\leq 10^4$ UFC/g
<i>E. coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	$\leq 10^2$ UFC/g
<i>Salmonella</i> sp.	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausência
<i>S. aureus</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausência
<i>P. aeruginosa</i>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausência

* Fonte: WHO, 1998

Os extratos liofilizados das cascas e folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*, portanto, apresentaram-se ausentes de contaminantes microbiológicos, tanto na contagem total como nos testes específicos para micro-organismos patogênicos.

De acordo com a RDC nº 48 de 16 de março de 2004, os medicamentos fitoterápicos devem ser registrados conforme as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo a pesquisa de contaminantes microbiológicos também contemplada nas recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) (BRASIL, 2004). Diante disto, os extratos são apropriados para uso, uma vez que se mostraram livres de contaminação microbiológica.

O controle microbiológico tem como função determinar o número total de micro-organismos presentes em preparações não estéreis, cosméticos e drogas vegetais, além de visar a identificação dos patógenos, tais como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não devem estar presentes (FARMACOPÉIA Brasileira, 1988; WHO, 1998; SIMÕES et al., 2003).

Esta análise visa assegurar o consumo de produtos de boa qualidade; ou seja, isentos de micro-organismos patogênicos ou potencialmente prejudiciais, permitindo

um número limite de micro-organismos aceitáveis, assegurando qualidade microbiológica da droga vegetal (MIGLIATO, 2005).

A espécie *Senna reticulata* é característica de beiradas de cursos d'água, portanto está sujeita à maior exposição à contaminação. Diante disto e dos resultados obtidos na avaliação microbiológica, sugere-se que a coleta seja otimizada, ou que a carga microbiana seja diminuída com ações de descontaminação.

Os resultados da análise microbiológica com as amostras dos pós de cascas e folhas de *V. guianensis* permitem concluir que a droga vegetal está de acordo com as especificações encontradas na literatura, e, portanto, pode ser utilizada para a preparação de extratos.

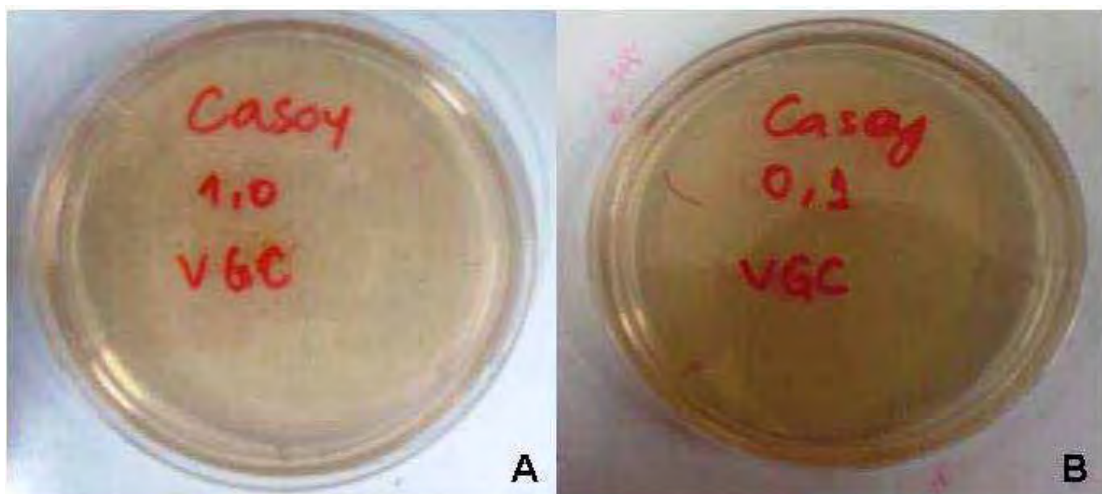


Figura 12 – Análise microbiológica do pó das cascas de *Vismia guianensis* (Aubl): **A)** diluição 1:10; **B)** diluição 1:100

Fonte: Autor

5.3 EXTRATOS VEGETAIS E FRAÇÕES

Na extração por maceração foram utilizadas 100 g de cada amostra pulverizada das cascas e folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*, usando como solvente 1000 mL de álcool etílico a 70%. Ao final de sete dias de maceração os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e liofilizados. Suas massas, após a liofilização, estão representadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Massas e rendimentos dos extratos macerados hidroetanólicos (70%) de *Vismia guianensis* (Aubl.) e de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

Espécies botânicas	Farmacógenos	Massa do extrato liofilizado (g)	Rendimento (%)
<i>Vismia guianensis</i>	Folhas	19,45	19,45
	Cascas	18,61	18,61
<i>Senna reticulata</i>	Folhas	15,40	15,40
	Cascas	14,90	14,90

Para o fracionamento dos extratos foi realizada nova maceração com 50g de cada amostra pulverizada do material vegetal, nas mesmas condições de preparação dos extratos brutos liofilizados. A Tabela 6 representa as massas e os rendimentos das frações dos extratos hidroetanólicos de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*.

Tabela 6 – Massas e rendimentos das frações dos extratos macerados hidroetanólicos (70%) de *Vismia guianensis* (Aubl.) e de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

Frações	VGC		VGF		SRC		SRF	
	Massa (g)	R (%)	Massa (g)	R (%)	Massa (g)	R (%)	Massa (g)	R (%)
FHex	0,56	1,12	0,08	0,16	0,50	1,00	0,07	0,14
FACOEt	1,16	2,32	0,58	1,16	0,20	0,40	0,49	0,98
FBut	0,83	1,66	0,70	1,40	0,28	0,56	0,55	1,10
FF	0,17	0,34	0,46	0,92	0,41	0,82	0,45	0,90

VGC: cascas de *V. guianensis*; **VGF:** folhas de *V. guianensis*; **SRC:** cascas de *S. reticulata*; **SRF:** folhas de *S. reticulata*.; **R:** rendimento

5.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Inicialmente foi realizada uma triagem fitoquímica preliminar com a finalidade de se conhecer quais as principais classes de princípios ativos presentes nas espécies *Vismia guianensis* e *Senna reticulata*. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos na triagem fitoquímica preliminar.

Tabela 7 – Principais classes de metabólitos secundários identificadas nas amostras de cascas e de folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) e de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

CLASSES	REAÇÕES	RESULTADOS			
		VGC	VGF	SRC	SRF
Antraquinonas	livres	+	+	+	+
	glicosiladas	-	-	+	+
	Shinoda	+	+	+	+
Flavonoides	Taubock	+	+	+	+
	Pew	+	+	+	+
	cloreto de alumínio	+	+	+	+
	gelatina	+	+	+	+
Taninos	sais de ferro	+	+	+	+
	acetato de chumbo	-	-	+	+
Saponinas	formação e permanência de espuma	+	+	+	-
	Bertrand	-	-	-	-
	Bouchard	-	-	-	-
Alcaloides	Dragendorff	-	-	-	-
	Mayer	-	-	-	-
	CCD*	-	-	-	-

VGC: cascas de *V. guianensis*; **VGF:** folhas de *V. guianensis*; **SRC:** cascas de *S. reticulata*; **SRF:** folhas de *S. reticulata*.

* Fase móvel: acetona:água:amônia (90:7:3), revelado com reativo de Dragendorff modificado

As antraquinonas são compostos quinônicos, também chamados de hidroxiantracênicos por serem derivados do antraceno. Bastante frequentes na natureza, encontram-se dissolvidos no suco celular em diversos órgãos das plantas. São compostos amarelo-alaranjados e de sabor amargo (CUNHA, 2009; BIAVATTI, 2005). Estão presentes em diversas famílias de vegetais superiores, principalmente nas famílias Rubiaceae, Caesalpiniaceae, Polygonaceae, Liliaceae, Rhamnaceae, Verbenaceae e Asphodelaceae (FALKENBERG, 2003).

Para a pesquisa de antraquinonas livres foi feita uma extração com éter etílico, foi adicionado à solução etérea 1 mL de amônia diluída e foi observado a coloração rósea na camada aquosa em todas as amostras (Figura 13), indicando a presença de antraquinonas livres.

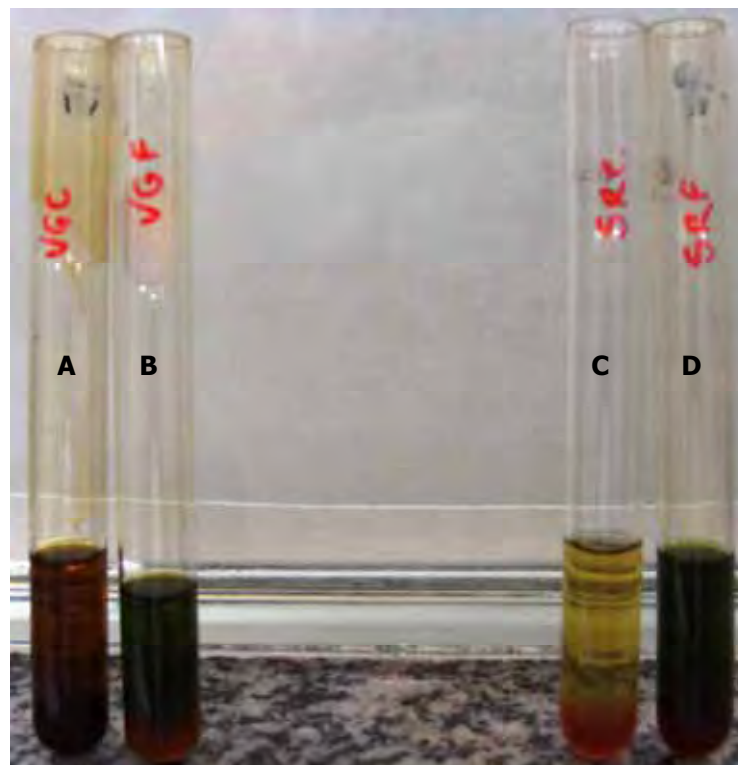


Figura 13 – Pesquisa de antraquinonas livres dos pós das cascas e folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*: **A)** cascas de *V. guianensis*; **B)** folhas de *V. guianensis*; **C)** cascas de *S. reticulata*; **D)** folhas de *S. reticulata*.

Fonte: Autor

Os glicosídeos antraquinônicos são antraquinonas que encontram-se ligadas a um açúcar (C-glicosídeo e O-glicosídeo). Constituem as formas de transporte de maior potência farmacológica, porém, pela reduzida lipossolubilidade, têm menores índices de absorção que as correspondentes antraquinonas livres (FALKENBERG, 2003).

Através da Reação de Borntrager foi realizada a identificação de glicosídeos antraquinônicos nas amostras de cascas e folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*. Foi possível observar a formação de cor rósea, característico da presença de glicosídeos antraquinônicos, nas amostras de cascas e folhas de *S. reticulata* (Figura 14). Não foi identificada a presença de glicosídeos antraquinônicos nas amostras de cascas e folhas de *V. guianensis*.

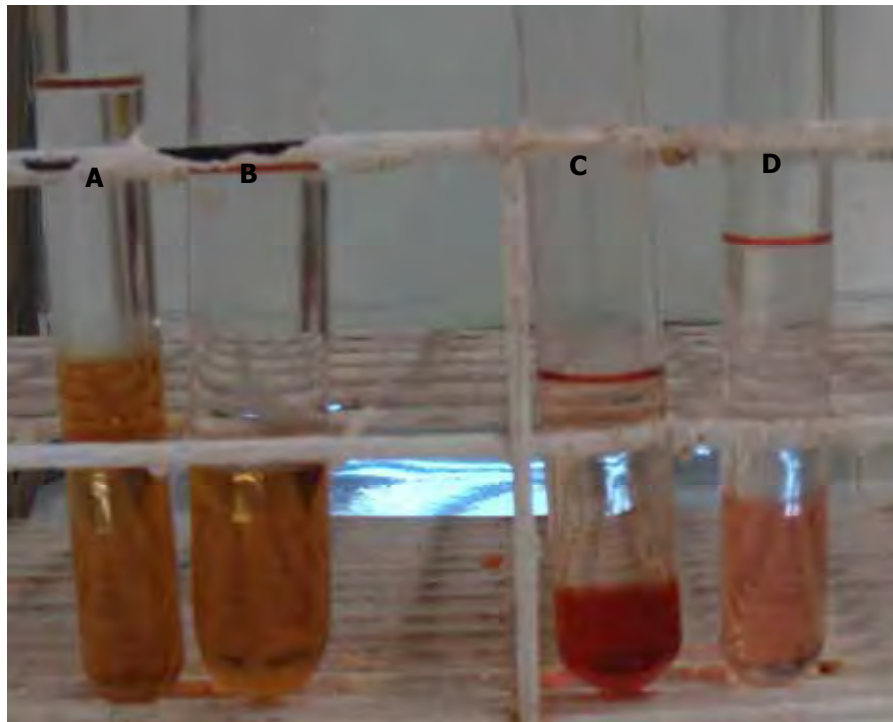


Figura 14 – Pesquisa de glicosídeos antraquinônicos dos pó das cascas e das folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*: **A)** cascas de *V. guianensis*; **B)** folhas de *V. guianensis*; **C)** cascas de *S. reticulata*; **D)** folhas de *S. reticulata*.

Fonte: Autor

Os flavonoides são substâncias polifenólicas amplamente encontradas na natureza, em frutas, folhas, flores, raízes, madeiras, cascas, pólen, néctar, sementes e grãos (HARBORNE, 1996). De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são classificados em: flavonas, flavonóis, diidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 1983).

Nos últimos anos, os flavonoides têm tido um crescente interesse por parte da indústria química, farmacêutica e alimentícia. São capazes de modular a atividade das enzimas e afetar o comportamento de muitos sistemas celulares, sugerindo que esses compostos possuem atividades hepatoprotetora, antialérgica, anti-inflamatória, antiosteoporótica, antitumoral, analgésica, antianginosa, antiaterogênica, antidiabética, antidiarréica e protetora vascular. Uma vez absorvidos, influenciam muitas funções biológicas incluindo síntese de proteínas, proliferação, diferenciação celular e angiogênese, trazendo benefícios em muitas patologias (HALLIWELL et al., 1995; MILLER, 1996; DI CARLO et al., 1999).

Através das reações de Shinoda, de Taubock, de Pew, do cloreto férrico e do cloreto de alumínio foi feita a identificação de flavonoides nas amostras de cascas e de folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*. Todas as amostras apresentaram a presença de flavonóides em todas as reações realizadas. Em trabalho recente de Suffredini e colaboradores (2006) através de triagem fitoquímica por CCD não foi encontrada a presença de flavonoides nos extratos orgânicos das partes aéreas de *V. guianensis*. Por outro lado, segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007), a síntese de metabólitos secundários é frequentemente afetada por condições ambientais, já que representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto na análise fitoquímica de plantas deve-se considerar fatores como a sazonalidade, temperatura, índice pluviométrico, idade da espécie e o fornecimento de água e nutrientes.

Taninos são compostos polifenólicos distribuídos em plantas, alimentos e bebidas. Encontram-se em plantas superiores, ocorrendo em, aproximadamente, 30% das famílias. Eles são solúveis em água e em solventes orgânicos polares, sendo capazes de precipitar proteínas (PANSERA et al., 2003). São responsáveis pela adstringência de muitos frutos e plantas em geral, através da complexão entre taninos e proteínas, que é a base de algumas de suas propriedades biológicas, tais como controle de insetos, fungos e bactérias. São classificados segundo sua estrutura química e, dois grupos: taninos hidrolizáveis e taninos condensados (AERTS et al., 1999; SANTOS;MELLO, 2003).

Plantas ricas em taninos são empregadas no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, azia, náusea, úlcera gástrica, problemas renais e dos sistema urinário e processos inflamatórios em geral (SANTOS;MELLO, 2003).

Através da reação da gelatina, da reação com sais de ferro e da reação com acetato de chumbo foi realizada a pesquisa de taninos nas amostras vegetais de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*. Todas as amostras apresentaram formação de precipitado na reação da gelatina, característico da presença de taninos (Figura 15). Na reação com sais de ferro houve a formação de coloração azul nas amostras de cascas e folhas de *Senna reticulata*, caracterizando a presença de taninos hidrolizáveis; nas amostras de cascas e folhas de *V. guianensis* houve a formação de coloração verde, característico da presença de taninos condensados. Isto foi confirmado na reação com acetato de chumbo, onde houve formação de precipitado esbranquiçado, característico da presença de taninos hidrolizáveis, no tubo contendo a amostra de cascas e no tubo contendo amostra de folhas de *S. reticulata*.

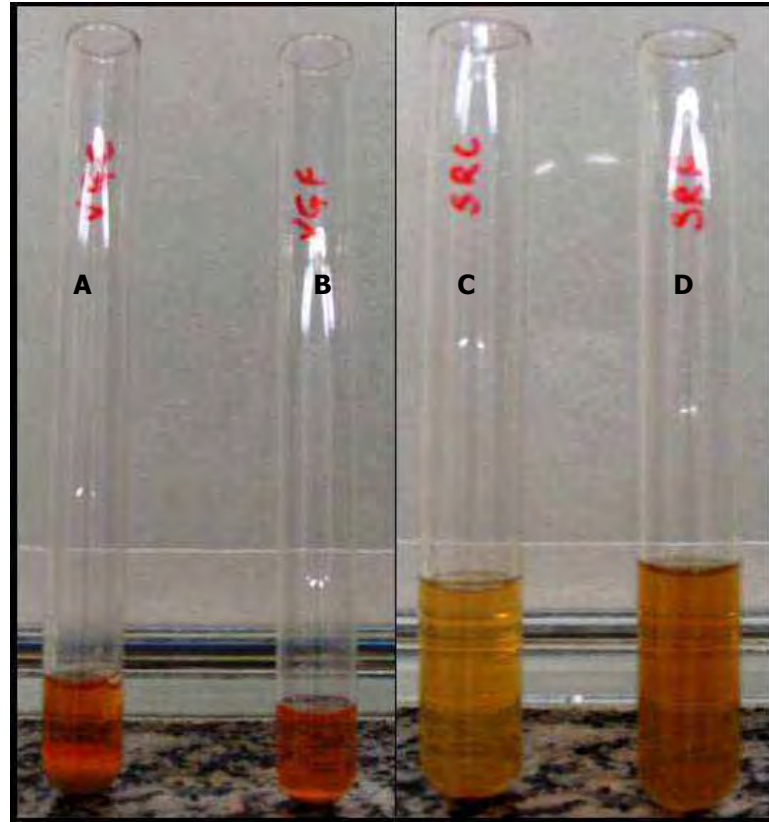


Figura 15 – Reação da gelatina para pesquisa de taninos com os pós das cascas e das folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*: **A)** cascas de *V. guianensis*; **B)** folhas de *V. guianensis*; **C)** cascas de *S. reticulata*; **D)** folhas de *S. reticulata*.

Fonte: Autor

As saponinas são compostos terpênicos que apresentam uma parte lipofílica e outra hidrofílica que determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e suas ações detergente e emulsificante. Originam soluções espumantes. São substâncias de elevada massa molecular e ocorrem em misturas complexas com um número elevado de açúcares ou ainda à presença de diversas agliconas. São de difícil isolamento e elucidação estrutural, no entanto, essas substâncias têm despertado o interesse farmacêutico, como adjuvante em formulações, componentes ativos em drogas vegetais, ou como matéria-prima para a síntese de esteróides. Além disso, são empregadas farmacêuticamente como adjuvante para aumentar a resposta imunológica (SCHENKEL et al., 2003; BIAVATTI, 2005).

Cerca de 2 g das cascas e das folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata* foram aquecidas até ebulição com água destilada por 3 min, em seguida foi realizada a filtração e agitação do tubo. Após um período de repouso de 20 min foi observada a formação de espuma abundante e persistente nos tubos contendo o filtrado das cascas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*, indicativo da presença de saponinas (Figura 16). No tubo contendo o filtrado das folhas de *V. guianensis* apresentou espuma persistente, porém não abundante, apesar disso foi considerada a presença de saponinas. As folhas de *S. reticulata* não apresentaram a formação de espuma, o que é indicativo da ausência de saponinas.



Figura 16 – Formação de espuma para pesquisa de saponinas com os pós das cascas e das folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*: **A)** cascas de *V.*

guianensis; **B**) folhas de *V. guianensis*; **C**) cascas de *S. reticulata*; **D**) folhas de *S. reticulata*.

Fonte: Autor

Segundo Pelletier (1988), os alcaloides são substâncias orgânicas, de origem natural, farmacologicamente ativos, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e são encontrados predominantemente nas angiospermas.

Possuem vários graus de alcalinidade, dependendo da disponibilidade do par eletrônico do nitrogênio, ou seja, se ele é primário, secundário, terciário ou quaternário. Devido a esta característica, formam sais na presença de ácidos, sendo praticamente insolúveis em água na sua forma básica ou livre, solubilizando-se em solventes pouco polares (BIAVATTI, 2005).

São frequentes em angiospermas e possuem um amplo espectro de atividades farmacológicas, devido à sua grande diversidade estrutural, muitas delas úteis na terapêutica, onde se destaca a sua ação sobre o sistema nervoso central (CUNHA, 2009).

Na identificação de alcalóides nas amostras de cascas e de folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*, foi realizada uma extração em meio alcalino e em seguida foram realizadas as reações de caracterização com os reagentes de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand. Nestas reações é observada a formação de um precipitado. Nenhuma das amostras apresentou precipitação quando reagiram com os reagentes específicos, indicando a ausência de alcalóides em todas as amostras testadas.

5.5 BIOAUTOGRAFIA

A complexa composição química de extratos vegetais é geralmente um obstáculo muito limitante para o isolamento de compostos antimicrobianos. No entanto, o uso de ensaios bioautográficos permite a detecção de componentes ativos de um extrato vegetal bruto. Este método permite a localização de antimicrobianos componentes ativos que tenham sido separados por CCD (SCHMOURLO et al., 2005).

Os extratos macerados brutos e as frações foram aplicados sobre as placas pré-fabricadas de sílica-gel e eluídos utilizando diversos sistemas de solventes, conforme descrito no item 4.6.1.1. Após a eluição e leitura dos cromatogramas foi observado que os melhores sistemas de solventes foram: hexano-acetato de etila-isopropanol (4:4:2, v/v), para a fração hexânica; acetato de etila-isopropanol-água (100:17:13, v/v), para a fração acetato-etílica e *n*-butanol-ácido acético-água (65:15:25), para as frações *n*-butanólicas e final (aquosa). Foi observado também que após a visualização em lâmpada ultravioleta as frações acetato-etílicas de todos os extratos apresentou melhor eluição e visualização das bandas cromatográficas, conforme pode-se observar na Figura 17.

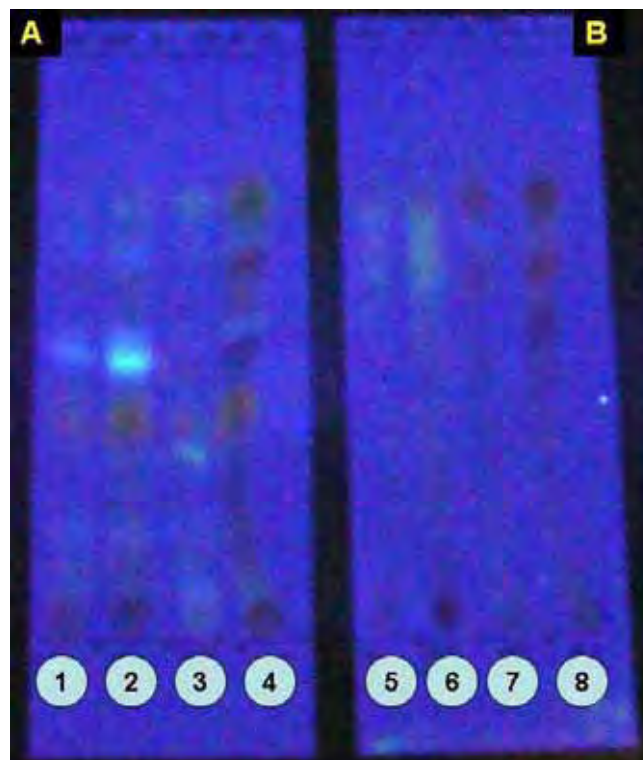


Figura 17 – Visualização em luz ultravioleta dos cromatogramas com extratos brutos e frações de acetato de etila das espécies *V. guianensis* e *S. reticulata*.

A) *Vismia guianensis*: 1 - extrato bruto das cascas, 2 - fração acetato de etila do extrato bruto das cascas, 3 - extrato bruto das folhas, 4 - fração acetato de etila do extrato bruto das folhas;

B) *Senna reticulata*: 5 - extrato bruto das cascas, 6 - fração acetato de etila do extrato bruto das cascas, 7 - extrato bruto das folhas, 8 - fração acetato de etila do extrato bruto das folhas.

Fonte: Autor

Muitos micro-organismos que causam danos à saúde humana, apresentam resistência medicamentosa devido a uso inadequado de antibióticos. Assim, existe uma necessidade para a descoberta de novas substâncias a partir de fontes naturais, incluindo plantas (SARTORATTO et al., 2004). Neste trabalho, a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais brutos e das frações de *S. reticulata* e de *V. guianensis* foram avaliados por bioautografia. O cloreto de trifênil tetrazólio e o brometo de tiazolil tetrazólio indicam crescimento celular, uma vez que pigmentam as células vivas. Assim, manchas brancas indicam regiões onde o extrato apresenta fração ativa. Os resultados da bioautografia são mostrados na Tabela 8.

Tabela 8 – Bioautografia dos extratos das cascas e folhas de *Vismia guianensis* (Aubl.) e de *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby

Micro-organismo	<i>Vismia guianensis</i>							
	Cascas				Folhas			
	FH	FA	FB	FF	FH	FA	FB	FF
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	++	+	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	++	+	+	-	++	+	+	-
<i>S. epidermidis</i>	++	-	+	-	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
Micro-organismo	<i>Senna reticulata</i>							
	Cascas				Folhas			
	FH	FA	FB	FF	FH	FA	FB	FF
<i>B. subtilis</i>	-	+	-	-	+	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	++	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	++	-	-	-
<i>S. aureus</i>	+	+++	+	+	+	+++	+	+
<i>S. epidermidis</i>	+	++	+	++	+	++	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

+ uma banda ativa; ++ duas bandas ativas; +++ três ou mais bandas ativas; - sem atividade

FH – fração hexânica; FA – fração acetato de etila; FB – fração *n*-butanólica; FF – fração final

Através da tabela, podemos observar que as frações hexânicas e acetato-etílicas apresentaram melhor atividade inibitória frente aos micro-organismos testados. *S. aureus* e *S. epidermidis* foram os mais suscetíveis.

Nenhuma fração dos extratos apresentou atividade frente à *C. albicans* e apenas a fração hexânica do extrato das folhas de *Senna reticulata* apresentou duas

bandas inibindo o crescimento de *P. aeruginosa*. Sartoratto e colaboradores (2004), ao estudarem os óleos essenciais de plantas aromáticas usadas no Brasil, não encontraram nenhuma atividade frente aos mesmos micro-organismos.

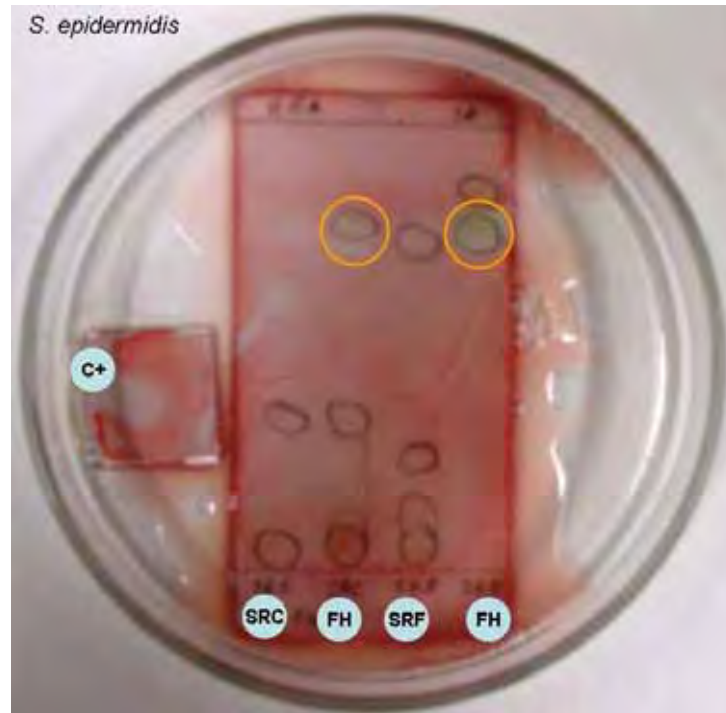


Figura 18 – Ensaio bioautográfico dos extratos brutos e das frações hexânicas de *S. reticulata* frente a *S. epidermidis*: **SRC**) extrato bruto das cascas; **SRF**) extrato bruto das folhas; **FH**) frações hexânicas. Destaque para as bandas ativas, uma na fração hexânica da cascas e outra na fração hexânica das folhas. Fase móvel: hexano-acetato de etila-isopropanol (4:4:2, v/v)
Fonte: Autor

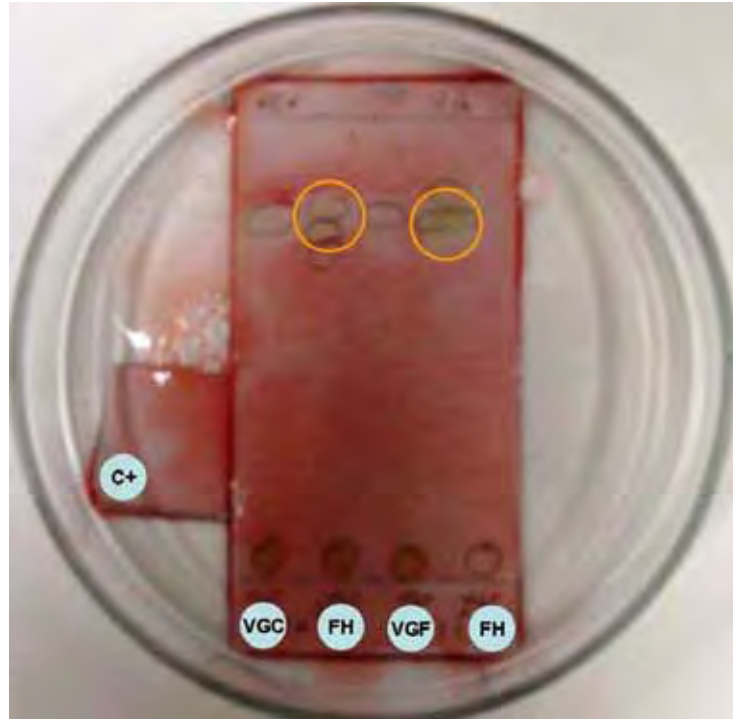


Figura 19 – Ensaio bioautográfico dos extratos brutos e das frações hexânicas de *V. guianensis* frente a *S. epidermidis*. **VGC**) extrato bruto das cascas; **VGF**) extrato bruto das folhas; **FH**) frações hexânicas. Destaque para as bandas ativas, uma na fração hexânica da cascas e outra na fração hexânica das folhas. Fase móvel: hexano-acetato de etila-isopropanol (4:4:2, v/v)
Fonte: Autor

Segundo Cury e colaboradores (2007), os estudos de sensibilidade para fungos filamentosos ainda podem ser precários quando comparados aos de leveduras. Isto implica que são necessárias modificações para que um método possa contemplar o estudo fungos filamentosos.

5.6 DETERMINAÇÃO DA CIM

Foram feitos testes de microdiluição para determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de ambas as espécies vegetais, frente a cepas padrão (ATCC) e clínicas dos fungos *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans* e frente às cepas padrão (ATCC) das bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus epidermidis, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, e bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As concentrações que variaram de 100 mg/mL a 0,39 mg/mL e de 1 mg/mL a 0,0039 mg/mL. Os resultados encontram-se expressos nas Tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9 – Concentração Inibitória Mínima dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de *V. guianensis* e *S. reticulata*, frente às cepas padrão (ATCC) dos fungos *M. canis* (M.c), *T. mentagrophytes* (T. m), *T. rubrum* (T. r) e *C. albicans* (C. a)

Extrato	Micro-organismo			
	T.r	T.m	M.c	C.a
VGC	0,125 mg/mL	0,0625 mg/mL	0,5 mg/mL	s.a
VGF	0,5 mg/mL	0,25 mg/mL	1 mg/mL	s.a
SRC	6,25 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL	s.a
SRF	6,25 mg/mL	3,13 mg/mL	6,25 mg/mL	s.a

VGC: extrato das cascas de *V. guianensis*; **VGF:** extrato das folhas de *V. guianensis*; **SRC:** extrato das cascas de *S. reticulata*; **SRF:** extrato das folhas de *S. reticulata*; **s.a:** sem atividade inibitória.
s.a = sem atividade

Tabela 10 – Concentração Inibitória Mínima dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de *V. guianensis* e *S. reticulata*, frente às cepas clínicas dos fungos *M. canis* (M.c), *T. mentagrophytes* (T. m), *T. rubrum* (T. r) e *C. albicans* (C. a)

Extrato	Micro-organismo			
	T.r	T.m	M.c	C.a
VGC	0,125 mg/mL	0,125 mg/mL	0,01563 mg/mL	s.a
VGF	1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL	s.a
SRC	6,25 mg/mL	1 mg/mL	25 mg/mL	s.a
SRF	1 mg/mL	6,25 mg/mL	6,25 mg/mL	s.a

VGC: extrato das cascas de *V. guianensis*; **VGF:** extrato das folhas de *V. guianensis*; **SRC:** extrato das cascas de *S. reticulata*; **SRF:** extrato das folhas de *S. reticulata*; **s.a:** sem atividade inibitória.
s.a = sem atividade

Tabela 11 – Concentração Inibitória Mínima dos extratos hidroetanólicos das cascas e folhas de *V. guianensis* e *S. reticulata*, frente às cepas padrão das bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas.

Micro-organismo	Extrato			
	VGC	VGF	SRC	SRF
<i>P. aeruginosa</i>	25 mg/mL	s.a	s.a	s.a
<i>E. faecalis</i>	6,25 mg/mL	s.a	100 mg/mL	100 mg/mL
<i>E. coli</i>	12,5 mg/mL	s.a	s.a	s.a
<i>S. epidermidis</i>	0,5 mg/mL	12,5 mg/mL	50 mg/mL	50 mg/mL
<i>S. aureus</i>	0,125 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL	6,25 mg/mL
<i>B. subtilis</i>	0,125 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL	6,25 mg/mL

VGC: extrato das cascas de *V. guianensis*; **VGF:** extrato das folhas de *V. guianensis*; **SRC:** extrato das cascas de *S. reticulata*; **SRF:** extrato das folhas de *S. reticulata*; **s.a:** sem atividade inibitória. **s.a** = sem atividade

Frente às cepas fúngicas padrão (ATCC) o extrato hidroetanólico das cascas de *V. guianensis* apresentou melhor atividade, com concentração inibitória mínima de 0,0625 mg/mL, de 0,125 mg/mL e de 0,5 mg/mL frente aos fungos *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *M. canis*, respectivamente. O extrato hidroetanólico das folhas de *V. guianensis* apresentou CIM de 0,25 mg/mL frente a *T. mentagrophytes*, de 0,5 mg/mL frente a *T. rubrum* e de 1 mg/mL frente a *M. canis*. O extrato hidroetanólico das cascas de *S. reticulata* inibiu o crescimento de *T. rubrum* e de *T. mentagrophytes* de 6,25 mg/mL e, frente a *M. canis* apresentou CIM de 12,5 mg/mL. O extrato hidroetanólico das folhas de *S. reticulata* apresentou CIM de 6,25 mg/mL frente a *T. rubrum* e *M. canis* e, CIM de 3,13 mg/mL frente a *T. mentagrophytes*.

Nos testes realizados com as cepas clínicas o extrato hidroetanólico das cascas de *V. guianensis* também apresentou melhor atividade com CIM de 0,01563 mg/mL frente a *M. canis* e de 0,125 mg/mL frente a *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. O extrato hidroetanólico das folhas de *V. guianensis* apresentou CIM de 1000 µg/mL frente a *T. rubrum*, frente a *T. mentagrophytes* e frente a *M. canis*. O extrato hidroetanólico das cascas de *S. reticulata* apresentou CIM de 1 mg/mL frente a *T.*

mentagrophytes, de 6,25 mg/mL frente a *T. rubrum* e de 25 mg/mL frente a *M. canis*. O extrato hidroetanólico das folhas de *S. reticulata* apresentou CIM de 1 mg/mL frente a *T. rubrum* e de 6,25 mg/mL frente a *T. mentagrophytes* e frente a *M. canis*.

Nos testes realizados com as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, novamente o extrato hidroetanólico das cascas de *V. guianensis* mostrou-se mais ativo, inibindo o crescimento de todas as bactérias testadas com CIM de 0,125 mg/mL frente a *B. subtilis*, de 0,125 mg/mL frente a *S. aureus*, de 0,5 mg/mL frente a *S. epidermidis*, de 6,25 mg/mL frente a *E. faecalis*, de 12,5 mg/mL frente a *E. coli*, de 25 mg/mL frente a *P. aeruginosa*.

Diversas espécies de *Vismia* estão sendo estudadas quanto a identificação química e atividade antimicrobiana. Wabo e colaboradores (2007) demonstraram a atividade moderada de xantonas, isoladas de *V. laurentii* frente a bactérias Gram-positivas.

Suffredini e colaboradores (2006) determinaram que os extratos de *V. guianensis* não possuem atividade antimicrobiana significativa frente às bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*, uma vez que a CIM encontrada foi superior a 200 µg/mL, na análise da atividade antibacteriana de 12 extratos obtidos de espécies de Clusiáceas, através do ensaio de microdiluição,. Os resultados do presente trabalho corroboram em parte, pois a CIM encontrada para os extratos das cascas de *V. guianensis* frente a *S. aureus* foi inferior a 200 µg/mL.

Vários autores estudaram a atividade antimicrobiana de espécies de Clusiáceas e verificaram uma atividade antimicrobiana satisfatória. Kuete e colaboradores mostraram a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos de *Vismia laurentii* De Wild (2005) frente às bactérias Gram-positivas (6 espécies) e bactérias Gram-negativas (12 espécies). Taveira (2007) estudou 65 extratos de plantas do cerrado e verificou que a maioria deles pertencem a espécies vegetais da família das clusiáceas. Pino-Benitez & Córdoba (2007) demonstraram, através de

difusão em disco, a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de *V. macrophylla* frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Suffredini e colaboradores (2004) estudaram 43 extratos de Clusiáceas e verificaram que 34 deles mostraram atividade frente a *S. aureus*, 18 extratos mostraram atividade frente a *E. faecalis* e 1 extrato mostrou atividade frente a *E. coli*. A literatura descreve atividade antimicrobiana, antitumoral e antiviral em extratos de plantas desta família, devido à presença de xantonas, flavonóides, benzofenona e cumarinas (YIMDJO et al., 2004; TEIXEIRA; CRUZ, 2005; YASUNAKA et al., 2005).

A literatura também evidencia a diversidade de substâncias bioativas presentes no gênero *Senna*, com isolamento de 350 metabólitos secundários de espécies deste gênero que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. As classes mais frequentes são antraquinonas, flavonóides e outros compostos fenólicos, confirmando inúmeras indicações populares, como atividade antiulcerogênica, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antipirética e analgésica (VIEGAS Jr et al., 2006). Khan e colaboradores (2001) testaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas, flores, cascas do caule e cascas das raízes de *Senna alata* e mostraram atividade inibitória para 12 bactérias Gram positivas e 12 bactérias Gram negativas. Damodaran & Venkataraman (1994) constataram atividade antifúngica de extratos das folhas de *Senna alata* contra *Malassezia fufur*. Mullika e colaboradores (2005) demonstraram a atividade dos extratos brutos de *Senna alata*, *Senna occidentalis* e *Senna siamea* frente às bactérias *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis*.

Mais recentemente, Zampini e colaboradores (2007) demonstraram, através de bioautografia a atividade antimicrobiana de *S. aphylla* frente a cepas resistentes de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*. Doughari e colaboradores (2008) demonstraram a atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *Senna obtusifolia* frente a cepas clínicas de bactérias e fungos, usando o método de difusão em ágar. Neste estudo foi identificado a presença de taninos, saponinas, alcaloides e flavonoides. Ogundare (2009) demonstrou a atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos das folhas de *Senna podocarpa* frente a *P. aeruginosa*, *Streptococcus*

faecalis, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus* e *C. albicans*, nas concentrações de 30, 25, 20 e 15 mg/mL e a triagem fitoquímica revelou a presença de saponinas, taninos, antraquinonas e alcalóides.

Nenhum dos extratos apresentou atividade contra *C. albicans*. Estes resultados corroboram com os resultados encontrados nos ensaios de microdiluição e de bioautografia (Figura 20).

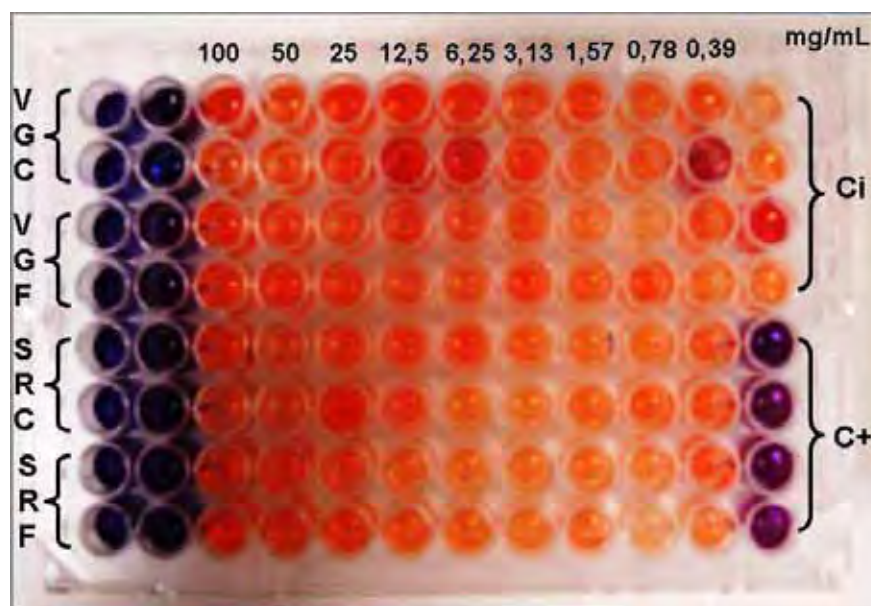


Figura 20 – Ensaio de determinação da CIM dos extratos de *V. guianensis* e *S. reticulata* frente a *C. albicans*

Fonte: Autor

Cowan (1999) descreve que os maiores grupos de metabólitos de plantas com atividade antimicrobiana são os fenólicos e polifenóis como as quinonas, flavonas, flavonóides, flavonóis, taninos e cumarinas; terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, lecitinas e polipeptídeos. Em ambas espécies estudadas foi encontrada a presença de compostos fenólicos, sugerindo que a atividade antimicrobiana esteja relacionada a estes compostos.

5.7 ATIVIDADE IMUNOLÓGICA

5.7.1 Avaliação da citotoxicidade

5.7.1.1 Viabilidade celular na presença dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*

O objetivo deste teste de viabilidade foi observar o potencial citotóxico dos extratos. Nas Figuras 21A a 21D é possível verificar que os extratos da cascas e folhas de *V. guianensis* e o extrato das cascas de *S. reticulata* são tóxicos quando utilizados em altas concentrações, e o extrato das folhas de *S. reticulata* mostrou baixa toxicidade em todas as concentrações testadas. A concentração em que se obteve melhor viabilidade celular para todos os extratos foi 50 µg/mL e a utilizada nos demais testes imunológicos (Tabela 12).

Tabela 12 – Porcentagem de viabilidade celular em PEC murinas após exposição aos extratos a 50µg/mL

Extratos	% Viabilidade
VGC 50 µg/mL	52,76 ± 12,92
VGF 50 µg/mL	72,94 ± 12,10
SRC 50 µg/mL	90,51 ± 12,84
SRF 50 µg/mL	83,35 ± 16,33
LPS 10 µg/mL	80,70 ± 12,37
RPMI-C	100 ± 0

VGC: extrato das cascas de *V. guianensis*; **VGF:** extrato das folhas de *V. guianensis*; **SRC:** extrato das cascas de *S. reticulata*; **SRF:** extrato das folhas de *S. reticulata*.

PEC = células do exsudato peritoneal

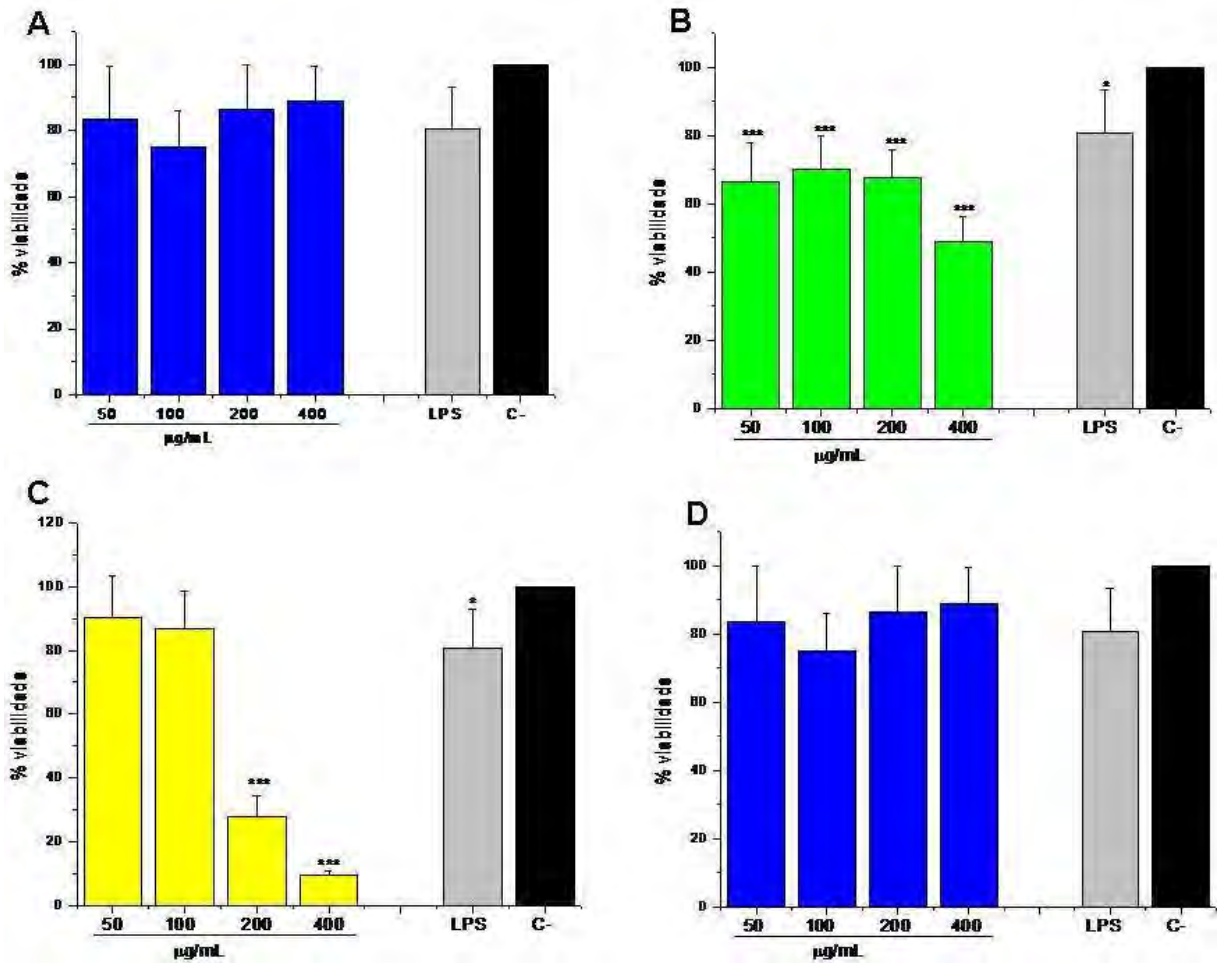


Figura 21 - Viabilidade de células do exsudato peritoneal de camundongos Swiss na presença dos extratos hidroetanólico das cascas e folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata*. Foram utilizadas suspensão de células do exsudato peritoneal ajustada à concentração de 5×10^6 células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos previamente incubados com os extratos nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 µg/mL durante 24 h de incubação. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicata de 5 animais.

***p<0,001, **p<0,01 e *p<0,05

A: extrato das cascas de *Vismia guianensis*; **B:** extrato das folhas de *Vismia guianensis*; **C:** extrato das cascas de *Senna reticulata*; **D:** extrato das folhas de *Senna reticulata*.

5.7.1.2 Viabilidade celular dos macrófagos estimulados por LPS na presença dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*

Este experimento foi realizado com o objetivo de observar se a presença simultânea de LPS e extratos alterariam viabilidade dos macrófagos. Na figura 22 pode ser observada a viabilidade dos macrófagos quando incubados com LPS e extratos de ambas as plantas. Todos os extratos mostraram viabilidade celular adequada para a execução do teste de inibição da produção de óxido nítrico (Tabela 13).

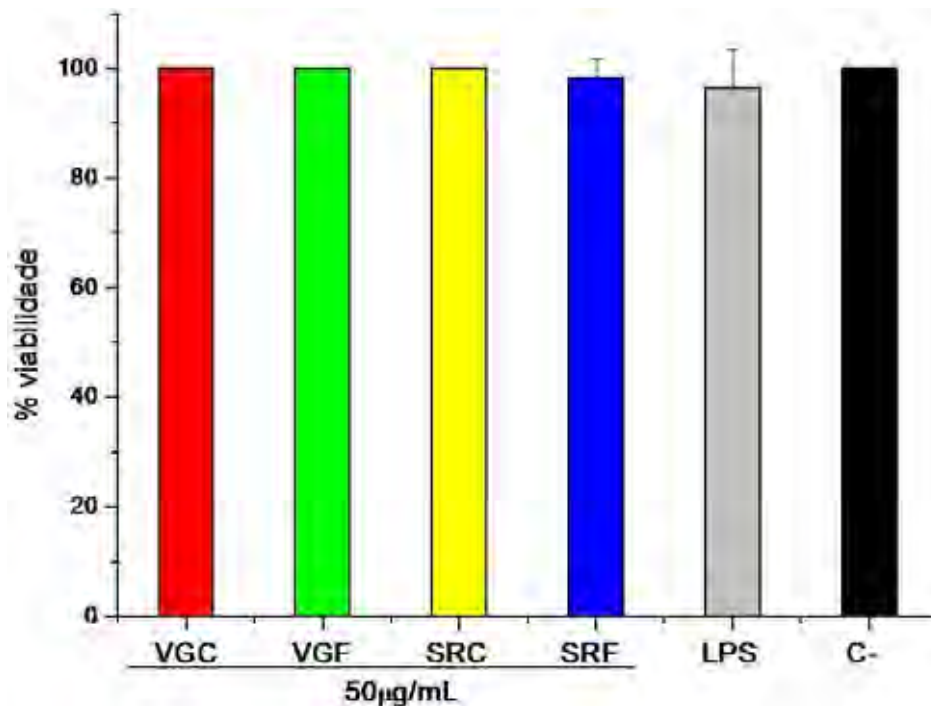


Figura 22 - Viabilidade das células do exsudato peritoneal na presença dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de *Vismia guianensis* e de *Senna reticulata* e de LPS. Foram utilizadas suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL. Solução de MTT foi adicionada aos macrófagos previamente incubadas com os extratos a $50 \mu\text{g/mL}$ e LPS $10 \mu\text{g/mL}$ durante 24h de incubação. As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100% de viabilidade. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de triplicata de 5 animais.

Tabela 13 – Porcentagem de viabilidade celular em PEC murinas após exposição aos extratos a 50 µg/mL na presença de LPS

Extratos	% Viabilidade
VGC 50 µg/mL	100 ± 0
VGF 50 µg/mL	100 ± 0
SRC 50 µg/mL	100 ± 0
SRF 50 µg/mL	98,25 ± 3,50
LPS 10 µg/mL	96,57 ± 6,87
RPMI-C	0,43 ± 0,50

VGC: extrato das cascas de *V. guianensis*; **VGF:** extrato das folhas de *V. guianensis*; **SRC:** extrato das cascas de *S. reticulata*; **SRF:** extrato das folhas de *S. reticulata*.

5.7.2 Avaliação dos efeitos dos extratos sobre os macrófagos

5.7.2.1 Determinação da produção de óxido nítrico

Os extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*, na concentração de 50µg/mL, não induziram produção de óxido nítrico estatisticamente significantes (Figura 23 e Tabela 14).

Tabela 14 – Efeitos dos extratos na produção de óxido nítrico em culturas de células peritoneais

Compostos	Concentração de NO (µmols nitrito/5x10 ⁶ cels)
VGC 50 µg/mL	3,48 ± 3,15
VGF 50 µg/mL	17,78 ± 11,22
SRC 50 µg/mL	1,80 ± 2,10
SRF 50 µg/mL	6,86 ± 6,48
LPS 10 µg/mL	77,54 ± 24,45
RPMI-C	1,93 ± 2,43

VGC: extrato das cascas de *V. guianensis*; **VGF:** extrato das folhas de *V. guianensis*; **SRC:** extrato das cascas de *S. reticulata*; **SRF:** extrato das folhas de *S. reticulata*.

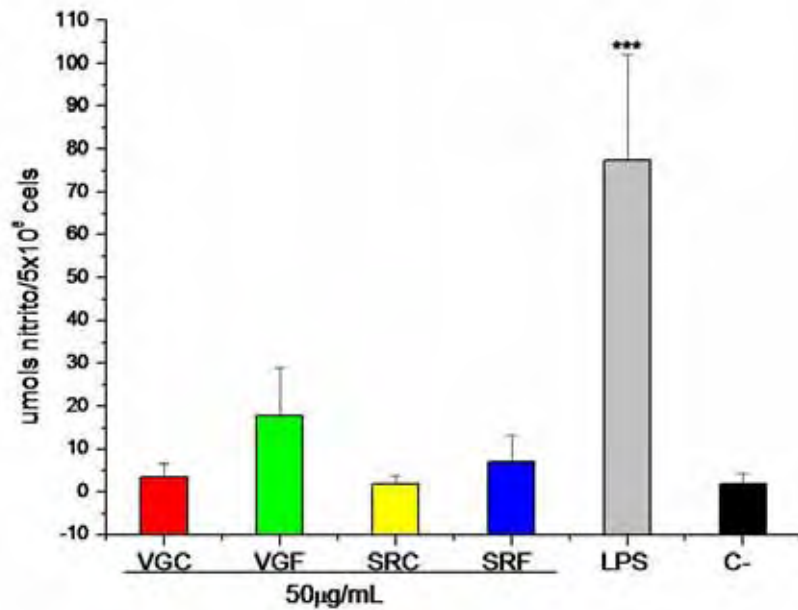


Figura 23 - Produção de óxido nítrico em cultura de células do exsudato peritoneal. As células peritoneais foram cultivadas em meio RPMI-1640-C (C-) e com o LPS (C+). As células peritoneais foram incubadas com os extratos por 24 h na concentração de 50 µg/mL. Aos sobrenadantes das culturas, foi adicionado o reagente de Griess, e após 10 min a placa foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito foi obtida de uma curva padrão com quantidades conhecidas de NaNO₂. Os resultados foram expressos como a média ± desvio-padrão de triplicata de 5 animais.

***p<0,001, estatisticamente significante em relação ao controle negativo.

5.7.2.2 Determinação da atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos das plantas *V. guianensis* e *S. reticulata* em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss quanto à produção de NO

A Figura 24 e a Tabela 15 mostram que ocorre alta produção de NO pelos macrófagos estimulados por LPS quando os extratos não estão presentes, contudo essa produção é reduzida na presença dos extratos de ambas espécies vegetais.

Esses resultados mostram que os extratos são potentes inibidores da produção de NO em culturas de macrófagos peritoneais.

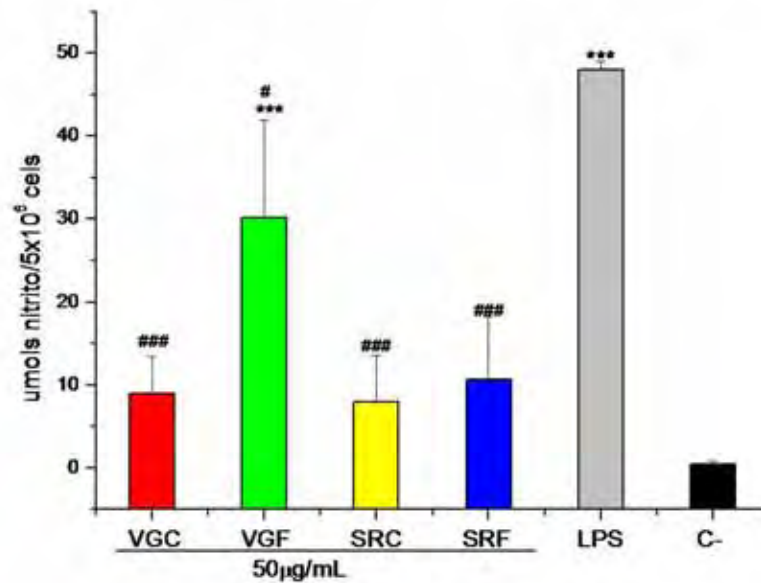


Figura 24. Produção de óxido nítrico em cultura de células do exsudato peritoneal na presença de LPS. As células peritoneais foram cultivadas em meio RPMI-1640-C (C-) e com o LPS (C+). As células peritoneais foram incubadas com os extratos por 24 h na concentração de 50 µg/mL e LPS 10 µg/mL. Aos sobrenadantes das culturas, foi adicionado o reagente de Griess, e após 10 min a placa foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito foi obtida de uma curva padrão com quantidades conhecidas de NaNO₂. Os resultados foram expressos como a média ± desvio-padrão de triplicata de 5 animais.

***p<0,001, estatisticamente significante em relação ao controle negativo.

p<0,001 e # p<0,05, estatisticamente significante em relação ao controle positivo.

Tabela 15 – Percentagem de inibição dos extratos sobre a produção de NO em células peritoneais

Extratos	Concentração de NO (umols nitrito/5x10 ⁶ cels)	% inibição de NO
VGC 50 µg/mL	8,94 ± 4,51	81,36
VGF 50 µg/mL	30,12 ± 11,85	37,20
SRC 50 µg/mL	7,98 ± 5,54	83,36
SRF 50 µg/mL	10,59 ± 7,71	77,92
LPS 10 µg/mL	47,96 ± 1,06	-----
RPMI-C	0,43 ± 0,50	-----

VGC: extrato das cascas de *V. guianensis*; **VGF:** extrato das folhas de *V. guianensis*; **SRC:** extrato das cascas de *S. reticulata*; **SRF:** extrato das folhas de *S. reticulata*.

Os produtos naturais têm sido considerados uma extraordinária fonte de substâncias terapêuticamente ativas (SEIDL, 1999). A química orgânica produz um número crescente de compostos sintéticos para uso medicinal, contudo importantes medicamentos da medicina moderna ainda são extraídos de plantas medicinais (WIJESEKERA, 1991)

A escolha das plantas *Vismia guianensis* e *Senna reticulata* para a realização desta pesquisa foi guiada por informações populares. Alguns estudos indicam que, se a seleção das espécies vegetais é feita baseada no uso tradicional, as possibilidades de sucesso da pesquisa são maiores (TROTTER et al., 1982; ELISABETSKY e WANNMACHER, 1993). Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (YUNES e CALIXTO, 2001).

A triagem fitoquímica preliminar das cascas e folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata* foi realizada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara (Tabela 6). Foi determinada a presença de antraquinonas, saponinas, flavonóides e taninos. Os estudos das ações das espécies *V. guianensis* e *S. reticulata*, no sistema imunológico murino, foram iniciados com os testes de viabilidade. Uma vez que as células são retiradas de seu ambiente natural *in vivo* e entram em contato com substâncias a serem testadas, a questão da

viabilidade é fundamental, principalmente durante o desenvolvimento das manipulações experimentais, assegurando dessa forma a capacidade de uma determinada população celular responder a vários estímulos, quaisquer que sejam eles (FRESHNEY, 1994). Estudos *in vitro* são importantes quando se dispõe de pequenas quantidades de material vegetal. Além disso, nesses testes as variáveis experimentais podem ser mais facilmente controladas, facilitando a reprodutibilidade dos ensaios (YUNES e CALIXTO, 2001).

A etapa seguinte foi a observação do potencial citotóxico dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata*, em macrófagos estimulados ou não por LPS (Figuras 24 e 25 e Tabelas 11 e 12). Foi observado que os extratos das cascas e das folhas de *V. guianensis* e o extrato das cascas de *S. reticulata* são tóxicos quando utilizados em altas concentrações, e o extrato das folhas de *S. reticulata* mostrou baixa toxicidade em todas as concentrações testadas. Os extratos, na concentração de 50 µg/mL, não foram citotóxicos, assim permitindo a avaliação das propriedades imunomodulatórias.

O sistema imunológico é um mecanismo complexo de defesa do organismo. A pesquisa básica das substâncias naturais com propriedades imunomoduladoras pode ser feita através de ensaios de estimulação da imunidade inata, como por exemplo, a eficiência dos granulócitos, macrófagos, sistema complemento, células *natural killer* (NK) e seus efeitos sobre a fagocitose, proliferação linfocitária, migração de linfócitos T, ativação de macrófagos, etc.

Entre os produtos secretados pelos macrófagos, o óxido nítrico tem um duplo papel no processo inflamatório. O NO secretado em altos níveis por macrófagos ativados é importante na defesa contra vírus, bactérias, fungos e células tumorais (MacMICKING, 1997). Por outro lado, os efeitos pró-inflamatórios do NO parecem ser mediados pela produção exagerada e estão relacionados a várias doenças como o choque séptico, doenças auto-imunes, arteriosclerose (MONCADA, 1991). Por esse motivo, o NO é um mediador atualmente conhecido como "faca de dois gumes", pois

pode exercer efeitos benéficos ou prejudiciais dependendo do contexto patofisiológico (CIRINO et al., 2002).

A avaliação da estimulação de macrófagos foi realizada através da produção de NO em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss, utilizando método de Griess. O experimento sem a ativação de macrófagos com LPS mostrou que os extratos não induziram a liberação de NO (Figura 26). Portanto, do ponto de vista desse mediador, os extratos não possuem propriedades imunoestimulantes. Diante desses resultados, restava uma dúvida. Se as plantas não possuíam atividades imunoestimulantes, poderiam estar promovendo um efeito supressor no sistema imunológico murino, ou não apresentariam nem atividades estimulantes nem supressivas?

Na segunda etapa deste trabalho, foi avaliada a capacidade dos extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de *V. guianensis* e de *S. reticulata* inibirem a produção de NO. Para esse estudo o mesmo teste imunológico foi realizado, contudo os macrófagos foram estimulados com LPS. Os resultados indicam uma potente inibição desse mediador pelo extrato das cascas de *V. guianensis* (81,36%), justificando de certa forma, o uso popular de *V. guianensis* no tratamento de reumatismo (ALMEIDA, 1993).

O NO é uma molécula mensageira envolvida na regulação de diversos processos fisiológicos incluindo a contração da musculatura lisa, a reatividade plaquetária, a neurotransmissão central e periférica e as ações citotóxicas de células imunológicas. Essa molécula é crucial para muitas funções fisiológicas e a sua liberação inapropriada está ligada a numerosas patologias (HOBBS et al., 1999). Nesta pesquisa realizada com as espécies *V. guianensis* e *S. reticulata*, foi possível observar que os extratos hidroetanólicos das cascas e das folhas de ambas espécies inibiram de forma moderada a fortemente a superprodução de NO, ocasionada pela estimulação de macrófagos por LPS (37,20 a 83,36% - Figura 24 e Tabela 15).

Os macrófagos têm um importante papel tanto na imunidade inata quanto na adquirida. Eles podem ser estimulados por citocinas e por componentes microbianos como o LPS (ADAMS e HAMILTON, 1984). Os dados do presente estudo poderão ser complementados com a determinação posterior de citocinas, trazendo novos subsídios a respeito do mecanismo imunológico desencadeado pelo uso medicinal destas espécies vegetais.

O NO não é um oxidante forte, porém essa molécula reage com o ânion superóxido (O_2^-), levando à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) e ácido peroxinitroso ($ONOOH$), os quais dramaticamente aumentam a toxicidade de NO e O_2^- isolados. O peroxinitrito é capaz de oxidar várias moléculas biológicas (WANG et al., 2002).

A célula produtora de NO e sua vizinhança não estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas. Várias evidências estão se acumulando no sentido de admitir que o NO contribua para algumas condições patológicas como asma, artrite reumatóide, tuberculose, esclerose múltipla, doença de Parkinson, doença de Alzheimer e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (CALABRESE et al., 2004). Além dessas doenças, a falência cardíaca crônica está relacionada com a produção excessiva de NO pela iNOS e o excesso de NO é também um dos primeiros sinais de rejeição dos transplantes (DUSTING e MacDONALD, 1995).

Portanto, agentes que modulem a atividade de NO podem ter considerável valor terapêutico. Em particular aqueles capazes de reduzir a formação de NO, podem ser benéficos em estados patofisiológicos, onde a produção excessiva desse mediador é um fator contribuinte, como é o caso das doenças inflamatórias (HOBBS et al., 1999).

6. Considerações Finais

O emprego de plantas medicinais na medicina tradicional existe há centenas de anos. A grande preocupação é que os vegetais são utilizados indiscriminadamente pela população e, muitas vezes, essas plantas não têm ação comprovada e podem apresentar riscos de toxicidade, como é o caso da *Digitalis purpurea* L., que possui dose terapêutica muito próxima da dose tóxica. Nos últimos anos muitos esforços têm sido estimulados para a viabilização de pesquisas a respeito da composição química e aplicabilidade farmacológica de espécies vegetais, utilizadas popularmente no tratamento de diferentes sintomas.

Nas últimas décadas um dos maiores problemas de Saúde Pública é o agravamento da resistência microbiana, que é agravada pela dificuldade para a descoberta e lançamento de novos agentes antimicrobianos. Diante disto, torna-se relevante a pesquisa de novos antimicrobianos com o uso de produtos de origem natural.

Na busca de antimicrobianos de origem vegetal deve-se enfatizar que o Brasil possui um grande potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos, uma vez que é um país rico em biodiversidade, com diversos tipos de vegetação: cerrado, campos, caatinga, complexo do Pantanal, vegetação litorânea, mata de araucária, floresta latifoliada tropical (Mata Atlântica) e floresta latifoliada equatorial (Floresta Amazônica). Além disso, é um país rico em culturas e conhecimento tradicional, pela mistura de raças.

A grande variedade de espécies vegetais existentes faz com que, nem sempre, a escolha da planta a ser estudada seja uma tarefa fácil. No entanto, de acordo com a finalidade do estudo, a escolha pode ser orientada, levando em conta as informações da medicina popular.

Considerando a escassez de estudos com as espécies *Senna reticulata* e *Vismia guianensis* no que tange à atividade antimicrobiana e a utilização destas espécies pelas populações, testes de atividade antimicrobiana dos extratos hidroetanólicos das cascas do caule e folhas das referidas espécies foram realizados.

Em consonância com os resultados de outros autores, através dos bioensaios realizados foi possível observar que os extratos das cascas e folhas de *V. guianensis* são potenciais antimicrobianos, uma vez que apresentaram CIM variando de 0,01563 a 1 mg/mL frente aos fungos dermatofíticos e às bactérias *S. epidermidis*, *S. aureus* e *B. subtilis*, nos ensaios de microdiluição. Os extratos das cascas e folhas de *S. reticulata* mostraram atividade antimicrobiana em concentrações maiores que variaram de 1 a 100 mg/mL.

A bioautografia permitiu observar que os extratos possuem frações que apresentam atividade antimicrobiana.

Tanto a cepa padrão ATCC quando a cepa clínica da levedura *C. albicans* não apresentaram sensibilidade aos extratos testados nas concentrações testadas, o que é confirmado pela literatura.

O fato dos extratos inibirem a produção de NO nos ensaios imunológicos, pode caracterizá-los indícios de atividade antiinflamatória *in vitro*.

Diante dos resultados obtidos no estudo da atividade antimicrobiana de *Senna reticulata* e de *V. guianensis*, pode-se pensar no estudo químico-farmacológico para o isolamento e identificação dos princípios ativos. Estes aspectos são extremamente importantes na perspectiva do desenvolvimento de um produto farmacêutico, o qual deve ser precedido por estudos de pré-formulação, além de ensaios de toxicidade visando otimizar a ação terapêutica através da tecnologia farmacêutica e assegurar a qualidade e eficácia do material, bem como a segurança do novo produto desenvolvido.

7. Referências Bibliográficas

ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Annu. Rev. Immunol.**, v.2, p.283-318, 1984.

AERTS, T.J.; BARRY, T.N.; MCNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.75, p.1-12, 1999.

ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas tóxicas no jardim e no campo**. Belém: Ministério da Agricultura - FCAP Serviços de Documentação e Informação, 1980, 120p.

ALCAMO, I.E. **Fundamentals of microbiology**. 6th ed. Massachusetts: Jones and Bartlett Publ., 2001. p. 534;567-571,698-708, 743-744.

ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo: Hemus, 1993. p.225-226.

ALONSO, J.R. **Fitomedicina: curso para profissionais da área de saúde**. São Paulo: Pharmabooks, 2008. 195p.

ÁLVAREZ, R.E.; JIMENEZ, G.O.J.; POSADA, C.M.A.; ROJANO, B.A.; GIL, J.H.G.; GARCÍA, C.M.P.; DURANGO, D.L.R. Antioxidant activity and phenolic content of extracts from berries of two species of *Vismia* genus (Guttiferae). **Vitae**, v. 15, n. 1, p.165-172, 2008.

ANDRADE-NETO, V.F.; POHLIT, A.M.; PINTO, A.C.S.; SILVA, E.C.C.; NOGUEIRA, K.L.; MELO, M.R.S.; HENRIQUE, M.C.; AMORIM, R.C.N.; SILVA, L.F.R.; COSTA, M.R.F.; NUNOMURA, R.C.S.; NUNOMURA, S.M.; ALECRIM, W.D.; ALECRIM, M.G.C.; CHAVES, F.C.M.; VIEIRA, P.P.R. In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.102, n.3, p.359-365, 2007.

ARAÚJO, C.R.F. Atividade antifúngica *in vitro* da casca do *Anacardium occidentale* Linn sobre leveduras do gênero *Candida*. **Arq. Odontol.**, v.41, n.3, p.193-272, 2005.

BARBOSA, R.C.S.B. GIESBRECHT, A.M.; BARBOSA FILHO, J.M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. **Acta Amaz.**, v. 18, n. 1-2, p.91-94, 1988.

BARITAU, O.; RICHARD, H.; TOUCHE, J.; DERBESY, M. Effects of drying and storage of herbs and spices on the essential oil. part I. Basil, *Ocimum basilicum* L. **Flavour Fragr. J.**, v.7, p.267-271, 1992.

BARON, E.J.; FINEGOLD, S.M. **Diagnostic microbiology**. 8th. ed. St. Louis: C. Mosby, 1990.

BARRY, A.L. Procedures and theoretical considerations for testing antimicrobial agents in agar media. In: LORIAN V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3rd. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1991.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, p.493-496, 1966.

BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N. **Práticas de Farmacognosia**. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2005. 145p.

BOLLELA, V.R.; SATO, D.N.; FONSECA, B.A.L. Problemas na padronização da reação em cadeia da polimerase para diagnóstico da tuberculose pulmonar. **Rev. Saúde Pública.**, v.33, n.3, p-281-286, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas e Manuais técnicos. **Lavar as Mãos: Informações para Profissionais de Saúde**. Brasília, 1989. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20/05/2009.

BRASIL. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 24 de março 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, DF, 2005. 38p.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Ministério da Saúde. **Higienização das mãos em serviços de saúde**. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 20/05/2009.

BUCALEM, G.; WEI, T.H. **Anti-sépticos na lavagem das mãos do cirurgião**. Disponível em: <<http://www.inscricaoonline.com.br/docs/sbcj/img/V2A0aa0015.pdf>>. Acesso em: 14/04/2008.

CABRAL, J.A; McCHESNEY, J.D.; MILHOUS, W.K. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. **J. Nat. Prod.**, v.56, n.11, p.1954-1961, 2003.

CALABRESE, V.; BOYD-KIMBALL, D.; SCAPAGNINI, G.; BUTTERFIELD, D.A. Nitric oxide and cellular stress response in brain and neurodegenerative disorders: the role of vitagenes. **In Vivo**, v.18, n.3, p.245-267, 2004.

CANNELL, R.J.P. **Natural products isolation: methods in biotechnology**. Totowa: Humana Press. 1998. 473p.

CANTRELL, C.L.; FRANZBLAU, S.G.; FISCHER, N.H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med.**, v. 67, p.1-10, 2001.

CARNEIRO, A.L.B.; TEIXEIRA, M.F.S.; DE OLIVEIRA, V.M.A.; FERNANDES, D.C.D.; CAUPER, G.S.D.B.; POHLIT, A.M. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke Forest Reserve, Manaus, State of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.103, n.1, p.31-38, 2008.

CELEGHINI, R.M.S.; VILEGAS, J.H.Y.; LANÇAS, F.M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.12, n.6, p.706-709, 2001.

CIRINO, G.; SANTAGADA, V.; CALIENDO, G. The nitric oxide related therapeutic phenomeno: a challenging task. **Curr. Pharm. Des.**, v.8, n.3, p.233-239, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; approved standard. **NCCLS document MP27-A2**, v.22, n.15, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of Filamentous fungi; approved standard. **NCCLS document M38-A**, v.22, n.16, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. **NCCLS document M2-A8**, v.23, n.1, 2003.

COLLINS, L.A.; FRANZBLAU, S.G. Microplate Alamar Blue Assay versus BACTEC 460 System for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p.1004-1009, 1997.

COLORADO, J.R.; GALEANO, J.R.; MARTÍNEZ, A.M. Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. **Vitae**, v.14, n.1, p.67-71, 2007.

CORREIA, A.F.; SEGOVIA, J.F.O.; GONÇALVES, M.C.A.; DE OLIVEIRA, V.L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.12, n.6, p.369-380, 2008.

CORTEZ, A.C.A. Avaliação da atividade *in vitro* dos extratos fitoquímicos de *Caesalpinia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Wild.)Irwin & Barneby (Fabales – Caesalpinaceae) para *Leishmania* sp & *Trichopyton* sp. Manaus, 2004. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. v.2.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CRUZ, M.C.S.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JR, A.M.; DE MÉLO, D.L.F.M.; ALVIANO, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, D.S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medical plants involved in popular treatment of mycoses. **J. Ethnopharmacol.**, v.114, n.14, p.25-29, 2006.

CUNHA, A.P. **Farmacognosia e fitoquímica**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

CURY, A.E.; PAULA, C.R.; MELHEM, M.S.C.; SILVA, M.R.R.; GIANNINI, M.J.S. M. Testes de sensibilidade *in vitro* a antifúngicos. **Microbiologia in foco**, v.1, p.24-34, 2007.

DAMODARAN, S.; VENKATARAMAN, S. A study on the therapeutic efficacy of *Cassia alata* Linn. leaf extract against *Pityriasis versicolor*. **J. Ethnopharmacol.** v.42, n.1, p.19-23, 1994.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Review article: Flavonoids old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sci.**, v.65, n.4, p. 337-353, 1999.

DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Unesp, 2002.

DOUGHARI, J.H.; EL-MAHMOOD, A.M.; TYOYINA, I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L.). **African J. Pharm. Pharmacol.**, v.12, n.1, p.7-13, 2008.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.97, n.2, p.305-311, 2004.

DUSTING, G.J.; MacDONALD, P.S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Ann. Med.**, v.27, n.3, p.395-406, 1995.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Rev. Cien. Cult.**, v.55, n.3, p. 35-36, 2003.

ELISABETSKY, E.; WANNMACHER, L. The status of ethnopharmacology in Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v.38, n.2-3, p.137-143, 1993.

FALKENBERG, M.B. Quinonas in SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais *in* SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S.M.K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v.12, p.236-240, 2005.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L. A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.42, n.3, p.369-394, 2006.

FERNÁNDEZ-TORREZ, B.; CARRILLO, A.J.; MARTÍN, E.; DEL PALACIO, S.; MOORE, M.K.; VALVERDE, A.; SERRANO, M.; GUARRO, J. In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n.9, p.2524-8, 2001.

FITZPATRICKS, T.B. **Dermatology in general medicine**. 5th. ed. EUA: McGraw-Hill, 1999.

FRANZBLAU, S.G.; WITZIG, R.S.; McLAUGHLIN, J.C.; TORRES, P.; FUENTES, P.; COOK, M.B.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M.T.; QUENZER, V.K.; FEERGUSON, R.M.; SHEEN, P.; GILMAN, R.H. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 2, p.362-366, 1998.

FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd. ed. New York: Wily-Liss, 1994. 486p.

GAYOSO, C.W.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAJANO, V.N.; PEREIRA, F.O.; LIMA, I.O. Ação inibitória do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume, α -pipeno e β -pipeno sobre os fungos isolados de onicomiose. **J. Bras. Fitomedicina**, v.1, n.4, p.25-29, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quím. Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GOODALL, R.R.; LEVI, A.A. A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. **Nature**, v.158, p.675-676, 1946.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GONZÁLEZ, V.S.; DELGADILLO, A.A. Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. **Rev. Cent. Dermatol. Pascua**, v.11, n.1. p.18-21, 2002.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNERNBAUN, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Chem. Toxic.**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HAMBURGUER, M.O.; CORDELL, G.A. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. **J. Nat. Prod.**, v.50, n.1, p.19-22, 1987.

HARBORNE, J.B. **The flavonoids advances in research since**. London: Chapman and Hall, 1996.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, v.32, p.1141-1148, 1983.

HOBBS, A.J.; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.39, p.191-220, 1999.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios Ativos de Plantas Superiores**. São Carlos: Edufscar, 2003.

JANUÁRIO, A.H.; FILHO, E.R.; PIETRO, R.C.L.R.; KASHIMA, S.; SATO, D.N.; FRANÇA, S.C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. **Phyther. Res.**, v.16, n.5, p.445-448, 2002.

KEDE, M.P.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Ateneu, 2003.

KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. **Fitoterapia**, v.72, p. 561-564, 2001.

KOŁODZIEJ, H.; KAYSER, O.; LATTÉ, K.P.; FERREIRA, D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannin and related compounds using the microdilution broth method. **Planta Med.**, v. 65, p. 444-446, 1999.

KRUGER, R.H.; MOURA, M.A.O. Antibiograma – método de Kirby-Bauer. In: MILLER, R.N.G.; CAPDEVILLE, G.; KRUGER, R.H. **Manual de práticas laboratoriais em microbiologia**. 1. ed. Brasília: Universa, 2003. p.99-101.

KUETE, V.; NGUEMEVING, J.R.; BENG, V.P.; AZEBAZE, A.G.B.; ETOA, F.X.; MEYER, M.; BODO, B.; NKENGFAK, A.E. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **J. Ethnopharmacol.**, v.109, p.372-379, 2005.

LAPA, A.J. **Bioprospecção no Brasil: abordagens alternativas para fabricação de medicamentos autóctones**. Disponível em: <http://www.universia.com.br>. Acesso em: 07/jun/2009.

LIMA, E.O. Estudo das dermatofitoses em João Pessoa – Paraíba e da atividade antifúngica de plantas medicinais da região contra alguns agentes isolados. São Paulo, 1996. 180p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

LIMA, E.O.; CURY, A.E.; GOMPERTZ, O.F.; PAULO, M.Q. Atividade antifúngica de extratos obtidos de espécies de leguminosae contra dermatófitos. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde**, v.1, n.3, p.53-56, 1997.

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

MacMICKING, J.; QIAO-WEN XIE; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu. Rev. Immunol.**, v.15, p.323-350, 1997.

MAKINDE, A.A.; IGOLI J.O.; TA'AMA, L.; SHAIKU S.J.; GARBA A. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. **Afr. J. Biotechnol.**, v.6, n.13, 2007.

MATOS, F.J.A. **As plantas das farmácias vivas**. Fortaleza: BNB, 1997. 57p.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1997. 141p.

MIGLIATO, K.F. *Syzygium cumini* (L.) Skeels – Jambolão: Estudo farmacognóstico, otimização do processo extrativo, determinação da atividade antimicrobiana do extrato e avaliação da atividade antisséptica de um sabonete líquido contendo o referido extrato. 2005. 140f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Paulista.

MILLER, A.L. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. **Alternative Med.**, v.1, p.103-111, 1996.

MONACHE, F.D.; TORRES, F.F.; MARINI-BETTOLO, G.B.; LIMA, R.A. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: γ -hidroxi and γ,γ -dihidroxi-ferruginina A. **J. Nat. Prod.**, v.43, n.4, p.487-494, 1980.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Method.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLIKA, T.C.; SUVIMOL, S.; VEENA, S.N.; WANDEE, G. Antimicrobial effects of Thai medical plants against acne-inducing bacteria. **J. Ethnopharmacol.**, v.101, p.330-333, 2005.

MURRAY, P.R.. **Microbiologia médica**. 1st. ed., Washington: C. V. Mosby, 1992.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 6th. ed., Washington: C. V. Mosby, 1995.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R.A.; SANTOS, C.X.C.; YAMADA, A.T.; AUGUSTO, O. Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vitro revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radic. Biol. Med.**, v.30, p.1234-1242, 2001.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C.M.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003. 239p.

OGUNDARE, O.A. The antimicrobial pattern and phytochemical properties of the leaf extracts of *Senna podocarpa*. **African J. Mic. Research**, v.3, n.7, p.400-406, 2009.

OLIVEIRA, C.M.A.; SILVA, M.R.R.; KATO, L.; SILVA, C.C.; FERREIRA, H.D.; SOUZA, L.K.H. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo, v.15, n.5, p.756-759, 2004.

OLIVEIRA, J.A.A.; SILVA, A.O.; CORTEZ, A.C.A. Comportamento de dermatófitos do gênero *Trichophyton* " in vitro" frente a extratos de plantas amazônicas do gênero *Cecropia* sp. *Cecropiaceae* (Embaúba) e *Arrabidaea* sp. *Bignoneacea* (Crajiuru). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INPA, Manaus. 2000, Manaus. **Anais...** Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 2000. p.153-156.

ORTH, D.S. Microbiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries**, v.2, p.26-31, 1990.

PALOMINO, J.C; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay apate: simple and inexpensive method for detection of

drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, n.8, p.2720-2722, 2002.

PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROT, L.D.; PAULETTI, G.F.; SERAFINI, L.A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no nordeste do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.13, n.1, p. 17-22, 2003.

PAROLIN, P. *Senna reticulata*, a pioneer tree from Amazonian várzea foodplains. **Bot. Rev.**, v.67, n.2, p.239-254, 2001.

PASQUA, G.; MONACELLI, B.; CUTERI, A. ; SPUNTARELLI, F. ; RASCIO, N. ; BOTTA, B. ; MONACHE, G.D. ; SCURRIA, R. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis* DC. **Protoplasma**, v.189, p.9-16, 1995.

PELLETIER, S.W. **Alkaloids**: chemical and biological perspectives, v.1-6. New York: Pergamon, 1983-1988. *apud* SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

PICON,P.D.; GIUSTINA,M.L.D.; RIZZON,C.F.C.; BASSANESI,S.L.; ZANARDO,A.P.; MICHALCZUK,M.T.; RICARDI,L.R. Resultado do tratamento com estreptomina, isoniazida e etambutol (esquema SHM). **J. Pneumol.**, v.28, n.4, p.187-192, 2002.

PIETRO, R.C.L.R.; KASHIMA, S.; SATO, D.N.; JANUÁRIO, A.H.; FRANÇA, S.C. In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v.7, n.4, p.335-338, 2000.

PINHEIRO, F.; RIBEIRO, J.F. Síndromes de dispersão de sementes em Matas de Galeria do Distrito Federal. In: RIBEIRO, J.F. (Org.). **Cerrado**: caracterização e recuperação de matas de galeria. Planaltina, DF: Embrapa, 2001. p.335-375.

PINO-BENITEZ N.; CORDOBA Y. Actividad antimicrobiana y fitoquímica preliminar de plantas utilizadas como colorantes en el municipio de Quibdó – Chocó. **Sci. Technica**, n.33, 2007, p.387-390.

PRETTO, J.B. Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense. Itajaí, 2005. 85p. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Itajaí.

PRUNIERAS, M. **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2. ed. São Paulo: Organização Andrei, 1994. p.31-43.

PUJOL, I.; CAPILLA, J. FERNÁNDEZ-TORREZ, B.; ORTONEDA, M.; GUARRO, J. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.7, p.2618-21, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia:** oportunidades econômicas e sustentáveis. Manaus: INPA / SEBRAE / AM, 2001. p.311-4.

RODRIGUES, E. Plantas com restrições de uso indicadas por três grupos humanos do Brasil (cabloco, indígena e quilombola). **J. Bras. Fitomed.**, v.3, n.3, p.92-97, 2005.

RODRIGUES, R.S.; FLORES, A.S.; MIOTTO, S.T.S.; BAPTISTA, L.R.M. O gênero *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Bot. Bras**, v.19, n.1, p.1-16, 2005.

ROTH, R.R.; JAMES, W. Microbiology of the skin: resident flora, ecology infection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.20, n.3. p.382-387, 1989.

SALVADOR, M.J.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA S.C.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adult plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Braz. J. Microbiol.**, v.35, p.131-136, 2004.

SANCHES, A.C.C. Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicatrizante dos seus extratos. Araraquara, 2004. 214f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

SANTOS, R.N.; BRAZ FILHO, R.; SILVA, M.G.V. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). **Quim. Nova**, v.31, n.8, p.1979-1981, 2008.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos *in* SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, 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. **Braz. J. Microbiol.**, v.35, p.275-280, 2004.

SARTORI, M.R.K. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). Itajaí, 2005. 81p. Dissertação (Mestrado). Universidade do Vale do Itajaí.

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. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STRHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **J. Bras. Fitomed.**, São Paulo, v.3, n.4, p.139-141, 2005.

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S.; COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **J. Ethnopharmacol.**, v.96, p.563-568, 2005.

SEIDL, P.R. Prospects for Brazilian Natural Products. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v.71, p.239-247, 1999.

SEO, E.K; WANI, M.C.; WALL, M.E.; NAVARRO, H.; MUKHERJEE, R.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v.55, p.35-42, 2000.

SIDRIM, J.J.C. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 287p.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais**. Viçosa: Arte e Livros, 2000. 135p.

SILVA, M.F.; LISBÔA, P.L.B.; LISBOA, R.C.L. **Nomes vulgares de plantas amazônicas**. Belém: INPA, 1977.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

SIXEL, P.J.; PECINALLI, N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, Brasília, v.16, n.13-14, p.74-77, 2005.

SOUZA, M.M.; CRUZ, A.B.; SCHUMACHER, M.B.; KREUGER, M.R.O.; FREITAS, R.A.; CRUZ, R.C.B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003. 239p.

SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; OLIVEIRA JR, J.G.; SOUZA JR, A. H.; FERNANDES, O.F.L.; SILVA, M.R.R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae) towards dermatophytes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.15, n.7, p. 963-965, 2003.

SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C.; OLIVEIRA JR, J. G.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L.M.; SILVA, M.R.R. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. **Braz. J. Microbiol.**, v.33, p.247-249, 2002.

SOUZA, T.M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.2, p.221-226, 2007

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. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p.379-384, 2004.

SUFFREDINI, I.B.; PACIÊNCIA, M.L.B.; NEPOMUCENO, D.C.; YOUNES, R.N.; VARELLA, A.D. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts – Clusiaceae. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.101, n.3, p.287-290, 2006.

SUFFREDINI I.B.; PACIÊNCIA M.L.B.; FRANA, S.A.; VARELLA, A.D.; YOUNES R.N. In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v.62, n.10, p.798-800, 2007.

TAMOKOU, J.D.D.; TALA, M.F.; WABO, H.K.; KUIATEA, R; TANE, B. Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. **J. Ethnopharmacol.**, v.4, p.1-5, 2009.

TAVEIRA, C.C. Ação antimicrobiana de extratos de plantas do Cerrado e isolamento de substância ativa de *Kielmeyera coriacea*. Brasília, 2007. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

TEIXEIRA, J.S.R.; CRUZ, F.G. Polyisoprenylated benzophenone derivatives from *Clusia obdeltifolia*. **Tetrahedron Lett.**, v.46, p.2813–2816, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006, p. 183-200; 459-460; 590-592.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991. p. 91-94.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 57-65; 101.

TROTTER, R.T.; LOGAN, M.H.; ROCHA, J.M.; BONETA, J.L. Ethnography and bioassay: combined method for preliminary screen of home remedies for potencial pharmacological activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.8, p.113-119, 1982.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v.29, p.326-337, 2006.

VIEGAS JR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D.H.S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E.J.; MIRANDA, A.L.P.M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; YOUNG, M.C.M.

Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Quim. Nova**, v.29, n.6, p.1279-1286, 2006.

WABO, H.K.; KOUAM, S.F.; KROHN, K.; HUSSAIN, H.; TALA, M.F.; TANE, P.; REE, T.V.; HU, Q.; SCHULZ, B. Prenylated anthraquinones and other constituents from the seeds of *Vismia laurentii*. **Chem. Pharm. Bull.**, v.55, n.11, p.1640-1642, 2007.

WANG, C.C.; HUANG, Y.J.; CHEN, L.G.; LEE, L.T.; YANG, L.L. Inducible nitric oxide synthase inhibitors of Chinese herbs III: *Rhenn palmatum*. **Planta Med.**, v.68, p.869-874, 2002.

WEDGE, D.E.; NAGLE, D.G. A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. **J. Nat. Prod.**, v.63, p.1050-1054, 2000.

WIJESEKERA, R.O.B. **The medicinal plant industry**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 269p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998. 115p.

YASUNAKA, K.; ABE, F.; NAGAYAMA, H.; OKABE, H.; LOZADA-PÉREZ, L.; LÓPEZ-VILLAFRANCO, E.; MUÑIZ, E.E.; AGUILAR, A.; REYES-CHILPA, R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. **J. Ethnopharmacol.**, v.97, p.293-299, 2005.

YIMDJO, M.C.; AZEBAZE, A.G.; NKENGFAK, A.E.; MEYER, A.M.; BODO, B.; FOMUM, Z.T. Antimicrobial and cytotoxic agents from *Calophyllum inophyllum*. **Phytochemistry**, v.65, p.2789-2795, 2004.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. 500p.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química da Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001. p.17-44.

ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária. 2001. p. 435-479.

ZAITZ, C.; RUIZ, L.R.B.; DRULLIS, E.M.A.; GURFINKEL, P.; CIARNUTO, M.A. Estudo clínico com o uso do itraconazol em unha crural, unha do corpo e unha do pé interdigital. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.32, n.4, p.299-303, 1990.

ZAMPINI, I.C.; CUDMANI, N.; ISLA, M.I. Antimicrobial activity of argentine medicinal plants on antibiotic-resistant bacteria. **Acta Bioquím. Clín. Latinoam.**, v.41, n.3, p.385-393, 2007.