

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
EXTRATOS DE *Byrsonima* spp E *Alchornea* spp: ESTUDO
COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE DILUIÇÃO
EM TUBOS E MICROPLACAS.**

HELEN PIMENTA DE MORAES

ARARAQUARA – SP

2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DE EXTRATOS DE *Byrsonima* spp E *Alchornea* spp: ESTUDO
COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE DILUIÇÃO
EM TUBOS E MICROPLACAS.**

HELEN PIMENTA DE MORAES

ORIENTADORA: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

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 necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA – SP
2006

Ficha Catalográfica

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

M827a Moraes, Helen Pimenta
Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonima* ssp E *Alchornea* ssp: Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas / Helen Pimenta Moraes. – Araraquara, 2006.
96 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Tais Maria Bauab

1. *Byrsonima* ssp. 2. *Alchornea* ssp. 3. Atividade antimicrobiana. I. Bauab, Tais Maria, orient. .II. Título.

CDD: 616

CAPES:40300005

*“O amor é o verdadeiro milagre da vida,
o sentimento mais profundo que se conhece
e o antídoto eficaz para todo sofrimento.”*

(Joanna de Ângelis)

*Aos meus pais, **Hermes e Dirce**, pelo
incentivo e amor incondicional.*

*Ensinaram-me a ter paciência,
dignidade e força de vontade para
atingir os meus objetivos.*

*Obrigada pelo carinho, confiança, e por
tudo que fizeram por mim.*

*Aos meus irmãos, **Hemerson, Hermes
Junior e Diego**, pelo carinho e pelos bons
momentos que passamos juntos.*

*Ao **Raphael**, pelo amor, dedicação,
companheirismo e apoio em todos os
momentos.*

Agradeço a Deus, por vocês existirem e fazerem parte da minha vida.

*“Se te afeições, assim, aos ideais de aprimoramento e
progresso, não te afastes do TRABALHO que renova,
do ESTUDO que aperfeiçoa, do PERDÃO que ilumina,
do SACRIFÍCIO que enobrece e da BONDADE que santifica...”*

(Chico Xavier)

*À Deus pelo seu amor, pela
oportunidade desta existência,
pela saúde, pela Sua presença e
proteção em todos os momentos.*

*“Se a criatura humana considerasse todas as bênçãos
de que desfruta no corpo, as concessões que lhe são
colocadas a disposição, ela somente teria razões
para agradecer, jamais para reclamar”.*

(Joanna de Ângelis)

À Profa. Dra. Taís Maria Bauab, pela orientação, incentivo, compreensão, paciência e amizade durante os tempos de convivência.

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”

(Fernando Pessoa)

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, pela amizade, incentivo e apoio, meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva Sacramento, pela amizade, disponibilidade e paciência cedidas no acompanhamento do projeto e estágio de docência. E por me fazer admirar ainda mais o campo da Botânica e das Plantas Medicinais.

À Profa. Clarice Queico Fujimura Leite pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas pela colaboração.

Ao Instituto de Química da UNESP, pelo fornecimento dos extratos vegetais.

Aos alunos do Instituto de Química da UNESP, que se esforçaram para fornecer os extratos vegetais e colaboraram com seu conhecimento.

À Dra Miriam Sanommiya pela amizade, apoio e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Botânica da FCF, Angélica, Allynson, e Douglas pela força e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia da FCF, Karina, Marina, Fábio, Célio, Marcus Vinícius e Clesley pela amizade e colaboração.

Aos funcionários da FCF, Marisa, Ednéia, Silvia e Bernadete pela ajuda na realização dos estudos e pela amizade.

Ao funcionário Francisco Carlos Rocatelli (Chico), pelas fotos e, aos demais funcionários da SAEPE pelo auxílio.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia da FCF, Valéria e Gustavo, pela paciência e colaboração na leitura dos testes.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, Maria Carolina, Andréa, Arnóbio, Beatriz, Cinara, Cris, Cynthia, Daniele, Dani, Gisele, Greici, Luana, Karen, Mara, Nelson, Ketylin, Priscila, Thiago, Tina, Traudi, Vanessa, pelos bons tempos de convivência.

As amigas Cristina, Daniele, Luana e Mara por compartilharem todos os momentos importantes durante esta etapa de nossas vidas. Obrigada pela amizade, incentivo e companheirismo durante todo o tempo de convivência.

Aos Professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UNESP, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, pela ajuda, paciência e disposição.

Ao Programa BIOTA-FAPESP pelo auxílio financeiro.

À CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Espécies vegetais	12
2.1.1. <i>Alchornea glandulosa</i> Poepp. & Endl	12
2.1.2. <i>Alchornea triplinervia</i> (Spreng.) M. Arg.	14
2.1.3. <i>Byrsonima crassa</i> Niedenzu.	16
2.1.4. <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss	17
2.1.5. <i>Byrsonima basiloba</i> Juss	19
2.2. Atividade antimicrobiana.	21
2.2.1. Microrganismos.	23
3. OBJETIVOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Extratos vegetais.	29
4.1.1. Obtenção e procedência.	29
4.1.2. Cinética de leitura espectrofotométrica.	30
4.2. Amostras bacterianas.	31
4.2.1. Determinação da curva de crescimento bacteriano.	31
4.3. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica	32
4.3.1. Padronização da suspensão bacteriana.	32
4.3.2. Preparo das soluções contendo substâncias de referência para controle negativo.	32
4.3.3. Método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica. ...	33
4.4. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador.	36

4.4.1. Método de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador. . . .	36
4.5. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em tubos.	39
4.5.1. Método de diluição em tubos.	39
5. RESULTADOS.	42
5.1. Cinética de leitura espectrofotométrica.	42
5.2. Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>	43
5.2.1. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica	43
5.2.2. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador.	51
5.2.3. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em tubos.	54
6. DISCUSSÃO.	58
7. CONCLUSÕES.	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	69
9. ANEXOS.	81

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Alchornea glandulosa</i> Poepp. & Endl.	13
2	<i>Alchornea triplinervia</i> (Spreng.) M. Arg.	15
3	<i>Byrsonima crassa</i> Niedenzu.	16
4	<i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss	18
5	<i>Byrsonima basiloba</i> Juss	20
6	Configuração esquemática do preparo da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM utilizando leitura espectrofotométrica.	35
7	Leitor de Microplacas.	36
8	Configuração esquemática do preparo da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM utilizando resazurina como revelador.	38
9	Esquema das diluições seriadas dos extratos.	40
10	Atividade antibacteriana do extrato de <i>Alchornea glandulosa</i>	44
11	Atividade antibacteriana do extrato de <i>Alchornea triplinervia</i>	45
12	Atividade antibacteriana do extrato de <i>Byrsonima crassa</i>	46
13	Atividade antibacteriana do extrato de <i>Byrsonima intermedia</i>	47
14	Atividade antibacteriana do extrato de <i>Byrsonima basiloba</i>	48
15	Técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).	53

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Absorbância dos extratos vegetais na concentração de 1000µg/mL e do meio de cultura (CMH).	43
2	Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de diluição em microplaca utilizando leitura espectrofotométrica.	49
3	Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador.	51
4	Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de diluição em tubos.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>A. glandulosa</i>	<i>Alchornea glandulosa</i>
<i>A. triplinervia</i>	<i>Alchornea triplinervia</i>
<i>B. crassa</i>	<i>Byrsonima crassa</i>
<i>B. intermedia</i>	<i>Byrsonima intermedia</i>
<i>B. basiloba</i>	<i>Byrsonima basiloba</i>
MeOH	Metanólico
MeOH/H ₂ O	Hidrometanólico
CHCl ₃	Clorofórmico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMH	Caldo Mueller Hinton
MHA	Mueller Hinton Agar
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
PBS	Tampão fosfato de sódio
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ATCC	American Type Culture Collection

RESUMO

RESUMO

O Brasil apresenta uma grande diversidade de plantas medicinais, cuja utilização pela população vem aumentando cada vez mais. *Byrsonima* (Malpighiaceae) e *Alchornea* (Euphorbiaceae) que são plantas do Bioma-Cerrado do estado de São Paulo apresentam compostos com grande potencial de atividade biológica, sendo entretanto, pouco estudadas. A atividade antimicrobiana é uma etapa de extrema importância na caracterização biológica de produtos naturais com potencial farmacológico. Nossos objetivos foram investigar a atividade antibacteriana de extratos metanólicos e clorofórmicos de *Byrsonima* spp. e *Alchornea* spp empregando as técnicas de diluição em tubos e em microplacas com leitura espectrofotométrica e visual utilizando resazurina como revelador. Foram utilizadas as bactérias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas hydrophila*. Nos ensaios em microplacas e em tubos foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos vegetais testados à concentração de 1000µg/mL a 31,25µg/mL. Objetivou-se também comparar a eficácia das metodologias empregadas. Nosso estudo demonstrou maior atividade antibacteriana dos extratos metanólicos tanto de *Byrsonima* quanto de *Alchornea*, ressaltando os dados obtidos com *B. crassa* (MeOH) e *B. basiloba* (MeOH) que apresentaram acentuada atividade antibacteriana frente aos diferentes microrganismos testados. As metodologias empregadas foram eficazes para essa finalidade sendo as de diluição em microplacas mais vantajosas, pelo emprego de pequenos volumes principalmente os de extratos vegetais que são obtidos em pequenas quantidades. Dentre os dois métodos de microdiluição, a que empregava leitura espectrofotométrica apresentou-se mais sensível, porém a de leitura visual mostrou-se mais prática na leitura final e na interpretação dos resultados.

Palavras-chave: *Byrsonima* spp, *Alchornea* spp, atividade antimicrobiana, diluição em microplacas, diluição em tubos.

ABSTRACT

ABSTRACT

Brazil presents a great diversity of medicinal plants, whose use by people increases more and more. *Byrsonima* (Malpighiaceae) and *Alchornea* (Euphorbiaceae) are plants of Bioma-Cerrado of the state of São Paulo and present composites with great potential of biological activity, but, however, they are little studied. The antimicrobial activity is a stage of extreme importance in the biological characterization of natural products with pharmacological potential. Our objectives were to investigate the antibacterial activity of methanolic and chloroformic extracts of *Byrsonima* spp and *Alchornea* spp using the techniques of dilution in tubes and in microplates with spectrophotometric and visual readings using resazurin. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* were tested. In the microplate and tubes assays, the minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts were tested in concentrations between 1000µg/mL and 31.25µg/mL. It was also compared the effectiveness of the methodologies employed. Our study demonstrated greater antibacterial activity of methanolic extracts of both *Byrsonima* and *Alchornea*, standing out the data obtained for *B. crassa* (MeOH) and *B. basiloba* (MeOH), which presented accented antibacterial activity against the different tested microorganisms. The methodologies employed were efficient for this purpose and the microplate dilution assay is more advantageous, for the fact it uses smaller volumes, mainly for those vegetal extracts that normally are obtained in small amounts. Amongst the two methods of microdilution, the one that used spectrophotometric reading proved to be more sensitive, however, the visual reading procedure was shown to be more practical in the final reading and interpretation of the results.

Key-words: *Byrsonima* spp, *Alchornea* spp, antimicrobial activity, microplate dilution, tubes dilution.

INTRODUÇÃO

1– INTRODUÇÃO

As plantas são mundialmente empregadas na medicina popular e apesar do uso indiscriminado das mesmas, até hoje são escassos os estudos sobre as suas constituições químicas e atividades biológicas (MONTOURO et al., 2005).

A magnitude da biodiversidade brasileira não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de 2 milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (GUERRA e NODARI, 2004).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase inacreditável de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas. Apesar do aumento do estudo nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto a seu potencial medicinal (GUERRA e NODARI, 2004).

O uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e principalmente toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Isto acontece com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população. A identificação correta destas espécies, sua forma de uso, posologia e controle de qualidade também constituem questões a serem resolvidas (BALLVÉ et al., 1995). Os efeitos gerados pelos constituintes de uma planta no organismo vivo são verificados baseando-se nos conhecimentos populares de uso repetitivo e tradicional. Sabe-se que os vegetais e frutas possuem classes de agentes fitoquímicos com diversas ações terapêuticas, como efeitos

antioxidantes, antimutagênicos e até anticarcinogênico (KUSAMRAN et al., 1998). A realização de estudos etnobotânicos possibilita o resgate e a preservação dos conhecimentos populares, entretanto existe pouca informação quanto ao seu potencial de risco à saúde (SIMÕES, 1999).

Especialmente nas últimas décadas, inúmeros esforços têm sido dirigidos para conferir às plantas seu real papel e valor na terapia. O aumento do consumo dos fitoterápicos tem aumentado gradativamente no Brasil. Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais seriam a melhor fonte de obtenção de fármacos para a humanidade. A OMS estima que 80% das pessoas que vivem em países desenvolvidos fazem uso da medicina tradicional, sendo que as plantas medicinais constituem um dos principais componentes dos medicamentos, devendo, por isso, ser bem estudadas quanto a sua segurança e eficácia (SANTOS et al., 1995). Para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas no Brasil na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos, sem nenhuma evidência científica de sua eficácia. Existem casos em que as preparações utilizando extrato bruto são mais eficazes do que aquelas preparadas com qualquer de seus princípios ativos isoladamente (CORDEIRO, 2005).

A vasta gama de informações sobre o uso de centenas de plantas como “remédios” em todos os lugares do mundo, leva à necessidade de se desenvolver métodos que facilitem a enorme tarefa de avaliar cientificamente o valor terapêutico de espécies vegetais. Como a maior parte das plantas é ainda desconhecida do ponto de vista químico, bem como o saber tradicional associado à flora útil, predominantemente em países em desenvolvimento, a perda da biodiversidade e o acelerado processo de mudança cultural acrescentam um senso de urgência em garantir o registro desse saber, inclusive científico (ELISABETSKY, 2004).

Segundo a OMS, plantas medicinais são todas aquelas silvestres ou cultivadas, que se utilizam como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico, ou utilizada como fonte de fármacos e de seus precursores. Enquanto fitoterápicos são produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos componentes ativos são formados por partes aéreas ou subterrâneas de plantas, ou outro material vegetal, ou combinações destes, em estado bruto ou em formas de preparações vegetais (CORDEIRO, 2005). O desenvolvimento de um fitoterápico pode ser obtido com custos menores que um fármaco sintético (YUNES e CALIXTO, 2001).

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais que agem como antioxidantes e coenzimas, além de muitas outras (WILLIAMS, 2001).

Segundo LIMA (2001) as substâncias antimicrobianas ou antibióticas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas ou mais, com progressos sem limites dentro da terapêutica medicamentosa. O referido grupo de medicamentos condiciona, de forma efetiva, o efeito de espécies microbianas patogênicas e oportunistas responsáveis pelas mais variadas patologias que tanto provocaram e provocam a incapacidade prolongada ou óbito de seres humanos, sem restrição de faixa etária, situação financeira ou estado de saúde do indivíduo atingido. Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenir o desenvolvimento de microorganismos resistentes, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, entre outras. A atividade antimicrobiana é um item

relevante na caracterização de extratos vegetais, dada a importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem o homem (COWAN, 1999).

Segundo LIMA (2001) o conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Em amplo estudo sobre plantas medicinais fizeram uma avaliação concreta sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de espécies vegetais contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e espécies fúngicas. Quanto ao potencial antibiótico destacaram-se os resultados obtidos com óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, triterpenos, citral, mirceno, timol, xantanol, ácido caurêmico, entre outros que, em baixas concentrações, exercem inibição sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, micobactérias, leveduras e fungos filamentosos, confirmando a grande importância que tais produtos possuem como perspectivas para a produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos que possam ser usados na medicina para terapêutica de processos infecciosos. De modo geral, os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade através de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, inibição da síntese de ácidos nucleicos.

Vários métodos são utilizados na determinação da atividade antimicrobiana “in vitro”, sendo aplicados em estudos piloto na triagem de novas substâncias ativas. A técnica de difusão em ágar e métodos de diluição em meio líquido são comumente utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana de compostos químicos, entretanto, consomem quantidades consideráveis de substância teste. Atualmente, técnicas espectrofotométricas de diluição, desenvolvidas em microplacas, possibilitam a utilização de volumes reduzidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de produtos químicos que são

de grande valia quando se trata de produtos naturais, especialmente os de origem vegetal que são extraídos em pequenas quantidades. Estas técnicas permitem a análise de vários compostos e de uma ampla variedade de espécies bacterianas concomitantemente, utilizando pequenos volumes de extratos, sendo ainda de baixo custo e apresentando resultados reprodutíveis (CHAND et al., 1994; COWAN, 1999; DEVIENNE e RADDI, 2002).

Uma modificação proposta por FRANZBLAU et al., (1998), padronizada para *Mycobacterium* sp em microplacas utilizando o corante Alamar Blue como revelador, possibilita a leitura visual ao invés da leitura espectrofotométrica. Como alternativa, o Alamar Blue tem sido substituído pela resazurina (sal sódico), uma vez que a resazurina é o princípio ativo do Alamar Blue. Para tal o crescimento dos microrganismos é revelado, pela demonstração da redução do meio com a resazurina que passa de azul para róseo, permitindo uma análise visual do resultado (MONTEJANO et al., 2005 e PALOMINO et al., 2002).

Diversos estudos botânicos, químicos, farmacológicos e ecológicos vêm sendo realizados e cada vez mais demonstram e justificam a importância e o potencial da flora brasileira. A constante necessidade de se descobrir novas drogas de origem natural leva a um aumento no interesse pelos estudos sobre princípios ativos isolados de plantas com atividade biológica. O Projeto temático – Programa Biota/Fapesp “Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica em plantas superiores” visa contribuir com a caracterização do Bioma-Cerrado do Estado de São Paulo. O grupo de pesquisa é constituído por químicos, farmacêuticos, farmacólogos e botânicos que de forma integrada trabalham para a caracterização bem como na preservação do Bioma-Cerrado do Estado.

REVISÃO DE LITERATURA

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Espécies vegetais

2.1.1 - *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl.

A espécie *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl. (Figura 1), é pertencente à família Euphorbiaceae sendo popularmente conhecida como tapiá, tanheiro-de-folha-redonda, tanheiro, maria-mole, iricurana, boleiro, araribá, bugé, tamanqueiro, tapiá-guaçú, tapiá-mirim, caixeta, canela-raposa (LORENZI, 2000a), amor seco (COGENERO et al., 2003). Apresenta sinonímia científica de *Alchornea iricurana* Casar. Apresenta-se como uma planta dióica de 10-20m de altura, com tronco de 50-70cm de diâmetro. Folhas simples, recurvadas nos bordos, de 8-16 cm de comprimento por 6-12 cm de largura. É uma árvore, de caule tortuoso, que ocorre em florestas ciliares do Brasil (COGENERO et al., 2003). Ocorre nos Estados do Rio de Janeiro, de Minas Gerais, até o Estado do Rio Grande do Sul, principalmente na floresta pluvial da encosta atlântica e em menor freqüência na floresta latifoliada da bacia do Rio Paraná. Planta perenifólia, heliófita, seletiva, higrófito, pioneira, característica de beira de rios e planícies aluviais da floresta pluvial atlântica. É particularmente freqüente nas formações secundárias como capoeiras e capoeirões. Ocorre também na mata primária, principalmente nas beiradas e clareiras. Floresce pelo menos duas vezes ao ano, durante os meses de maio a junho e outubro a novembro. Os frutos, por conseguinte amadurecem em setembro até meados de outubro e dezembro a janeiro (LORENZI, 2000a).



Figura 1: *Alchornea glandulosa* Poepp. & Endl.

Fonte: LORENZI, 2000a.

2.1.2 – *Alchornea triplinervia* (Spreng.) M. Arg.

A espécie *Alchornea triplinervia* (Spreng.) M. Arg. (Figura 2), pertencente à família Euphorbiaceae e é popularmente conhecida como tanheiro, tapiá, boleiro, tanaeiro, tapiá-guaçú, tapiá-guaçú-branco, tapiá-mirim, tapiá-vermelho, caixeta, jangada, pau-jangada, algodoeiro, tapiaeiro, boleira, canela-raposa, tamanqueiro, pau-de-tamanco, pau-do-tanho. Possui sinonímia científica de *Antidesma tripinervium* Spreng., *Alchornea nemoralis* Mart., e *Alchornea janeirensis* Casar. Planta dióica de 15 a 30m de altura, com tronco de 40 a 100cm de diâmetro. Folhas subcoriáceas, de 3 a 6 cm de comprimento levemente pubescentes na face inferior sustentadas por pecíolo de 2 a 4cm de comprimento. Ocorre da Bahia ao Rio Grande do Sul, na floresta pluvial da encosta atlântica (LORENZI, 2000a; BRACA et al., 2002). Menos comuns nas demais florestas pluviais do interior, desde o nível do mar até 1000m de altitude. Planta perenifólia, heliófita, pioneira e praticamente indiferente às condições físicas do solo. É característica da floresta pluvial atlântica que sofreu interferência do homem, sendo pouco comum nas florestas clímaxes e abundante nas capoeiras. Produz anualmente moderada quantidade de sementes, amplamente disseminadas por pássaros. Floresce anualmente durante os meses de outubro e novembro (LORENZI, 2000a).



Figura 2: *Alchornea triplinervia* (Spreng.) M. Arg.

Fonte: LORENZI, 2000a.

2.1.3 – *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK)

A espécie *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK) (Figura 3), é pertencente à família Malpighiaceae, sendo popularmente conhecida como murici-vermelho ou murici cascudo (SILVA et al., 2001 e LOPES et al., 2001), e algumas partes integrantes são utilizados como sucos, geléias e licores no Norte e Nordeste do Brasil. Este gênero produz principalmente sulfonoglicolipídeos, esteróides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos e proanthocyanidinas. As folhas e cascas da *Byrsonima crassa* são utilizadas na medicina popular brasileira no tratamento de gastrite, úlcera péptica, diarreia e até mesmo em problemas cutâneos (SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a). Investigações fitoquímicas preliminares identificaram flavonóides com atividade antioxidante em extratos polares das folhas destas espécies. Visto que a atividade antioxidante está relacionada com a ação antiúlcera dos extratos das plantas, ensaios biológicos com componentes puros podem contribuir para melhor entendimento dos processos de cicatrização (SANNOMIYA, et al., 2004).



Figura 3: *Byrsonima crassa* Niedenzu

Imagem obtida do site: www.google.com

Imagem obtida por scaneamento da planta
Autor da foto: Dr^a Miriam Sannomiya

2.1.4 - *Byrsonima intermedia* A. Juss.

A espécie *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Figura 4), é pertencente à família Malpighiaceae. É conhecida como muricizeiro, murici, murici-do-campo, baga-de-tucano (LORENZI et al., 2002), cangiqueira (LORENZI, 2000b). Planta perene, arbustiva, muito ramificada, nativa dos cerrados do Brasil. Propaga-se apenas por sementes (LORENZI, 2000b). É um arbusto de 1 a 4m de altura, muito ramificado de ramos ascendentes e eretos, de base lenhosa com grande xilopódio. É encontrada principalmente em terrenos secos e solos arenosos. As folhas são coriáceas, de 3 a 6cm de comprimento. As flores são amarelas, com glândulas visíveis no cálice, reunidas em racemos terminais de 5 a 10cm de comprimento. Os frutos são drupas globosas, de cor amarela, com cerca de 1cm de diâmetro, contendo uma única semente. Os frutos, de sabor agridoce, são consumidos no meio rural. Todas as partes desta planta são empregadas pelas populações para a resolução de várias moléstias. O infuso de suas folhas é empregado contra diarreia, infecções intestinais e como protetor da mucosa intestinal. Já o infuso de suas raízes é indicado para feridas crônicas (chagas), afecções da boca e da garganta, por aplicação no local afetado com algodão embebido. É também indicado para corrimento vaginal em banho de assento 2 a 3 vezes ao dia (LORENZI et al., 2002). É uma planta comum nos cerrados brasileiros e se perpetua nestas áreas após o seu desbravamento e posterior transformação em pastagens. Pode ser encontrada como indesejável também em beira de estradas, carreadores e terrenos baldios. A casca dos ramos dessa planta é bastante espessa e rica em taninos, podendo ser utilizada para curtir couro em curtumes (LORENZI, 2000b).



Figura 4: *Byrsonima intermedia* A. Juss.

Fonte: LORENZI, 2002.

2.1.5 – *Byrsonima basiloba* Juss.

A espécie *B. basiloba* Juss. (Figura 5), é pertencente à família Malpighiaceae, sendo conhecida popularmente como murici e murici-do-campo. Mede cerca de 6 a 10m, com tronco cilíndrico de 30 a 40cm de diâmetro. Folhas simples, coriáceas, glabras na face superior e denso-tomentosas e prateadas na inferior, de 12 a 18cm de comprimento por 3 a 7cm de largura. Encontrada nos cerrados do Brasil Central. A madeira é indicada para uso interno em construção civil e os frutos são avidamente consumidos por várias espécies da fauna (LORENZI, 2000a). Seus frutos são maiores do que das outras espécies do gênero, apresentam epicarpo fino e em função do mesocarpo rico em vitamina C, são utilizados na alimentação humana, in natura ou na forma de refrescos, sorvetes e compotas (PEREIRA e SILVEIRA, 2003). A árvore de pequeno porte e copa estreita é útil para arborização urbana, principalmente para ruas estreitas. Pode também ser empregada em plantios destinados à recomposição de áreas degradadas de preservação permanente. Planta decídua, heliófita, seletiva xerófita, característica de terrenos altos do cerrado. Apresenta dispersão ampla, porém irregular e descontínua, ocorrendo em baixa frequência. É encontrada tanto em formações primárias como secundárias. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis, amplamente disseminadas pela fauna. Floresce quase o ano inteiro, porém predominando nos meses de verão. A maturação dos frutos, em consequência, acontece também na maioria dos meses do ano, porém com maior intensidade em abril a junho (LORENZI, 2000a). Análises cromatográficas dos extratos polares de *B. basiloba* revelaram a presença de catequinas e flavonóides (FIGUEIREDO et al., 2005).



Figura 5: *Byrsonima basiloba* Juss.

Fonte: LORENZI, 2000a.

2.2 – Atividade antimicrobiana

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta de espécies microbianas, uma vez que Hipócrates (460-337 a.C.) recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Documentos datados de 2.500 a 3.000 anos atrás, mostram que alguns povos como os chineses e indianos, ainda primitivos, utilizava mofo, papa de soja e produtos correlatos para o tratamento de lesões infectadas e processos inflamatórios (SANCHES, 2004).

Nas antigas civilizações, as doenças infecciosas eram associadas com ocorrências naturais tais como o aparecimento de um cometa ou um evento místico e que poderiam desagradar uma divindade, e as regras para evitar essas doenças eram a higiene e quarentena porque se acreditava que a transmissão da doença era apenas por contato (SARDI, 2004).

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

As plantas são possuidoras de várias vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos, incluindo alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, terpenos, poliacetilenos, óleos, que por vezes são específicos a determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (LIMA, 2001).

Os extratos etanólicos de *Apis mellifera* tem sido estudado por apresentarem várias atividades biológicas, tais como atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, um excelente anestésico local, e estimulador do sistema imunológico. Acredita-se que as substâncias químicas isoladas e identificadas das amostras de própolis, como flavonóides, ácidos aromáticos, ácidos terpênicos, compostos fenólicos estão relacionadas com todas estas atividades biológicas (SILICI et al., 2005).

Várias espécies de *Byrsonimas* têm sido estudadas e avaliadas quanto à atividade antimicrobiana.

Testes de atividade antimicrobiana realizada “in vitro” demonstraram que o extrato de *B. verbascifolia* foi capaz de inibir o crescimento de *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (MARTÍNEZ-VÁSQUEZ et al., 1999; LOPES et al., 2001). O extrato *B. crassifolia* apresentou atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *S. epiderminis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Micrococcus luteus* (MARTINÉZ-VÁSQUEZ, et al., 1999). O extrato de *B. crassa* apresentou uma significativa atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus epiderminis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp.* *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* (SANNOMIYA et al., 2005a).

COGENERO et al. (2003) demonstraram atividade antimicrobiana moderada de *A. glandulosa* para o extrato bruto metanólico frente aos microorganismos *S. aureus* (CIM=250 µg/mL) e *Cândida albicans* (CIM=125µg/mL) e significativa para fração alcaloidal frente a *Bacillus subtilis* (CIM=62,5µg/mL) e *Cândida tropicalis* (CIM=31,2 µg/mL) utilizando o método de microdiluição em caldo Mueller-Hinton.

È possível isolar das plantas uma variedade de compostos químicos com propriedades antimicrobianas e antifúngicas e este fato, nos últimos anos vêm despertando

um enorme interesse nos cientistas em conseguir produzir novas drogas antimicrobianas mais seguras e potentes e totalmente eficazes contra patógenos resistentes (AHMAD e BEG, 2001).

3.2.1 - Microrganismos

a) *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* compreende bacilos Gram negativos, sendo a *Escherichia coli* a espécie de maior importância prática. *Escherichia coli* é uma bactéria facultativa, sendo considerada um dos habitantes mais comuns do trato intestinal (TORTORA et al., 2000). A espécie *E. coli* é constituída por uma variedade relativamente grande de cepas patogênicas. De fato, é isto o que acontece, uma vez que a *E. coli* pode causar infecções urinárias, septicemias, meningites e outros tipos de infecção. Provavelmente nenhuma outra espécie bacteriana é tão versátil em sua patogenicidade como a *E. coli*. Com relação às infecções intestinais, pelo menos seis categorias de *Escherichia coli* são conhecidas: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), enterotoxigênica (ETEC), enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAaggEC) e que adere difusamente (DAEC). Estas raramente causam infecção extra-intestinal, que é causada por *E. coli* encontrada normalmente no intestino e que pode se localizar em qualquer órgão ou tecido do corpo humano. Entretanto três grupos de infecções são mais frequentes: infecções urinárias, meningite do recém-nascido e bacteremia (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

b) *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, que tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Os estafilococos são amplamente distribuídos na natureza e

fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005). Uma das espécies de maior importância entre os estafilococos é o *Staphylococcus aureus*, denominado assim pela pigmentação amarela de suas colônias. Crescem comparativamente bem sob condições de alta pressão osmótica e pouca umidade o que parcialmente explica porque podem crescer e sobreviver nas secreções nasais, ambiente externo e sobre a pele (TORTORA et al., 2000; SARDI, 2004).

S. aureus representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar. Essa espécie pode ser encontrada em várias partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (TRABULSI e ALTERTHUM, 2005; SARDI, 2004; COWAN, 1999; MAHADY, 2005).

S. aureus produz muitas toxinas que contribuem para a patogenicidade da espécie, aumentando sua habilidade de invadir o corpo e danificar tecidos. A infecção de cortes cirúrgicos por *S. aureus* é um problema comum em hospitais; e a habilidade de desenvolver resistência rapidamente aos antibióticos como penicilina contribui para seu perigo em ambientes hospitalares. *S. aureus* produz a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico, uma infecção grave caracterizada por febre alta e vômitos, algumas vezes ocasionando a morte (TORTORA et al., 2000).

c) *Yersinia enterocolitica*

O gênero *Yersinia* pertence à família Enterobacteriaceae e apresenta-se na forma de bacilos Gram-negativos, habitante do intestino de muitos animais domésticos, e frequentemente transmitidos na carne e no leite contaminados. A *Y. enterocolitica* é uma das espécies que pode causar doenças tanto no homem quanto nos animais. Este microrganismo apresenta a capacidade de crescer em temperaturas de refrigerador, de 4°C à 10°C (TORTORA et al., 2000). As manifestações clínicas causadas por *Y. enterocolitica*

são na maioria das vezes entéricas, com dores abdominais e diarreia, que podem variar em sua severidade, desde poucas evacuações até uma enterocolite com lesões ulcerativas envolvendo o trato gastrointestinal. Este patógeno causa gastroenterite, onde apresenta diarreia, febre, cefaléia e dor abdominal. Podem ainda causar infecções extra-intestinais tais como: abscessos, conjuntivite, osteomielite, artrite e eritema nodoso. Esta espécie é um microrganismo invasor e toxigênico (BAUAB & FALCÃO, 1991; TORTORA et al., 2000).

d) *Aeromonas hydrophila*

O gênero *Aeromonas* compreende bacilos Gram-negativos, facultativos, portadores das enzimas catalase e oxidase, fermentadores da glicose e de outros carboidratos e geralmente se movimentam através de um flagelo polar. Esses microrganismos compõem a família Aeromonadaceae. São comumente encontrados em águas de rios e lagos, em suprimentos de água potável (mesmo clorada), em tanques de peixes, nos solos, em verduras, leite e derivados e alimentos à base de peixe. As cobras, os peixes, os jacarés, as rãs e alguns pássaros são os vertebrados mais comumente infectados ou portadores de espécies de *Aeromonas* (BAUAB et al., 2003; TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

Aeromonas spp geralmente não são consideradas como microbiota normal em humanos e, muito do interesse científico por esse grupo de microrganismos é devido à associação destes, com infecções intestinais e extra-intestinais em humanos. As espécies de *Aeromonas* podem ser responsáveis por bacteremias e septicemias. O trato gastrointestinal parece ser a principal fonte de infecção podendo causar infecções cutâneas, meningite, pneumonia, peritonite, infecções oculares, infecções do trato urinário entre outras, sendo freqüentemente isoladas também a partir da pele e tecidos (BAUAB et al., 2003; TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

1. Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos (MeOH), clorofórmicos (CHCl₃) e hidrometanólicos (MeOH/H₂O) de *Byrsonima* spp e *Alchornea* spp.
2. Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais empregando a técnica de diluição em microplacas.
 - 2.1- Realizada com leitura espectrofotométrica.
 - 2.2 – Realizada com leitura visual utilizando resazurina como revelador.
 - 2.3 – Comparação de ambas as técnicas.
3. Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais pela técnica de diluição em tubos.
4. Comparar a efetividade dos métodos de diluição em microplacas com as de diluição em tubos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM).
5. Contribuir com a avaliação do potencial biológico do Bioma-Cerrado do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1– Extratos vegetais

4.1.1 – Obtenção e procedência

Foram utilizados extratos brutos metanólicos (MeOH) e clorofórmicos (CHCl₃) de folhas de *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia*, *Byrsonima crassa*, *Byrsonima basiloba* e *Byrsonima intermedia* sendo também utilizado o extrato hidrometanólico (MeOH/H₂O) da última espécie citada, obtidos no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química – Unesp – Araraquara, coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas.

As folhas da *Alchornea glandulosa* foram coletadas na ESALQ-USP, município de Piracicaba, São Paulo, por Tamara Regina Calvo e pelo Prof. Jorge Tamashiro (IB-UNICAMP-SP). A identificação também foi realizada pelo Prof. Jorge Tamashiro. Uma exsicata de número 132828 foi depositada no herbário da Universidade de Campinas - UNICAMP-SP.

As folhas de *Alchornea triplinervia* foram coletadas no Horto Florestal-UNESP, município de Botucatu, São Paulo, pelos pós-graduandos Tamara Regina Calvo e Luís Fernando Rolim de Almeida (IB-UNESP-Botucatu-SP). Amostras das plantas foram identificadas pelo Prof. Jorge Tamashiro (IB-UNICAMP-SP). Uma exsicata de número 14873-BOTU foi depositada no Herbário Irina Delanova de Gemtchujnicov -UNESP-BOTUCATU.

As folhas de *Byrsonima crassa* foram coletados na estrada do Brejinho de Nazaré município de Porto Nacional, estado de Tocantins pela prof^a. Dr^a. Clélia Akiko Hiruma-Lima (IBB-UNESP-Botucatu). A identificação foi feita pelo Dr. Eduardo Ribeiro dos

Santos e catalogadas com o número de exsicata 3377. Foram depositadas no herbário da Universidade do Tocantins.

As folhas de *B. intermedia* foram coletadas por Luís Fernando Rolim de Almeida (IBB-UNESP-Botucatu, SP) no município de Pratânia-SP e identificadas no Instituto Biociências de Botucatu. Uma exsicata de número 24164 encontra-se depositada no Herbário Irina Delanova De Gemtchujnicov - UNESP-BOTUCATU.

As folhas de *B. basiloba* foram coletadas por Luís Fernando Rolim de Almeida (IBB-UNESP-Botucatu, SP) no município de Pratânia-SP e identificadas por Campos, C.J no Instituto Biociências -Botucatu. Exsicata de número 24163 encontra-se depositada no Herbário Irina Delanova De Gemtchujnicov - UNESP-BOTUCATU.

4.1.2 – Cinética de leitura espectrofotométrica

Observando-se os extratos vegetais a serem testados (*Byrsonima crassa*, *Byrsonima intermedia*, *Byrsonima basiloba*, *Alchornea glandulosa*, e *Alchornea triplinervia*), foi verificado que todos apresentavam coloração verde acentuada. Então, foi necessário avaliar a absorção de cada amostra em espectrofotômetro num intervalo de leitura de 400 a 655nm, para a determinação do comprimento de onda possivelmente absorvível (interferente).

Realizou-se um espectro de varredura destes extratos na concentração de 1000µg/mL, utilizando-se como branco a água Milli-Q. Observou-se também a absorbância do meio de cultura (Caldo Mueller-Hinton), por apresentar coloração amarelada.

Estas análises permitiram avaliar o melhor comprimento de onda que deveria ser utilizado nas leituras de absorbância para a determinação da CIM dos extratos, sem a interferência da cor dos extratos vegetais e do meio de cultura, como resumido na tabela 1.

4.2 – Amostras bacterianas

Foram utilizadas as cepas de referência *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; a cepa de *Yersinia enterocolitica* O8 (Ye 2707) sabidamente patogênica pertencente ao Laboratório de Microbiologia da FCF (BAUAB & FALCÃO, 1991) e a cepa de *Aeromonas hydrophila* O34 (Ae 14) isolada de fezes diarréicas humanas, portadora de diversos marcadores de virulência e também pertencente ao Laboratório de Microbiologia da FCF (BAUAB et al., 2003).

4.2.1 - Determinação da curva de crescimento bacteriano

As cepas bacterianas foram repicadas do estoque para tubos contendo meio Tryptic Soy Broth (TSB) e incubadas durante 24 horas a 37°C. Uma alíquota dessa cultura foi transferida pra tubos contendo solução salina 0,9% até obter-se turvação equivalente ao valor 0,5 da escala de McFarland. Com auxílio de alça de Drigalsky, 0,1mL dessa mistura foi plaqueada em Tryptic Soy Agar (TSA) e incubada a 37°C por 24h. Outra alíquota da mistura foi submetida à leitura em espectrofotômetro a 600nm e do restante, 0,1mL foi diluído em série em 10 tubos contendo cada um 1mL de tampão fosfato (PBS). De cada tubo contendo a diluição da suspensão de microorganismos, 0,1mL foi semeado em placa contendo TSA com auxílio de alça de Drigalsky e posteriormente foram incubadas a 37°C. Após incubação de 24 horas as placas contendo o crescimento bacteriano foram submetidas à contagem quanto ao número de colônias formadas. Com o número de colônias obtido e corrigindo-se a respectiva diluição de cada tubo, foi determinado o número de células contidas no tubo com a qual foi realizada a leitura espectrofotométrica. Assim, determinou-se um número de bactérias/mL de meio de cultura com uma respectiva leitura da absorbância a 600nm.

4.3- Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica (DEVIENNE, 2000 ; ELLOF, 1998; MIGLIATO, 2005; GABRIELSON, 2002).

4.3.1 – Padronização da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi padronizada adicionando-se uma cultura de 24h, em um tubo contendo solução salina estéril até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) segundo descrito por Sanches (2004). A seguir foi realizada a leitura espectrofotométrica a 600nm (item 4.3) e a absorbância de 0,10 a 0,15 corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1/10 em tubo tipo eppendorf, obtendo-se uma suspensão de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL.

4.3.2 - Preparo das soluções contendo substâncias de referência para o controle negativo (SANCHES, 2004)

A penicilina foi utilizada como controle para *Staphylococcus aureus*. Preparou-se uma solução de 5mg/mL (solução A: 1mg em 200 μ L de água destilada), e em seguida esta solução foi diluída 1/100 em água destilada (solução B: 0,05mg/mL), e por fim a solução B foi diluída 1/10 em caldo Mueller-Hinton (CMH), obtendo-se uma concentração final de 5 μ g/mL.

A solução de tetraciclina foi utilizada para controle de *Escherichia coli*. Foi preparada através da diluição de 5mg da respectiva droga em 200 μ L de água destilada (solução A). Esta por sua vez, foi diluída 1/100 em água destilada (solução B), e a solução B foi diluída em 1/10 em CMH, obtendo uma concentração final de 5 μ g/mL.

A gentamicina foi utilizada para controle de *A. hydrophila* e *Y. enterocolitica*. Esta solução foi preparada através da diluição de 10µL da respectiva droga em 2000µL de água destilada (solução A). Retirou-se 100µL da solução A, e adicionou-se em 200µL de CMH (solução B), obtendo uma concentração final de 25µg/mL.

4.3.3 – Método de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica

Os extratos vegetais foram preparados em solução-estoque de 1000µg/mL em CMH e adicionou-se 5% de DMSO. Aos orifícios das microplacas (96 orifícios) das linhas de A a G das colunas de 1 a 12 foram adicionados 100µL de Caldo Mueller–Hinton (CMH). A seguir, os orifícios da linha B a G da coluna 1 adicionou-se 100µL da solução-estoque dos extratos vegetais. Após a homogeneização, 100µL das misturas contidas nos orifícios da coluna 1 de B a G foram transferidos para a coluna 2 de B a G e assim sucessivamente até a coluna 5, que após homogeneização foram retirados e desprezados 100µL. Dessa maneira obteve-se um volume final de 100µL nesses orifícios da microplaca com as concentrações finais dos extratos vegetais de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 µg/mL (orifícios controle dos extratos). Aos orifícios da coluna 7 da linha de B a G foram adicionados 100µL das soluções-estoque dos extratos vegetais, sendo a homogeneização idêntica aos da coluna 1 da linha B a G. Nos orifícios da linha H de 1 a 6 foram adicionados 100µL da solução do agente antimicrobiano preparado segundo o item 4.3.1 (controle negativo), e aos orifícios da linha H de 7 a 12 adicionou-se 100µL de CMH (controle positivo).

Subseqüentemente foi adicionado 10µL da suspensão bacteriana de 10^7 UFC/mL (item 4.3.2) em cada orifício, exceto nos orifícios controle do extrato (linha B a G, coluna 1 a 5) e nos orifícios da linha A de 1 a 12 (branco). Uma das microplacas foi submetida à leitura

no leitor de microplacas a 595 nm. A outra foi incubada à 37°C por 24 horas. Após este período de incubação, essa segunda microplaca foi submetida à leitura no leitor de microplacas a 595nm. A inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada determinada a CIM a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas. Cada extrato foi testado em triplicata na mesma microplaca e cada teste realizado em 2 microplacas.

A Figura 6 esquematiza o preparo das microplacas para a realização do teste de atividade antibacteriana, e a figura 7 demonstram o leitor de microplacas Elisa utilizado na realização do teste.

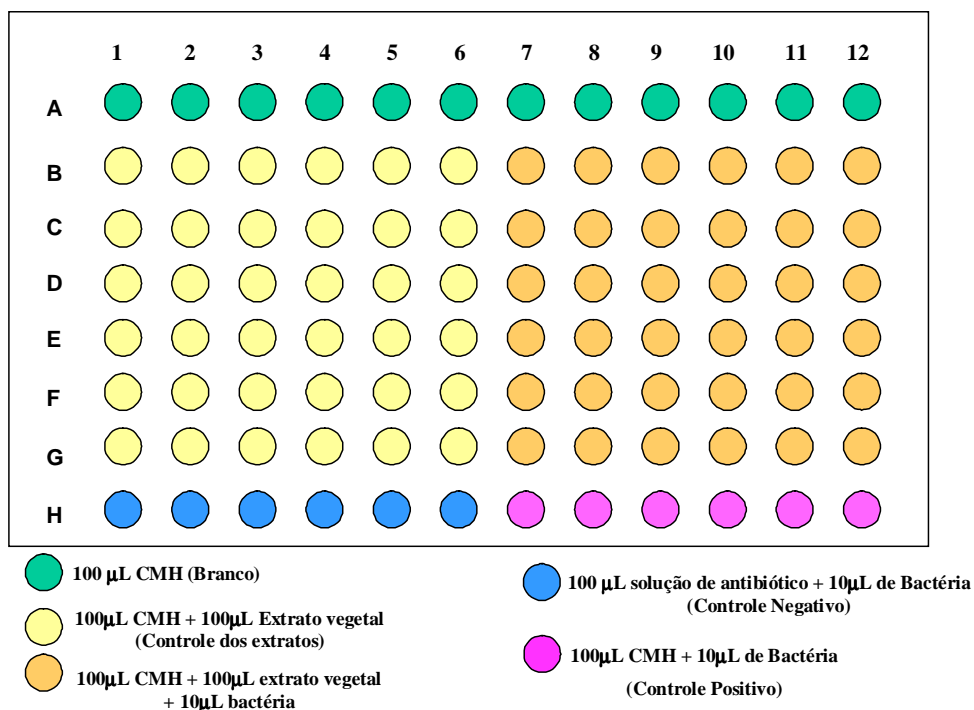


Figura 6 - Configuração esquemática da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM utilizando leitura espectrofotométrica.



Figura 7: Leitor de microplacas

4.4 - Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima pela técnica em microplaca utilizando resazurina como revelador (COLLINS e FRANZBLAU, 1997; PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO, 2005; GABRIELSON, 2002).

A suspensão bacteriana foi utilizada segundo item 4.3.1 e as soluções para o controle negativo segundo item 4.3.2.

4.4.1 – Método de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador

Segundo PALOMINO et al. (2002) e MONTEJANO, (2005) a resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade e contaminação bacteriana e para testar a atividade antimicrobiana.

Os extratos vegetais foram preparados em solução-estoque de 4000 μ g/mL em CMH e adicionou-se 5% de DMSO.

Em uma microplaca estéril de 96 orifícios, foi depositado 200 μ L de água destilada estéril nos orifícios de A a H das colunas 1 e 12, como indicado na Figura 8, para evitar a evaporação durante a incubação na estufa.

A seguir, os orifícios de A a H da coluna 11 receberam 100 μ L de CMH, os da coluna 10 de A a D 200 μ L do meio, os da linha A colunas de 2 a 9 receberam 150 μ L e as demais linhas, B a H de 2 a 9 receberam 100 μ L.

Os orifícios da linha A de 2 a 9 e os da linha B de 2 a 9 receberam respectivamente 50 e 100 μ L das soluções-estoque dos extratos vegetais. Após a homogeneização, 100 μ L das misturas contidas nos orifícios da linha B de 2 a 9 foram transferidas para a linha C de 2 a 9 e assim sucessivamente até a linha H de 2 a 9, que após homogeneização foram retirados e desprezados 100 μ L. Por último, adicionou-se em todos os orifícios da microplaca, com exceção da linha A de 2 a 9 e da coluna 10 de A a D, 100 μ L da suspensão bacteriana preparada como apresentado no item 4.3.1. Dessa maneira obteve-se um volume final de 200 μ L em cada orifício com as concentrações finais dos extratos vegetais de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 μ g/mL. Nos orifícios da coluna 11 de A a D foram adicionados 100 μ L da solução do agente antimicrobiano preparado segundo o item 4.3.2 (controle negativo), e aos orifícios da coluna 11 de E a H adicionou-se 100 μ L de CMH (controle positivo).

A solução de resazurina foi preparada na concentração de 0,0005g/5mL de água destilada estéril. Adicionou-se nos orifícios A-11 e E-11, 30 μ L de Resazurina (V/V), e procedeu-se a incubação da microplaca a 37°C até o desenvolvimento de cor rósea no orifício E-11. Foi então adicionado 30 μ L de Resazurina (V/V) nos demais orifícios, sendo

a microplaca reincubada a 37°C de 2 a 8h, mantendo-as até 24h para a confirmação dos resultados. Após esta incubação, foi realizada a leitura visual final.

A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração de extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas, ou seja, a menor concentração de extrato vegetal capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa.

Cada extrato foi testado em duplicata e o mesmo teste foi repetido três vezes em semanas consecutivas.

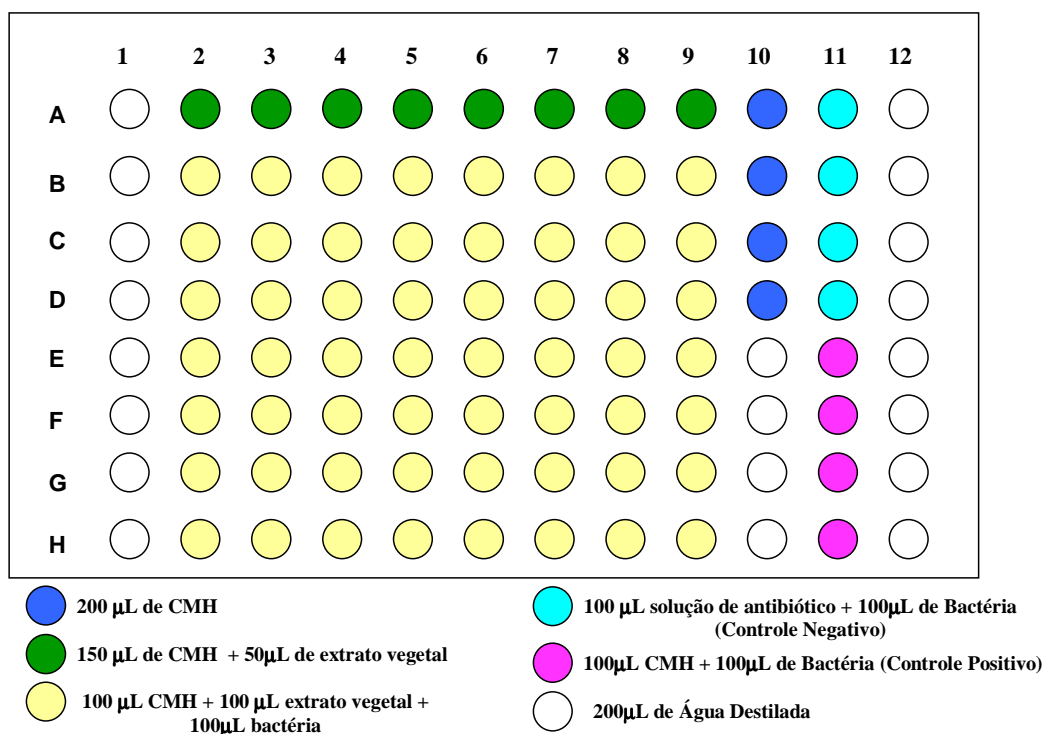


Figura 8 - Configuração esquemática da microplaca na determinação da atividade antibacteriana e da CIM utilizando resazurina como revelador.

4.5 - Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima pela técnica de diluições em tubos (CHAND et al, 1994; MOREIRA et al., 2003; NCCLS M7–A6, 2003)

A suspensão bacteriana foi utilizada segundo item 4.3.1 e as soluções para o controle negativo segundo item 4.3.2.

4.5.1 – Método de diluição em tubos

Os extratos vegetais foram preparados em solução-estoque de 2000µg/mL em água destilada estéril e quando necessário adicionou-se 5% de DMSO. Foram preparadas séries de 7 tubos contendo 1mL de caldo Muller-Hinton (MHB). Ao 1º tubo adicionou-se 1mL da solução-estoque do extrato vegetal. Após a homogeneização, 1mL a mistura contida no 1º tubo foi transferida para o 2º tubo e assim sucessivamente até o 6º tubo que após homogeneização foi retirado e desprezado 1mL. Dessa maneira obtivemos um volume final de 1mL em cada tubo com as concentrações finais dos extratos vegetais a 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25µg/mL. O 7º tubo representou o controle do crescimento bacteriano e o 8º tubo o controle de inibição de crescimento bacteriano. Subseqüentemente foi adicionado em cada tubo 100µL da suspensão bacteriana de 10⁷ UFC/mL padronizados segundo item 4.3.1.

Os tubos foram incubados em estufa a 36°C±1°C, por 24 horas e posteriormente observados visualmente. Os que se apresentaram turvos, indicaram crescimento bacteriano e os límpidos, inibição do crescimento. Para a determinação da CIM, bem como a turbidez de alguns extratos antes mesmo da adição da suspensão bacteriana, uma alçada de cada tubo foi semeada em forma de estrias em placas contendo Muller-Hinton Agar (MHA). Estas placas foram incubadas 36°C±1°C por 24 horas e após a incubação foram observadas

quanto à ocorrência ou não de crescimento bacteriano, confirmando assim a ação bactericida ou bacteriostática dos extratos vegetais. Cada extrato foi testado em triplicata.

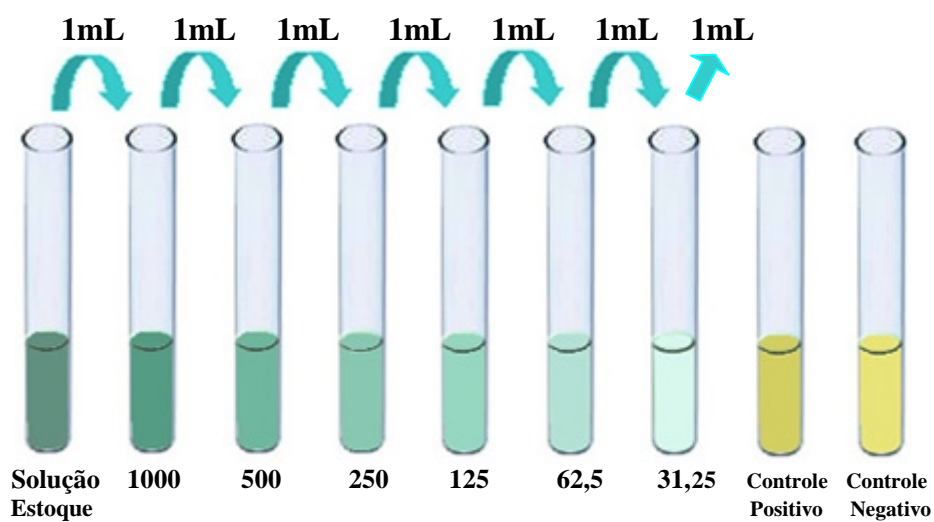


Figura 9: Esquema das diluições seriadas dos extratos. As diferentes concentrações estão expressas em $\mu\text{g/mL}$.

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

5.1 – Cinética de leitura espectrofotométrica

Foi realizado um espectro de varredura nos comprimentos de onda dentro do visível, para avaliar a absorção dos extratos vegetais e do caldo Mueller–Hinton.

Pela cinética de leitura espectrofotométrica foi possível observar que o Caldo Mueller-Hinton não apresentou absorção em nenhum dos comprimentos de onda testados no visível, ou seja, não interfere na leitura das amostras. Já os extratos vegetais apresentaram absorção em todos os comprimentos de onda, devido a sua coloração acentuada, com exceção do extrato de *Byrsonima crassa* (CHCl₃).

A partir destes dados houve a necessidade de estabelecer novos critérios para a análise dos resultados obtidos no leitor de microplacas. O comprimento de onda escolhido para a determinação da CIM foi o de 595nm como segue na tabela 1.

Tabela 1: Absorbância dos extratos vegetais na concentração de 1000µg/mL e do meio de cultura (CMH).

AMOSTRAS	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)	ABSORBÂNCIA
<i>Byrsonima crassa</i> (MEOH)	595	1,290
<i>Byrsonima crassa</i> (CHCl ₃)	595	0,025
<i>Byrsonima basiloba</i> (MEOH)	595	0,625
<i>Byrsonima basiloba</i> (CHCl ₃)	595	0,873
<i>Byrsonima intermedia</i> (MEOH/H ₂ O)	595	0,822
<i>Byrsonima intermedia</i> (MEOH)	595	0,858
<i>Byrsonima intermedia</i> (CHCl ₃)	595	1,319
<i>Alchornea triplinervia</i> (MEOH)	595	0,209
<i>Alchornea triplinervia</i> (CHCl ₃)	595	0,648
<i>Alchornea glandulosa</i> (MEOH)	595	0,487
<i>Alchornea glandulosa</i> (CHCl ₃)	595	0,352
Caldo Mueller-Hinton (CMH)	595	0,026

5.2. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

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

A atividade antibacteriana e a CIM dos extratos vegetais testados podem ser observados através da leitura espectrofotométrica no comprimento de onda a 495nm. O valor da CIM preconizado pelo NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory

Standards) frente a bactérias de crescimento aeróbico é descrito como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade.

Os valores das CIMs estão apresentados nas figuras 10 a 14 no período de incubação de 24hs, e revelam os perfis de susceptibilidade ou resistência aos extratos vegetais testados frente às cepas de referência *E. coli* (ATCC 10536), *S aureus* (ATCC 6538), *Y. enterocolitica* O8 (Ye 2707) e *A. hydrophila* O34 (Ae 14).

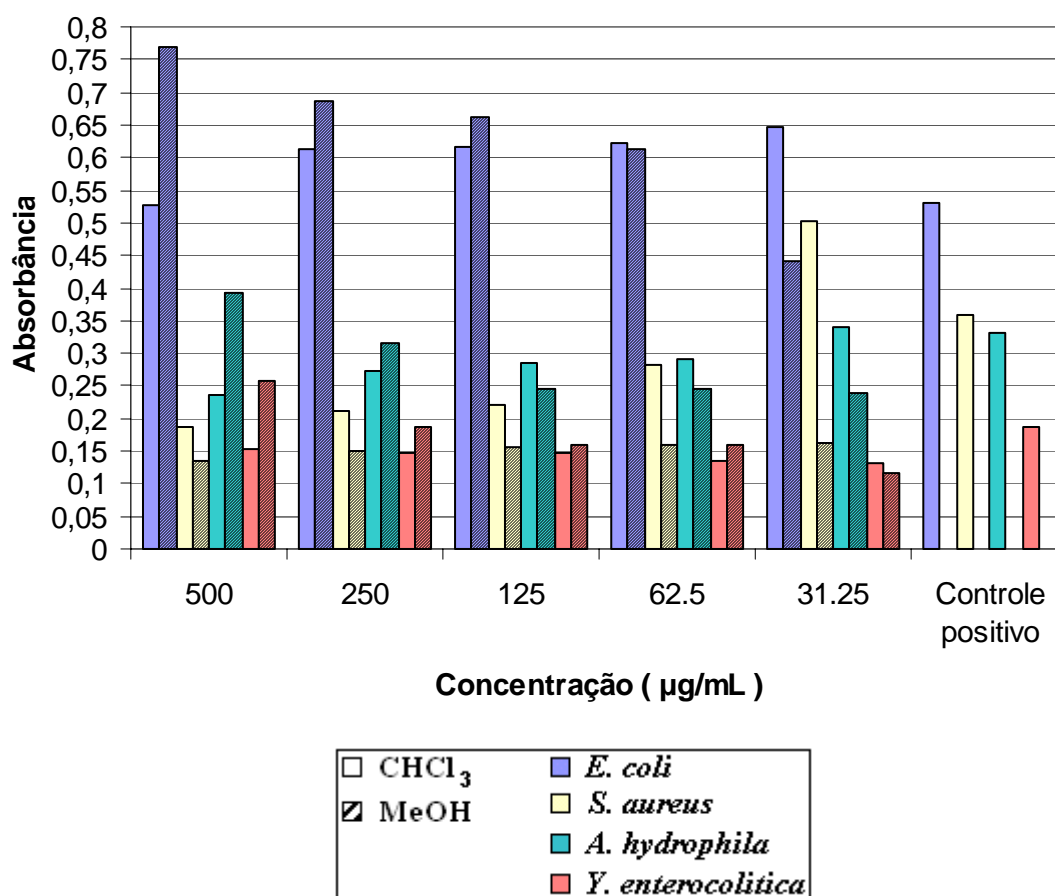


Figura 10: Atividade antibacteriana dos extratos de *Alchornea glandulosa*.

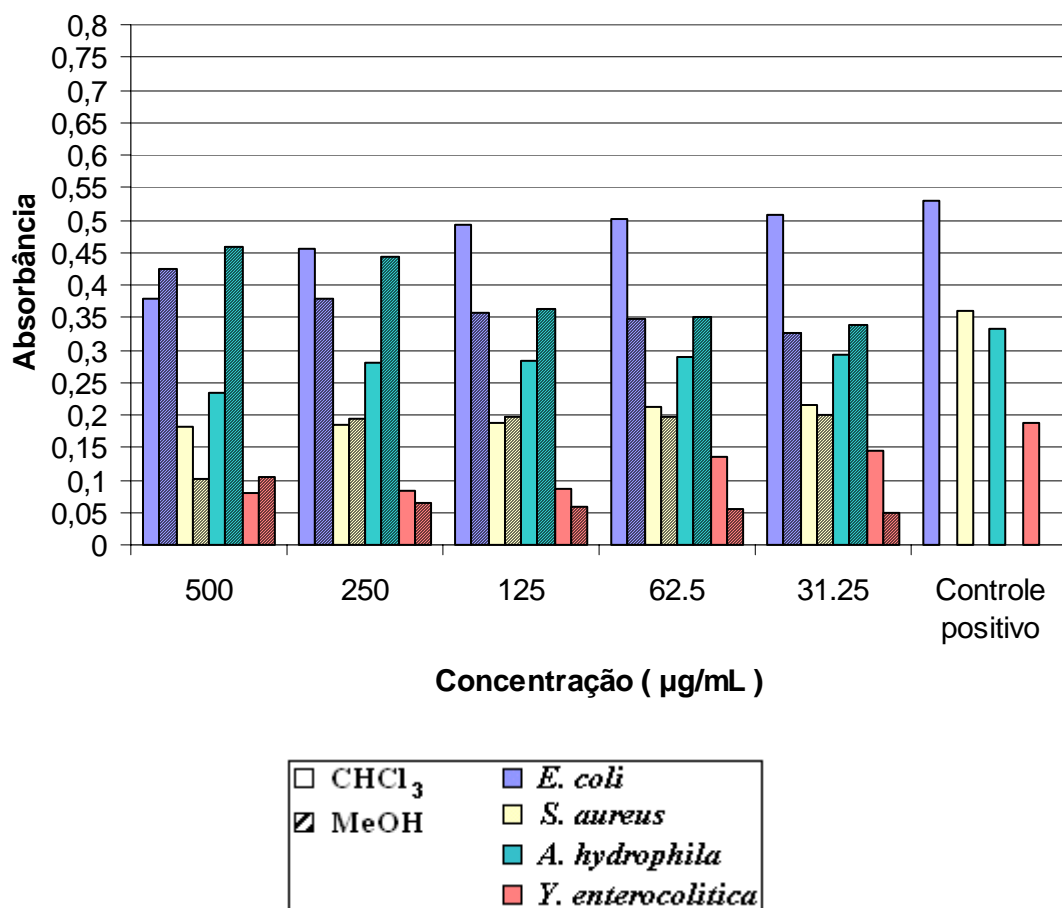


Figura 11: Atividade antibacteriana dos extratos de *Alchornea triplinervia*.

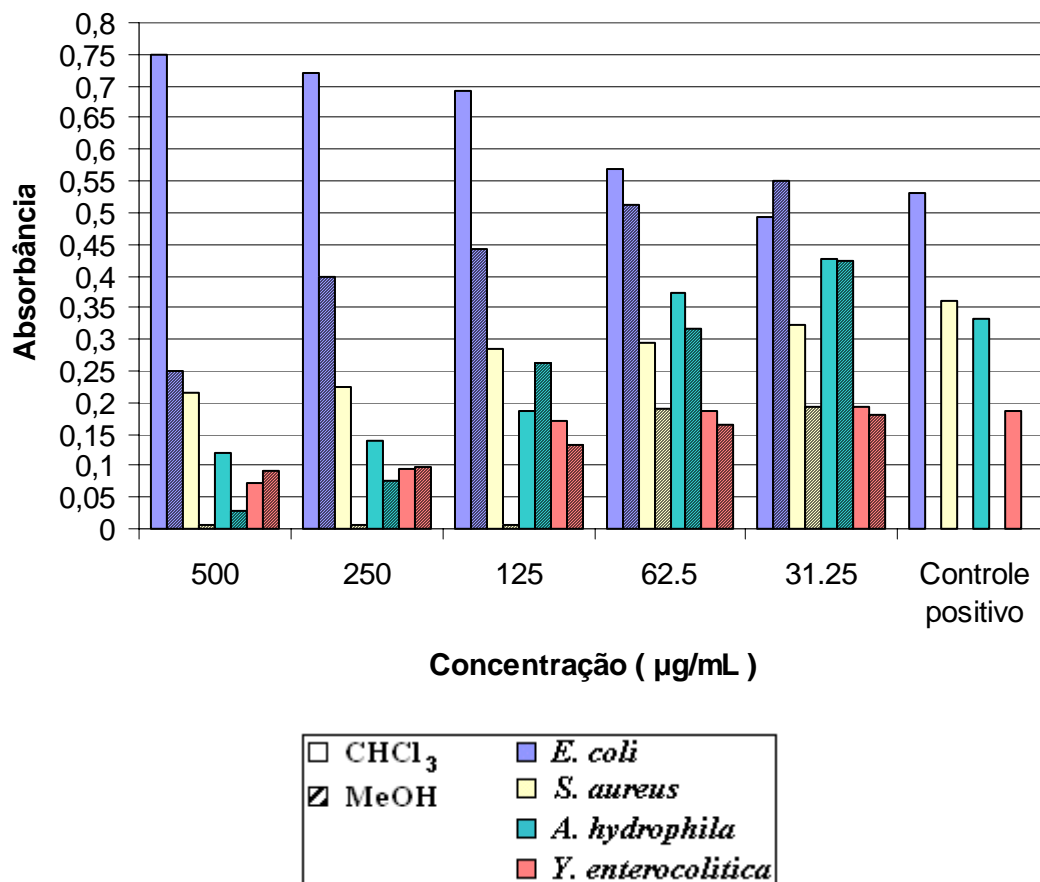


Figura 12: Atividade antibacteriana dos extratos de *Byrsonima crassa*.

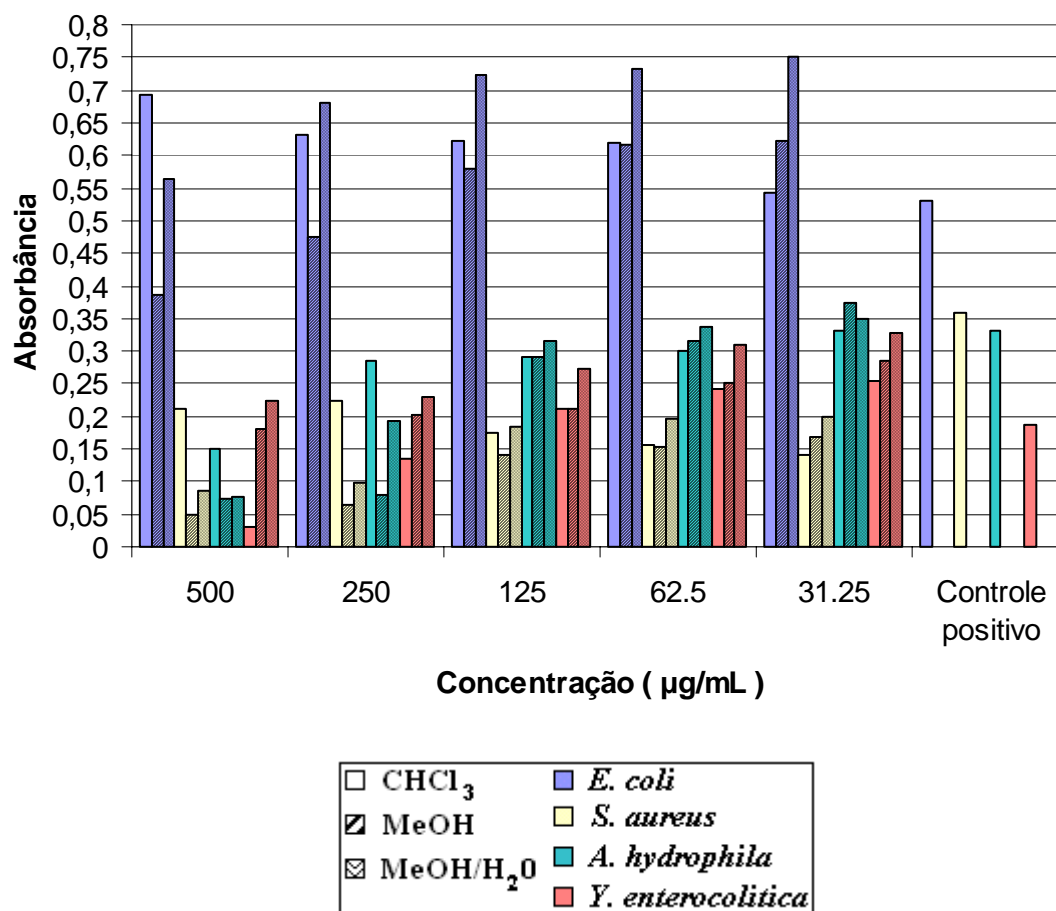


Figura 13: Atividade antibacteriana dos extratos de *Byrsonima intermedia*.

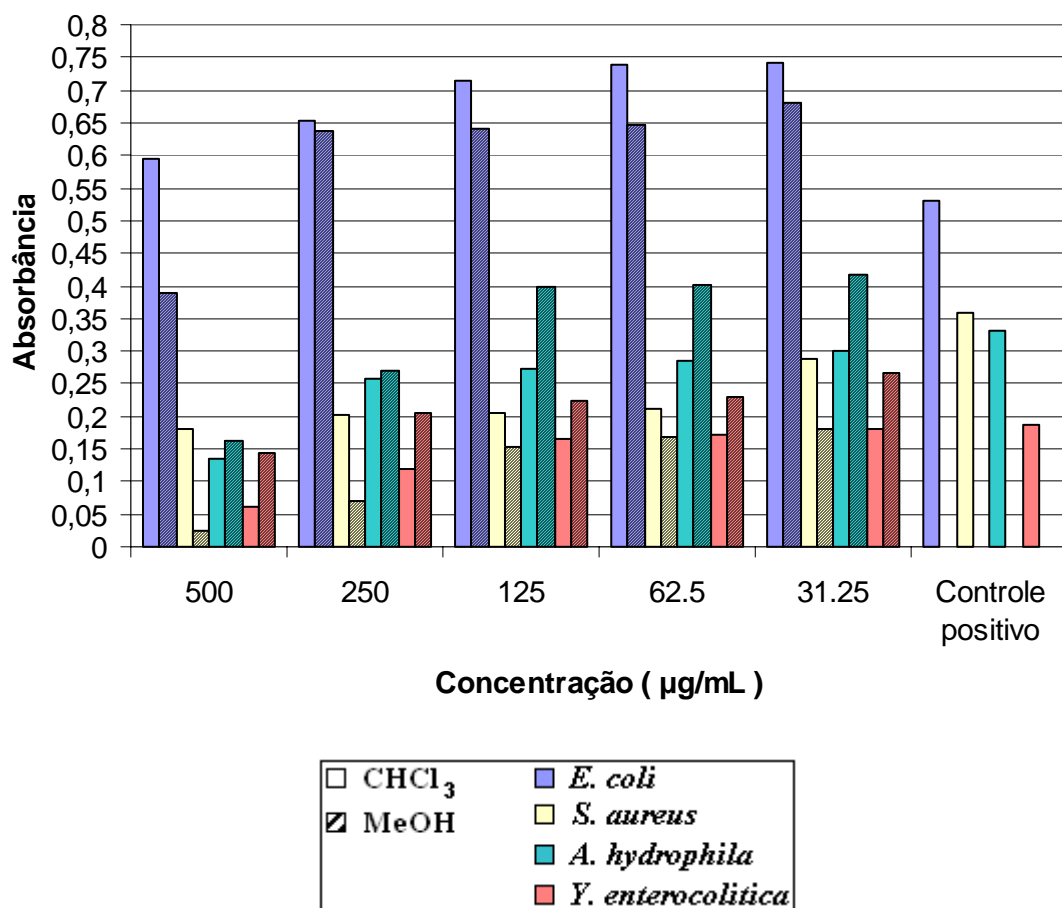


Figura 14: Atividade antibacteriana dos extratos de *Byrsonima basiloba*.

Tabela 2: Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de diluição em microplaca com leitura espectrofotométrica.

Extratos	Bactérias	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>A. hydrophila</i>
<i>A. glandulosa</i> (MeOH)		> 500	31,25	> 500	> 500
<i>A. glandulosa</i> (CHCl ₃)		> 500	62,5	> 500	> 500
<i>A. triplinervia</i> (MeOH)		> 500	62,5	31,25	> 500
<i>A. triplinervia</i> (CHCl ₃)		> 500	125	125	> 500
<i>B. crassa</i> (MeOH)		250	125	125	62,5
<i>B. crassa</i> (CHCl ₃)		> 500	250	250	125
<i>B. intermedia</i> (MeOH)		500	250	250	250
<i>B. intermedia</i> (MeOH/H ₂ O)		> 500	250	250	250
<i>B. intermedia</i> (CHCl ₃)		> 500	> 500	250	500
<i>B. basiloba</i> (MeOH)		500	31,25	500	250
<i>B. basiloba</i> (CHCl ₃)		> 500	62,5	250	500

Estes resultados representam as médias das triplicatas.

Os extratos (MeOH) e (CHCl₃) de *A. glandulosa* não apresentaram atividade antibacteriana frente *E. coli*, *Y. enterocolitica*, e *A. hydrophila* nas concentrações testadas sendo indicado na concentração > 500 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, os extratos (MeOH) e (CHCl₃) de *A. glandulosa* apresentaram atividade antibacteriana frente *S. aureus* com CIM de 31,25 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Os extratos de *A. triplinervia* (MeOH) e (CHCl₃) não apresentaram atividade antibacteriana frente *E. coli* e *A. hydrophila* nas concentrações testadas. *A. triplinervia* (CHCl₃) apresentou CIM de 125 $\mu\text{g/mL}$ frente as cepas *S. aureus* e *Y. enterocolitica*. *A. triplinervia* (MeOH) apresentou atividade antibacteriana frente a *S. aureus* e *Y. enterocolitica* com CIM de 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

O extrato de *B. crassa* (MeOH) apresentou atividade antibacteriana com CIM de 250, 125, 125 e 62,5µg/mL respectivamente para *E. coli*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica* e *A. hydrophila*. O extrato de *B. crassa* (CHCl₃) não apresentou atividade antibacteriana frente a *E. coli*, entretanto, apresentou CIM de 250, 250 e 125µg/mL frente as demais bactérias testadas.

O extrato de *B. intermedia* (MeOH) apresentou CIM de 500µg/mL frente a *E. coli* e 250µg/mL frente as demais cepas de *S. aureus*, *Y. enterocolitica* e *A. hydrophila* respectivamente. A *B. intermedia* (MeOH/H₂O) não apresentou atividade antibacteriana frente a *E. coli* nas concentrações testadas, contudo apresentou CIM de 250µg/mL para *S. aureus*, *Y. enterocolitica* e *A. hydrophila*. O extrato de *B. intermedia* (CHCl₃) não apresentou atividade antibacteriana frente *E. coli* e *S. aureus* nas concentrações testadas, mas apresentou CIM de 250 e 500µg/mL para *Y. enterocolitica* e *A. hydrophila*.

O extrato de *B. basiloba* (MeOH) apresentou atividade antibacteriana de 500µg/mL frente a *E. coli* e *Y. enterocolitica*, mas para *A. hydrophila* e *S. aureus* apresentou CIM de 250µg/mL e 31,25µg/mL respectivamente. O extrato de *B. basiloba* (CHCl₃) não apresentou atividade antibacteriana frente a *E. coli* nas concentrações testadas, mas apresentou CIM de 500µg/mL frente *A. hydrophila*, 250µg/mL frente *Y. enterocolitica*, e 62,5µg/mL frente a *S. aureus*.

5.2.2. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) através da técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador.

Os valores das CIMs obtidos pela técnica de diluição em microplacas utilizando resazurina como revelador são demonstrados na tabela 4.

Tabela 3: Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador.

Extratos	Bactérias	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>A. hydrophila</i>
<i>A. glandulosa</i> (MeOH)		> 1000	500	> 1000	1000
<i>A. glandulosa</i> (CHCl ₃)		> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>A. triplinervia</i> (MeOH)		> 1000	250	> 1000	> 1000
<i>A. triplinervia</i> (CHCl ₃)		> 1000	1000	> 1000	> 1000
<i>B. crassa</i> (MeOH)		500	125	500	125
<i>B. crassa</i> (CHCl ₃)		> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
<i>B. intermedia</i> (MeOH)		> 1000	125	> 1000	500
<i>B. intermdia</i> (MeOH/H ₂ O)		> 1000	250	> 1000	500
<i>B. intermedia</i> (CHCl ₃)		> 1000	1000	> 1000	> 1000
<i>B. basiloba</i> (MeOH)		> 1000	250	> 1000	1000
<i>B. basiloba</i> (CHCl ₃)		> 1000	1000	> 1000	> 1000

Estes resultados representam as médias das triplicatas.

A atividade antibacteriana e a CIM dos extratos vegetais testados são interpretadas pela manutenção da cor azul (ausência de crescimento bacteriano) e desenvolvimento da cor rósea (presença de crescimento bacteriano). Assim a CIM é

definida como a menor concentração do extrato vegetal capaz de impedir a mudança da cor azul para a rosa.

O extrato de *B. crassa* (MeOH) apresentou CIM de 500, 125, 500 e 125µg/mL para *E. coli*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* respectivamente, enquanto que o extrato (CHCl₃) desta mesma planta não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas sendo indicado na concentração >1000µg/mL.

O extrato de *B. intermedia* (MeOH) apresentou CIM de 125 e 500µg/mL para *S. aureus* e *A. hydrophila* respectivamente, sendo que a *B. intermedia* (CHCl₃) apresentou CIM=1000µg/mL. O extrato de *B. intermedia* (MeOH/H₂O) apresentou CIM de 250 e 500µg/mL para *S. aureus* e *A. hydrophila* respectivamente.

A espécie *B. basiloba* apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* (CIM=250µg/mL) e contra *A. hydrophila* (CIM=1000µg/mL). A espécie *B. basiloba* (CHCl₃) apresentou CIM=1000µg/mL para *S. aureus*.

O extrato metanólico de *A. glandulosa* apresentou atividade antibacteriana contra *S. aureus* (CIM=500µg/mL), enquanto que o extrato (CHCl₃) não apresentou atividade nas concentrações testadas sendo indicado na concentração >1000µg/mL.

Os extratos (MeOH) e (CHCl₃) de *A. triplinervia* apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, com CIM de 250 e 1000µg/mL respectivamente.

Na figura 14 é um exemplo do teste realizado utilizando resazurina como revelador. Os orifícios em azul representam à ausência de crescimento bacteriano e os orifícios em rosa representam crescimento bacteriano.

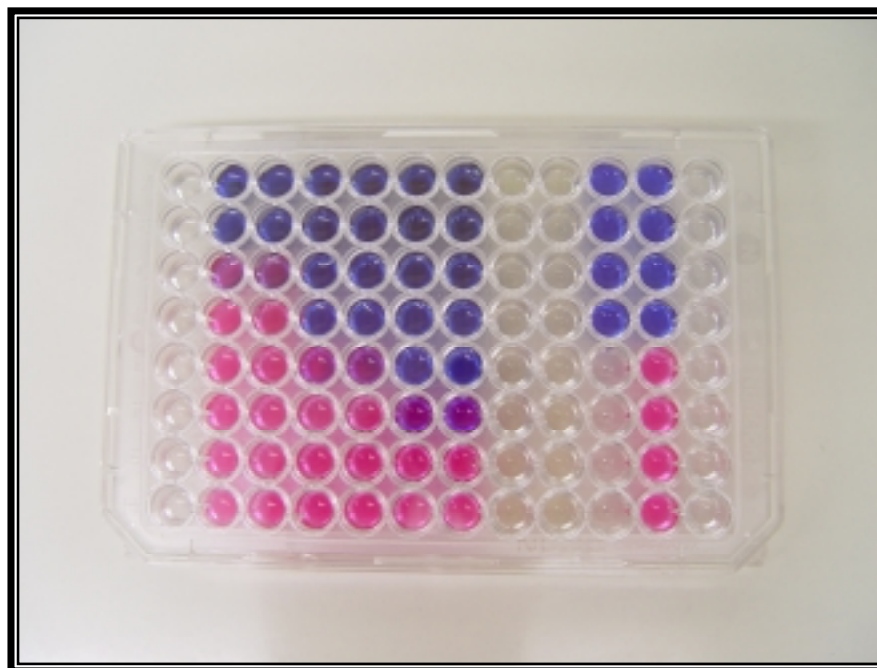


Figura 15: Técnica de diluição em microplaca utilizando resazurina como revelador, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

5.2.3. Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM) através da técnica de diluição em tubos.

A técnica de diluição em tubos realizada seguindo as normas da metodologia do NCCLS M7-A6, demonstra os valores obtidos das CIMs na tabela 5.

Tabela 4: Determinação da atividade antibacteriana e da concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de diluição em tubos.

Extratos	Bactérias	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>A. hydrophila</i>
<i>A. glandulosa</i> (MeOH)		>1000	500	1000	>1000
<i>A. glandulosa</i> (CHCl ₃)		1000	>1000	1000	>1000
<i>A. triplinervia</i> (MeOH)		1000	500	>1000	1000
<i>A. triplinervia</i> (CHCl ₃)		>1000	>1000	>1000	>1000
<i>B. crassa</i> (MeOH)		1000	500	500	500
<i>B. crassa</i> (CHCl ₃)		>1000	1000	1000	1000
<i>B. intermedia</i> (MeOH)		>1000	500	1000	500
<i>B. intermedia</i> (MeOH/H ₂ O)		>1000	1000	1000	1000
<i>B. intermedia</i> (CHCl ₃)		>1000	1000	>1000	1000
<i>B. basiloba</i> (MeOH)		500	250	1000	1000
<i>B. basiloba</i> (CHCl ₃)		>1000	1000	>1000	>1000

Estes resultados representam as médias das triplicatas.

No método de diluição em tubos a atividade antibacteriana dos extratos vegetais avaliados foram realizados em triplicata para determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

O extrato metanólico de *B. basiloba* apresentou CIM de 500µg/mL frente a *E. coli*. Os extratos de *B. crassa* (MeOH), *A. glandulosa* (CHCl₃) e *A. triplinervia* (MeOH) apresentaram atividade antibacteriana frente a *E. coli* com CIM de 1000µg/mL. Os demais extratos não apresentaram atividade antibacteriana frente a *E. coli* nas concentrações testadas sendo indicados na concentração >1000µg/mL.

Os testes realizados frente a *S. aureus* mostraram que o extrato metanólico de *B. crassa*, *B. intermedia*, *A. glandulosa*, *A. triplinervia* inibiu o crescimento dos microrganismos obtendo a CIM de 500µg/mL. Obteve-se um melhor resultado com o extrato metanólico de *B. basiloba* apresentando uma CIM de 250µg/mL. Os demais extratos testados frente a *S. aureus* como *B. crassa* (CHCl₃), *B. intermedia* (CHCl₃), *B. intermedia* (MeOH/H₂O), *B. basiloba* (CHCl₃) apresentaram CIM de 1000µg/mL. Alguns extratos não apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações testadas sendo então indicados na concentração >1000µg/mL sendo eles a *A. glandulosa* (CHCl₃) e *A. triplinervia* (CHCl₃) pois não se pode afirmar que acima desta concentração o extrato apresenta atividade antibacteriana.

Observa-se que os resultados obtidos frente à cepa *Y. enterocolitica* mostraram que o extrato metanólico de *B. crassa* apresentou CIM de 500µg/mL, e os extratos de *B. crassa* (CHCl₃), *B. intermedia* (MeOH), *B. intermedia* (MeOH/H₂O), *B. basiloba* (MeOH), *A. glandulosa* (MeOH), *A. glandulosa* (CHCl₃) apresentaram CIM de 1000µg/mL. Os demais extratos não inibiram o crescimento do microrganismo nas concentrações testadas.

Os resultados obtidos para a técnica de diluição em tubos frente à cepa *A. hydrophila* demonstram que os extratos metanólicos de *B. crassa* e *B. intermedia* apresentaram CIM de 500µg/mL. Os extratos vegetais de *B. crassa* (CHCl₃), *B. intermedia* (CHCl₃), *B. intermedia* (MeOH/H₂O), *B. basiloba* (MeOH) e *A. triplinervia* (MeOH)

apresentaram CIM de 1000µg/mL. Os demais extratos não apresentaram atividade antibacteriana nas concentrações testadas sendo indicadas como >1000µg/mL.

DISCUSSÕES

6. DISCUSSÃO

O bioma Cerrado é um complexo vegetacional com características peculiares e variações fisionômicas dos seus componentes herbários. Com uma área de aproximadamente 2 milhões de Km² o cerrado abrange cerca de 23% do território brasileiro, ocupando grande parte do Planalto Central, sendo superado em tamanho apenas pela Floresta Amazônica (RATTER et al., 1988). Apesar de sua elevada biodiversidade, tem sido pouco valorizado em termos de conservação. O cerrado brasileiro é considerado como um dos 25 ecossistemas do planeta, e muitas destas plantas encontradas nesse ecossistema são usadas na medicina natural. Por outro lado, devido ao desconhecimento da possível existência da ação tóxica, bem como de sua indicação adequada, as plantas medicinais são muitas vezes utilizadas de forma incorreta, não produzindo o efeito desejado (FELFILI et al., 2002). Visando a caracterização e o uso sustentável desse Cerrado no território do Estado de São Paulo, é que vem sendo desenvolvido esse estudo, uma vez que para a determinação do potencial biológico de produtos vegetais a determinação da atividade bacteriana é uma etapa bastante importante. Além disso, tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam um desafio no tratamento de infecções, é notória a necessidade de se encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos.

As espécies vegetais desenvolveram ao longo de sua evolução, mecanismos de defesa interagindo com o meio ambiente. As substâncias químicas produzidas são empregadas em consequência da ativação de rotas específicas do metabolismo secundário e constituem a maioria dos princípios ativos, por exemplo, óleos essenciais, alcalóides, taninos e flavonóides, entre outras (KRIVENKO et al., 1996).

Um grande número de extratos de plantas foi estudado e apresentou atividade antimicrobiana. A *Salvia officinalis* L., apresentou atividade antimicrobiana contra *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* (PEREIRA et al., 2004). Extratos de *Phyllanthus amarus* apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella paratyphi* e *Staphylococcus aureus* (SRIVASAN et al., 2001). O extrato de folhas de *Bryophyllum pinnatum* Kurz (“Folha da Fortuna”) demonstrou atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram - positivas (SCHMITT et al., 2003). Extrato de *Azadirachta indica*, *Cinnamomum cassia*, *Rumex nervosus*, *Ruta graveolens*, *Thymus serpyllum* e *Zingiber officinale* foram ativas contra *Bacillus cereus* (ALZOREKY e NAKAHARA, 2003). Extratos de *Caryophyllus aromaticus* e *Syzygium joabolanum* apresentaram um potencial antimicrobiano para os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *S. aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus* spp, entre outros, inclusive sobre os microrganismos isolados de ambiente hospitalar e resistentes a antibióticos (NASCIMENTO et al., 2000).

Ainda que existam inúmeros trabalhos nessa área estudando a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, as plantas brasileiras são pouco estudadas. Dentre essas espécies que ocorrem no Cerrado do Estado de São Paulo estão as *Byrsonima* spp e *Alchornea* spp.

A família Malpighiaceae é constituída por aproximadamente 800 espécies distribuídas em 60 gêneros sendo que, o Brasil concentra cerca de 50% das espécies. A família contém exemplares que apresentam diferentes substâncias biologicamente ativas. No Nordeste brasileiro ocorrem, várias espécies do gênero *Byrsonima* que são principalmente conhecidas pela utilização de seus frutos na alimentação e pelo emprego com fins medicinais. Espécies desse gênero são comumente empregadas como

antiasmáticas, contra febre e infecção da pele. Já foram isolados do gênero *Byrsonima* alguns derivados flavonoídicos (*B. verbascifolia*), no entanto, são os triterpenos que representam a classe de substâncias naturais de ocorrência mais freqüente no gênero (MENDES et al., 1999).

Extratos de *B. crassifolia* apresentaram atividade bactericida e fungicida pelo método de difusão em agar contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Micrococcus luteus* (MARTÍNEZ- VÁSQUEZ, et al., 1999).

O extrato de *B. crassa* apresentou uma significativa atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp.*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* quando testadas pelo método clássico de difusão em agar e na determinação da CIM pelo método de diluição em tubos (SANNOMIYA et al., 2005a).

MARTÍNEZ-VÁSQUEZ et al., (1999) e LOPES et al., (2001) demonstraram atividade antimicrobiana do extrato de *B. verbascifolia* contra *Streptococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

A investigação fitoquímica do gênero *Byrsonima*, ao longo do tempo, tem revelado a presença de esteróides, triterpenos, ésteres aromáticos, aminoácidos, proantocianidinas, flavonóides e catequinas. A análise fitoquímica das frações do extrato metanólico das folhas de *B. crassa* revelou a presença de taninos e catequinas na fração aquosa, os quais têm apresentado resultados significativos em estudos realizados com camundongos na avaliação de disfunções gástricas e diarréicas. Na fração acetato de etila, além da presença de flavonóides, foram isolados os seguintes compostos: amentoflavona, quercetina-3-O-a-L-arabinopiranosídeo, quercetina-3-O-β-D-alactopiranosídeo. Derivados fenólicos, como ácido gálico e galato de metila, foram isolados em quantidades significativas, sendo

comuns ao gênero, uma vez que também foram isolados de *Byrsonima fagifolia*. Segundo os autores, esses compostos fenólicos têm despertado grande interesse em pesquisadores na Europa, principalmente na Itália, onde alguns estudos em andamento têm demonstrado importante atividade contra o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Alguns desses compostos são comuns ao extrato metanólico de *B. intermedia*, em diferentes proporções (CARDOSO, 2006).

Os resultados obtidos nesse estudo são condizentes com os da literatura uma vez que pode-se observar atividade antibacteriana significativa para os extratos metanólicos de *B. crassa* frente *E. coli*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica* e *A. hydrophila* e também *B. basiloba* frente a *S. aureus* e da *B. intermedia* frente *S. aureus* e *A. hydrophila*. Segundo a técnica de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica a *B. crassa* (MeOH) apresentou CIM = 250µg/mL para *E. coli*, CIM = 125µg/mL para *S. aureus* e *Y. enterocolitica*, e CIM = 62,5µg/mL para *A. hydrophila*. Na técnica de diluição em microplacas utilizando revelador resazurina a *B. crassa* (MeOH) apresentou CIM = 500µg/mL para *E. coli* e *Y. enterocolitica* e CIM = 125µg/mL para *S. aureus* e *A. hydrophila*. Na técnica de diluição em tubos *B. crassa* (MeOH) apresentou CIM = 1000µg/mL para *E. coli* e CIM = 500µg/mL para *S. aureus*, *Y. enterocolitica* e *A. hydrophila*. Na comparação das metodologias utilizadas neste estudo os melhores resultados foram estes apresentados acima com o extrato de *B. crassa*.

Os flavonóides são conhecidos por exercerem uma infinidade de propriedades biológicas como antimicrobiana, antiviral, antiinflamatória, analgésica e antiúlceras (SIMÕES, 1999). Assim, esta atividade observada para o extrato metanólico pode ser atribuída à presença dos diferentes flavonóides isolados do extrato de *Byrsonima*. O estudo fitoquímico das espécies em estudo está sendo realizado pelo laboratório de Química

Orgânica do Instituto de Química – Unesp – Araraquara, coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas.

A família Euphorbiaceae compreende aproximadamente 290 gêneros e 7.500 espécies distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do globo, principalmente na América e na África. No Brasil, ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies difundidas em todos os tipos de vegetação. Espécies do gênero *Alchornea* têm sido usadas popularmente como agente antidiarreico, antiinflamatório, anti-reumático e no tratamento de hanseníase e doenças cutâneas. Estudos farmacológicos realizados em extratos brutos e compostos isolados revelaram atividades antibacteriana, antiinflamatória, antiespasmódica, antitripassonômica e antidiarreica (COGENERO et al., 2003). Estudos químicos realizados com o gênero *Alchornea* descrevem o isolamento e a identificação de alcalóides hexaidroimidazo-pirimidínicos e guanidínicos, como principais constituintes, além de triterpenos, flavonóides e outros compostos fenólicos (COGENERO et al., 2003). Esses mesmos autores demonstraram atividade antimicrobiana moderada de *A. glandulosa* para o extrato bruto metanólico frente aos microorganismos *S. aureus* (CIM = 250 µg/mL) e *Candida albicans* (CIM = 125µg/mL) e significativa para fração alcaloidal frente a *Bacillus subtilis* (CIM = 62,5 µg/mL) e *Candida tropicalis* (CIM = 31,2 µg/mL). Segundo URREA – BULLA et al., (2004) foram isolados do extrato etanólico das folhas de *A. glandulosa* o galato de etila, ácido gálico, quercetina, kaempferol-3-O-L-ramnosídeo, quercetina-3-O-L-ramnosídeo e miricetina-3-O-L-ramnosídeo. Na *A. triplinervia*, já foram encontrados o ácido gálico, amentoflavona, β-D-glucogalina, galato de metila e isocorilagina (BRACA et al., 2002).

Neste trabalho demonstramos atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de *A. glandulosa* com diferentes valores nas técnicas utilizadas. Os ensaios com microplacas utilizando resazurina como revelador apresentaram atividade antibacteriana com CIM =

500µg/mL para *S. aureus* e CIM = 1000µg/mL para *A. hydrophila*. Pela técnica de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica a *A. glandulosa* (MeOH) apresentou CIM = 31,25µg/mL para *S. aureus*, não apresentando atividade antibacteriana frente as outras cepas testadas. Na técnica de diluição em tubos apresentou CIM = 500 µg/mL para *S. aureus*.

Segundo Yunes e Calixto (2001), o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Esta afirmativa pode justificar nossos resultados nas três metodologias aplicadas onde, os extratos metanólicos de *Byrsonima* e *Alchornea*, de um modo geral apresentaram maior atividade antibacteriana contra os microrganismos testados. A literatura destaca algumas classes de produtos naturais que possuem potencial atividade antimicrobiana, como é o caso de triterpenos, flavonóides, alcalóides e fenólicos (SIMÕES, 1999).

Vários estudos de atividade antimicrobiana vêm sendo realizados com a utilização das técnicas de diluição em microplacas e demonstram que esta é uma metodologia adequada para tal finalidade com aspectos vantajosos como a utilização de pequenas quantidades de produtos naturais e a possibilidade de se utilizar mais de um extrato, bem como diferentes microrganismos num mesmo ensaio. Essas técnicas que determinam a concentração inibitória mínima são quantitativas, pois possibilitam demonstrar qual a mínima concentração do extrato necessária para inibir o crescimento bacteriano. Embora essas técnicas sejam mais sensíveis, são mais trabalhosas quando realizadas manualmente, o que impede a realização de um espectro maior de “screening” em um curto espaço de tempo (SUFFREDINI et al., 2004; CHAND et al., 1994; DEVIENNE e RADDI, 2002; MIGLIATO, 2005; HAMMER et al., 1998; COWAN, 1999; ALVES, 2006).

Em concordância com a literatura pode-se verificar que as técnicas de diluição em microplacas são adequadas para tais ensaios enfatizando a grande vantagem de se utilizar

volumes reduzidos, principalmente em relação aos produtos de origem vegetal que geralmente são extraídos em pequenas quantidades. Um dos poucos inconvenientes que essas técnicas de microdiluição apresentam é em relação à leitura realizada em leitor de microplacas que pode apresentar variação dada a sensibilidade do equipamento além do custo para aquisição do mesmo. Neste sentido a modificação proposta por FRANZBLAU et al., 1998 padronizada para *Mycobacterium tuberculosis* e que possibilita a leitura visual ao invés da leitura espectrofotométrica, pela utilização do Alamar Blue, elimina essa desvantagem na metodologia tornando-a de fácil leitura e conclusão.

Um dos objetivos desse estudo foi padronizar essa metodologia em nosso laboratório para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas para as quais até então não era empregada. O Alamar Blue vem sendo substituído pela resazurina, e foi este corante que utilizamos no presente estudo, no qual podemos demonstrar que tal modificação foi viável, pois a técnica permite análises visuais reprodutíveis e que facilitaram o trabalho na leitura final.

Segundo a norma M7A6 (NCCLS, 2003) o método de diluição em caldo é utilizado para avaliar quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. A prova de sensibilidade por este método foi uma das primeiras a serem desenvolvidas e ainda hoje serve como método de referência. Segundo ELOFF (1998) a técnica alternativa mais amplamente utilizada em ensaios microbiológicos é a de diluição seriada de extratos em tubos seguidos da adição do microrganismo, para determinar a CIM usando turbidez como um indicador do crescimento. Essa técnica requer grande quantidade de extratos não sendo útil em bioensaios para compostos antimicrobianos.

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de diluição em tubos verificou-se que essa técnica é menos sensível do que os apresentados pelas técnicas de diluição em

microplacas, pois os valores da CIM foram bem maiores que os anteriormente citados. Isso nos leva a supor que esta técnica poderia subestimar a atividade antimicrobiana de um extrato vegetal e assim sugerimos que o ideal seria utilizá-la numa triagem de extratos vegetais a fim de verificar sua possível atividade antimicrobiana.

Em uma recente revisão de artigos sobre atividade antimicrobiana de plantas medicinais, RIOS e RECIO, (2005) afirmaram que o maior problema com as pesquisas ainda continua sendo a falta de uniformidade nos critérios selecionados para avaliar tal atividade. Isso freqüentemente leva a relevantes contradições entre os resultados obtidos por diferentes grupos e mesmo para os mesmos autores estudando a mesma amostra com diferentes métodos.

Em linhas gerais observou-se diferença entre os resultados obtidos nas técnicas utilizadas, sendo que das três, a de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica foi a mais sensível, já que demonstrou valores de CIM menores para os extratos vegetais para a maioria dos microrganismos testados. Entretanto, essa metodologia pode apresentar alguns interferentes na leitura como uma possível sedimentação do extrato ou da suspensão bacteriana e também com o objetivo de evitar contaminação das microplacas, este ensaio foi realizado em duplicata. Já a mesma metodologia com a utilização da resazurina e, portanto leitura visual, nos permite realizar apenas uma microplaca por ensaio o que a torna vantajosa em relação a anterior.

Acreditamos que o presente trabalho tenha contribuído com a avaliação do potencial biológico do Bioma-Cerrado do estado de São Paulo, pois, faz parte do projeto temático Biota-Fapesp. Os dados obtidos nos permitem concluir que as espécies vegetais estudadas apresentaram atividade antibacteriana significativa.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Os extratos metanólicos de *Byrsonima* e *Alchornea* apresentaram maior atividade antibacteriana quando comparados com os extratos clorofórmicos.
- A técnica de diluição em microplacas utilizando leitura espectrofotométrica apresentou-se a mais sensível na determinação da CIM.
- A técnica de diluição em microplacas utilizando a resazurina mostrou-se reprodutível, de fácil interpretação dos resultados e de fácil execução, podendo, portanto ser ampliada a sua utilização para bactérias Gram-negativas e Gram - positivas, além das micobactérias para a qual já vem sendo utilizada.
- As técnicas de diluição em microplacas mostraram-se mais sensíveis e mais adequadas, por permitirem ensaios com pequenos volumes de extratos.
- A técnica de diluição em tubos apresentou-se menos sensível, quando comparada com as de diluição em microplacas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

BALLVÉ, A. C.; SIQUEIRA, N. C. S.; MENTZ, L. A.; SILVA, G. A. de A. B.; DEUD JOSÉ, K. F. **Plantas medicinais de uso popular**: atlas farmacognóstico. Canoas: Ed. da ULBRA, 1995. 205p.

BAUAB, T. M.; FALCÃO, D. P. Experimental infection of mice with *Yersinia* strains bearing or not bearing the virulence-associated plasmid. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v. 12, p. 145-155, 1991.

BAUAB, T. M.; LEVY, C. E.; RODRIGUES, J.; FALCÃO, D. P. Niche-specific association of *Aeromonas* ribotypes from human and environmental origin. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, n. 1, p. 7-16, 2003.

BRACA, A.; MENDEZ, J.; MENICHINI, F.; MORELLI, I. Constituintes of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 30, n.11, p. 1109-1111, 2002.

CARDOSO, C. R. P. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae).** Araraquara, 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade estadual Paulista, 2006.

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

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.

COGENERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S. SARRAGIOTTO, M. H.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 6, 2003.

CORDEIRO, C. H. G. Atividade biológica de gel dentifrício e enxaguatório bucal contendo extratos vegetais. Araraquara, 2005. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2005.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.

DEVIENNE, K. F. **Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides***. Araraquara: 2000. 126f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista.

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

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 91-103.

ELLOF, J. N. A. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-13, 1998.

FELFILI, J. M.; NOGUEIRA, P. E.; SILVA JUNIOR, M. C.; MARIMON, B. S.; DELITTI, W. B. C. Composição florística e fitossociologia do cerrado sentido restrito no município de Água Boa - MT. **Acta bot. Bras.**; v. 16, n 1, p.103-112, 2002.

FIGUEIREDO, M. E.; MICHELIN, D. C. SANNOMIYA, M. SILVA, M. A ; SANTOS, L. C.; ALMEIDA, L. F. R.; BRITO, A R. M. SALGADO, H. R. N.; VILEGAS, W. Avaliação química e anti-diarreica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae).

Rev. Bras. Ciênc. Farm., v. 41, p. 1-5, 2005

FRANZBLAU, S. G.; WITZIG, R. S.; MCLAUGHLIN, J. C.; TORRES, P.; MADICO, G.; HERNANDEZ, A.; DEGNAN, M. T.; COOK, M. B.; QUENZER, V. K.; FERGUSON, R. M.; GILMAN, R. H. Rapid, low- technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 2, p. 362-366, 1998.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELOV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MOLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **J. Microbiol. Methods.** v. 50, p. 63-73, 2002.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.**

Porto Alegre: UFRGS, 2004. p. 13 – 14.

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

KRIVENKO, V. V.; POTEBNIA, G. P.; LOIKO, V. V. Experience in treating digestive organ disease with medicinal plants. **Urach Delo**, v. 3, p 76-78, 1989.

KUSAMRAM, W. R.; TEPWAN, A.; KUPRADINUM, P. Antimutagenic And anticarcinogenic potentials of some thai vegetables. **Mut. Res.**, v.402, p. 247-258, 1998.

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

LOPES, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** v. 77, p. 189-196, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. ABREU. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 324.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000a. v. 1. p. 97, 98, 232.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2000b. p. 458.

MAHADY, G. B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, n. 19, p. 2405-2427, 2005.

MARTÍNEZ – VASQUÉS, M.; GONZÁLEZ – ESQUINCA, A. R.; CAZARES, L. L.; MORENO, G. M. N.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H. B. K. **J. Ethnopharmacol.** v. 66, p. 79-82, 1999.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Quím. Nova**, v. 22, n. 2, p. 185-188, 1999.

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

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited-states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by *p*- benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, n. 64, p. 117-124, 2005.

MONTOURO, P.; SANNOMIYA, M.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; BRITO, A. R. M. S.; VILLEGAS, W. Application of liquid chromatography eletrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from na infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rap. Commun. In Mass Spectr.**, v.19, n.16, p. 2244-2250, 2005.

MOREIRA, N. M.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através de inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 23, n. 2, 2003.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n.4, p. 247-256. 2000.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico. Norma Aprovada 6 ed. Brasília, DF: ANVISA, 2003. (NCCLS Document M7-A6, v. 23, n. 2, 2003).

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

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C. Atividade antibacteriana de cepas isoladas de infecção urinária. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 2, 2004.

PEREIRA, K. B. D.; SILVEIRA, C. E. Caracterização morfo-anatômica do endocarpo e da semente de *Byrsonima basiloba* Juss. (Murici-de-Ema, Malpighiaceae). In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 54., 2003, Belém. **Anais...** Belém-PA, Brasil.

RATTER, J. A., DARGIE, T. C. D. An analysis of the floristic composition of 26 cerrado areas in Brazil. **Edinburgh J. Bot.** v 49, p. 235-250, 1992.

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

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.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, M. C.; COELHO, R. G.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoides from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **J. Chromatogr. A**, p.47-51, 2004.

SANNOMIYA, M.; MICHELIN, D. C.; RODRIGUES, C. M.; SANTOS, L. C.; SALGADO, H. R. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. S. M.; VILEGAS, W. *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK): antimicrobial activity and chemical study. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 26, n.1, p.71-75, 2005a.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M. A.; ROCHA, L. R. M.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 97, p. 1-6, 2005b.

SANTOS, P. R. V.; OLIVEIRA, A. C. X., TOMASSINI, T. C. B. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Rev. Farm. Bioq. Univ. São Paulo**, v.31, p.35-38, 1995.

SARDI, J. C. O. **Isolamento e identificação de Bactérias patogênicas de biofilmes bucais de pacientes hospitalizados**. Araraquara, 2004, 136f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2004.

SCHMITT, A. C.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SILVEIRA, T. A. IWAKURA, C. T., MENDES, K. F.; SILVA, M. C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz (“Folha-da-fortuna”) colhida em Várzea Grande, Mato Grosso/Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 1, p. 55-58, 2003.

SILICI, S., KOÇ, N.A., AYANGIL, D., ÇANKAYA, S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeast isolated from patients with superficial mycoses. **J. Pharmacol. Sci.**,v. 99, p. 39-44, 2005.

SILVA, S. R.; SILVA, A. P.; MUNHOZ, C. B.; SILVA JR, M. C.; MEDEIROS, M. B. **Guia de plantas do cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. Brasília: Ed. WWF, 2001, 58p.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. 821p.

SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T.; PERUMALSAMY, P. L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. **J. Ethnopharmacol.** v. 74, p. 217-220, 2001.

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, n 3, p. 379-384. 2004.

TELLES, M. A. S.; MOSCA, A. A avaliação da técnica de microdiluição em placas para determinação da concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev Inst. Adolfo Lutz.**, v. 59, n°1/2, p. 15-19, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 807.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 697.

URREA-BULLA, A.; SUAREZ, M. M.; MORENO-MURILLO, B.; Biological activity of phenolic compounds from *Alchornea glandulosa*. **Fitoterapia**, v.75, p. 392-394, 2004.

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

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523p.

ANEXO

1. Materiais utilizados

1.1 - Materiais e Equipamentos

Espectrofotômetro UV-Visível– Ultrospec III (Pharmacia LKB)

Leitor de microplacas ELISA (Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech. Div., Helsinki, Finland)

Fluxo Laminar VLFS-12 (VECO)

Autoclave (PHOENIX)

Estufa de incubação Modelo 002 CB (FANEM)

Estufa de Secagem (ORION)

Balança analítica e semi analítica (GEHAKA)

Placas de petri para meios de cultura, PIREX

Tubos de ensaio, PIREX

Erlenmeyer, PIREX

Provetas, PIREX

Alça de Drigalski, HEXIS

Cabo de Kole com alça, HEXIS

Bico de Bunsen

Tubos tipo eppendorf, CORNING

Estante para tubos de ensaio

Bastão de vidro

Ponteiras para micropipetadores, CORNING

Micropipetadores Nichipet Ex (NICHIRYO)

Microplacas 96 Wells de fundo em U (CORNING)

1.2– Reagentes e outros

Mueller Hinton Broth (DIFCO)

Mueller Hinton Agar (DIFCO)

Tryptic Soy Broth (DIFCO)

Tryptic Soy Agar (DIFCO)

Solução salina 0,9%

Tampão Fosfato (PBS)

Dimethyl sulfoxide (SIGMA-ALDRICH)

Resazurina (ALDRICH)

2. Meios de Cultura

2.1. Preparo dos meios de cultura desidratados

Foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante.

a) O caldo Mueller-Hinton (CMH) desidratado foi preparado através da reidratação do meio de cultura, suspendendo 21g em 1 litro de água Milli-Q e acertando o pH final em 7,4 a 25°C. Em seguida, o meio foi esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C.

b) Mueller Hinton Agar (MHA) desidratado foi preparado através da dissolução de 38g do meio de cultura em 1 litro de água Milli-Q. Procedeu-se sua esterilização em autoclave por 15 minutos a 121°C. Em seguida foi distribuído em placas de petri estéreis no interior do fluxo laminar.

c) Tryptic Soy Agar (TSA) desidratado, foi preparado através de uma reidratação de 40g do meio de cultura em 1 litro de água Milli-Q, e aquecendo-se ligeiramente até sua completa dissolução e acertando o pH final para $7,3 \pm 0,2$ a 25°C . Procedeu-se esterilização em autoclave por 15 minutos a 121°C .

d) O Tryptic Soy Broth (TSB) desidratado, foi reidratado suspendendo-se 30gramas do meio de cultura em 1 litro de água Milli-Q, aquecendo-se ligeiramente para a completa dissolução e acertando o pH final para $7,3 \pm 0,2$ a 25°C . Procedeu-se esterilização em autoclave por 15 minutos a 121°C .

Após a esterilização dos meios, estes foram mantidos por 24h a 37°C para o teste de esterilização. Posteriormente foram armazenados a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (geladeira).

3. Soluções e reagentes de uso geral

a) Solução Salina 0,9%

Foi preparada uma solução de salina estéril para a padronização da suspensão bacteriana. Utilizou-se 0,9% de NaCl solubilizado em água Milli-Q. Esta solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e posteriormente mantida a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (geladeira).

b) Tampão fosfato (PBS) pH 7,2

- NaCl.....8g
- KCl.....0,2g
- Na_2PO_41,44g
- KH_2PO_40,24g
- H_2Oqsp.....1000mL.

Dissolver os componentes em água Milli-Q até completa dissolução. Esta solução foi autoclavada por 15 minutos a 121°C e posteriormente mantida a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (geladeira).

c) Solução de resazurina

A solução foi preparada na concentração de 0,0005g de resazurina em 5mL de água destilada estéril. Esta solução foi mantida a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ (geladeira) com validade de 5 dias.

d) DMSO (Dimetilsulfóxido)

A solução foi utilizada na proporção de 5% em água destilada.