

**Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos
essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas
antimicrobianas**

NATHÁLIA CRISTINA CIRONE SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de parasitas e microrganismos (BPM).

Ary Fernandes Júnior

**BOTUCATU – SP
2010**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos
essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas
antimicrobianas**

NATHÁLIA CRISTINA CIRONE SILVA

ORIENTADOR: ARY FERNANDES JÚNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de parasitas e microrganismos (BPM).

Ary Fernandes Júnior

**BOTUCATU – SP
2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Silva, Nathália Cristina Cirone.

Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas / Nathália Cristina Cirone Silva. – Botucatu : [s.n.], 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010.

Orientador: Ary Fernandes Junior

Assunto CAPES: 20300000

1. Plantas medicinais - Tratamento 2. Antimicrobianos

CDD 581.6

Palavras-chave: Ação antimicrobiana; Drogas antimicrobianas; Extratos brutos; Óleos essenciais; Plantas medicinais; Sinergismo

AGRADECIMENTOS

À Deus, que esteve ao meu lado para me acompanhar, a minha frente para me conduzir, atrás de mim para me proteger, acima de mim para me guiar e dentro de mim para me iluminar.

Aos meus pais e meu irmão que sempre me apoiaram e me ajudaram a vencer os desafios.

Ao orientador Prof. Dr. Ary Fernandes Junior pelos ensinamentos, ajuda e paciência.

Às minhas amigas do laboratório, Lidiane Nunes Barbosa, Bruna F.M.T. Machado, Isabela S. Probst, Gabriela Soares da Silva e Cristiane Mengue Feniman que me ensinaram e me ajudaram muito durante o curso de mestrado.

Ao Prof. Dr. Julio Toshimi Doyama e Profa. Dra. Margarida Juri Saeki pela análise cromatográfica dos óleos essenciais;

Ao prof. Dr. Luciano Barbosa pela análise estatística dos resultados;

Ao Dr. Leonardo Noburo Seito, pelo auxílio na análise fitoquímica dos extratos;

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Di Stasi pelo auxílio com o projeto no início do mestrado;

À Felipe pela ajuda, amor e estímulo.

Aos amigos pelo apoio e carinho nas horas difíceis.

E à todos que não foram citados mas de alguma maneira contribuíram para a concretização desse sonho.

SUMÁRIO

Resumo.....	01
Abstract.....	02
1. Introdução Geral.....	03
1.1. Compostos químicos ativos e ação antimicrobiana.....	03
1.2. Mecanismo de ação antimicrobiana de plantas medicinais.....	05
1.3. Assa Peixe (<i>Vernonia polyanthes</i> Less) (Asteraceae).....	07
1.4. Camomila (<i>Matricaria chamomilla</i> L) (Asteraceae).....	08
1.5. Alecrim do Campo (<i>Bacharis dracunculifolia</i> D.C.) (Asteraceae).....	09
1.6. Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i> L.) (Myrtaceae).....	09
1.7. <i>Escherichia coli</i>	10
1.8. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.9. Drogas antimicrobianas.....	11
2. Objetivos.....	13
3. Referências Bibliográficas.....	14
CAPÍTULO I – Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais.....	18
Resumo.....	18
Abstract.....	19
1. Introdução.....	20
2. Materiais e métodos.....	21
2.1. Plantas e preparo de extratos e óleos essenciais.....	21
2.2. Análise fitoquímica dos extratos brutos.....	23
2.3. Análise dos óleos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS).....	23
2.4. Linhagens bacterianas.....	24
2.5. Ensaios de sensibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	24
2.6. Análise Estatística.....	25
3. Resultados.....	25
3.1. Análise fitoquímica dos extratos, composição química dos óleos, densidade de óleo, peso seco dos extratos e rendimento dos	

óleos.....	25
3.2. Concentração Inibitória Mínima.....	26
4. Discussão e Conclusão.....	28
5. Agradecimentos.....	31
6. Referências Bibliográficas.....	32
CAPITULO II – Sinergismo entre extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e	
drogas antimicrobianas.....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	37
1. Introdução.....	38
2. Materiais e métodos.....	40
2.1. Plantas e preparo de extratos e óleos.....	40
2.2. Linhagens bacterianas.....	41
2.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os produtos vegetais e	
drogas antimicrobianas.....	41
2.4. Sinergismo entre óleos e extratos das plantas e drogas antimicrobianas	
pelo método de disco (Kirby&Bauer).....	42
2.5. Verificação do sinergismo pelo método da curva de	
sobrevivência.....	42
2.6. Análise estatística.....	43
3. Resultados.....	43
3.1. Análise dos produtos naturais (peso seco e rendimento).....	43
3.2. Resultados para valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	44
3.3. Sinergismo entre produtos antimicrobianos pela metodologia dos	
discos.....	44
3.4. Determinação de sinergismo através de curvas de sobrevivência.....	46
4. Discussão e Conclusão.....	51
5. Agradecimentos.....	53
6. Referências Bibliográficas.....	54
ANEXOS.....	57

Resumo: A propriedade antimicrobiana das plantas pode ser explicada pela produção de compostos ativos gerados durante o metabolismo secundário. Atualmente os conhecimentos, as vezes empíricos, desta propriedade têm sido confirmados cientificamente, revelando assim o enorme potencial das plantas no controle de doenças infecciosas, enquanto verifica-se um aumento nos casos de microrganismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos conhecidos. Extratos e óleos essenciais de plantas têm mostrado efeitos sobre desenvolvimento de microrganismos em inúmeras situações, o que sugere uso prático destes produtos. O estudo teve por objetivo comparar a ação inibidora de extratos e óleos essenciais de quatro plantas (Pitanga - *Eugenia uniflora*, Alecrim do Campo - *Baccharis dracunculifolia*, Camomila - *Matricaria chamomilla* e Assa Peixe - *Vernonia polyanthes*) sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, através da diluição dos antimicrobianos vegetais em meio Mueller Hinton Agar e verificação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM). De maneira geral verificou-se efeito antimicrobiano para todos os produtos vegetais, com uma discreta tendência de maior susceptibilidade para a bactéria Gram positiva. Os resultados apontam os extratos de pitanga e assa peixe como os mais efetivos sobre *S.aureus* e *E.coli*. Em relação aos óleos, os óleos de alecrim do campo e pitanga foram os mais eficientes sobre *S.aureus*. Para *E.coli*, evidenciou-se os óleos de assa peixe e alecrim do campo como os mais eficientes. Em uma segunda etapa do estudo verificou-se possíveis interações entre estes derivados vegetais com drogas antimicrobianas utilizando metodologia dos discos, adaptado de Kirby&Bauer e através da determinação de curvas de sobrevivência utilizando misturas entre as drogas convencionais e antimicrobianos vegetais. Foi verificado nos testes *in vitro* uma taxa maior de sinergismo entre drogas e óleos essenciais, sendo que os óleos essenciais de alecrim do campo e assa peixe mostraram maior frequência de sinergismo com as drogas testadas. Pelos resultados obtidos ficou estabelecida a capacidade antimicrobiana dos produtos vegetais testados, bem como foi possível *in vitro* o sinergismo com drogas convencionais. Porém, estudos futuros são necessários, especialmente para quantificar em outros modelos experimentais, como por exemplo, *in vivo*, esta propriedade antimicrobiana bem como esclarecer os mecanismos das interações com as drogas antimicrobianas utilizadas na terapêutica de doenças infecciosas.

Palavras chaves: Sinergismo, ação antimicrobiana, plantas medicinais, óleos essenciais, extratos brutos, drogas antimicrobianas.

Comparative study of antimicrobial activity of extracts and essential oils of medicinal plants and synergism with antimicrobial drugs

Abstract: The antimicrobial property of plants can be explained by the production of active compounds generated during the secondary metabolism. Currently the knowledge, often empirical, of this property has been confirmed scientifically, thus revealing the potential of plants in the control of infectious diseases, while there is an increasing incidence of pathogens resistant to known antibiotics. Extracts and essential oils of plants have shown effects on development of micro-organisms in many situations, suggesting the practical use of these products. The study aimed to compare the inhibitory action of extracts and essential oils of four plants (Surinam Cherry - *Eugenia uniflora*, “Alecrim do Campo” - *Baccharis dracunculifolia*, Chamomile - *Matricaria chamomilla* and “Assa Peixe” - *Vernonia polyanthes*) on strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, through dilution of plant antimicrobials in Mueller Hinton Agar and the minimal inhibitory concentration (MIC) values were performed. In general it was found antimicrobial effectiveness for all plant products, with a slight tendency for increased susceptibility to Gram positive bacteria. The results show the extracts of Surinam cherry and “assa peixe” as the most effective on *S. aureus* and *E.coli*. For waste oils, “alecrim do campo” and Surinam cherry were the most effective on *S. aureus*. For *E.coli*, there was the oils of “alecrim do campo” and “assa peixe” as the most efficient. In a second step of the present study, possible interactions between these plant derivatives from antimicrobial drugs using discs methodology adapted from Kirby & Bauer and by determining the survival curves using mixtures of conventional drugs and antimicrobial plant. It was observed *in vitro* tests a higher rate of synergism between drugs and essential oils, and essential oils of “alecrim do campo” and “assa peixe” showed a higher frequency of synergism with drugs. From the results it was established the ability of antimicrobial plant products tested, and it was possible *in vitro* synergism with conventional drugs. However, further studies are needed, especially to quantify in other experimental models, such as *in vivo*, the antimicrobial property and to clarify the mechanisms of interaction with the antimicrobial drugs used in the treatment of infectious diseases.

Key words: Synergism, antimicrobial action, medicinal plants, essential oils, extracts, antimicrobial drugs.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de nem sempre terem seus constituintes químicos conhecidos. Em todo o mundo, e em particular nos países da América do Sul, o uso de plantas medicinais contribui significativamente com os primeiros cuidados com a saúde (Maciel et al., 2002).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (Veiga Jr. et al., 2005).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta. O País possui a mais diversa flora, número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado. Atualmente, aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem uma importante fonte para obtenção de medicamentos (Carvalho et al., 2007).

As doenças infecciosas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre humanos, especialmente nos países em desenvolvimento. Assim, as indústrias farmacêuticas têm sido motivadas para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas nos últimos anos, especialmente em função da ocorrência de resistência microbiana a tais medicamentos. Em geral, bactérias têm habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas usadas como agentes terapêuticos (Nascimento et al. 2000), pois são freqüentes os relatos sobre isolamentos de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de uso na rotina, mas que se tornam resistentes a todos, ou a quase todos, fármacos disponíveis no mercado (Sakagami e Kajamura, 2006).

1.1. Compostos químicos ativos e ação antimicrobiana

Uma planta pode conter muitos metabólitos secundários, mas apenas os compostos que estão em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica, mas analisar os compostos ativos é uma tarefa mais complexa e longa, pois

geralmente os compostos minoritários estão entre os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isso é indispensável analisar a potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração. A partir desta avaliação podemos prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (Cechinel Filho e Yunes, 1998).

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) muitos são os fatores ambientais capazes de influenciar a quantidade e qualidade dos compostos secundários das plantas (Figura 1).

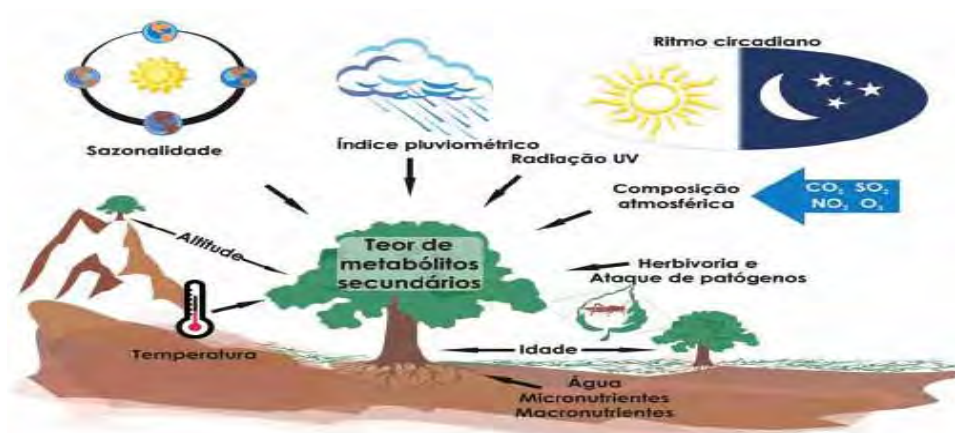


Figura 1 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas (Gobbo-Netto & Lopes, 2007).

A maioria das plantas possui compostos que são antimicrobianos e as protegem de microrganismos. Na Figura 2 são apresentadas as fórmulas estruturais de alguns compostos antimicrobianos que são encontrados em plantas.

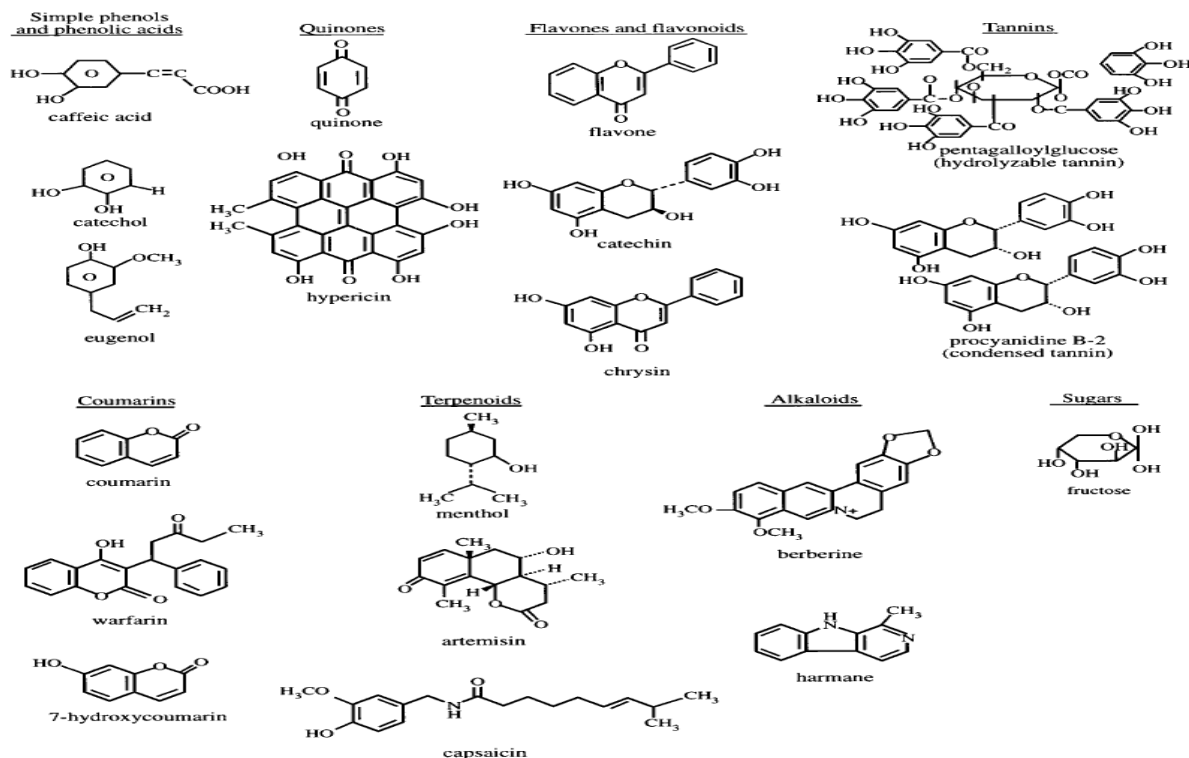


Figura 2 – Fórmulas estruturais de compostos antimicrobianos (Cowan, 1999)

Os compostos ativos encontrados em algumas plantas possuem ação antisséptica como, por exemplo, o timol e carvacrol, o eugenol e isoeugenol e o terpinenol-4. Em alguns casos os terpenos das essências, que são hidrossolúveis, têm maior poder antibacteriano que outros (Knobloch et al., 1989).

1.2. Mecanismo de ação antimicrobiana de plantas medicinais

Os locais, ou estruturas, da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os componentes de produtos naturais são ilustrados na Figura 3. Geralmente os mecanismos de ação de compostos naturais são desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios serem afetados em consequência de outros mecanismos (Burt, 2004).

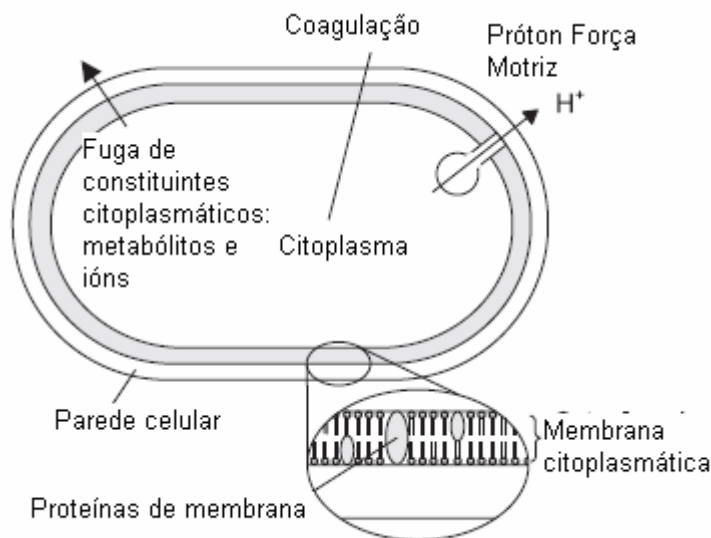


Figura 3 - Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana (Adaptado de Burt, 2004)

Uma característica importante, responsável pela ação antimicrobiana que os óleos essenciais apresentam, são os componentes hidrofóbicos que permitem a partição de lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas e tornando-as mais permeável (Sikkema, 1994).

Componentes de óleos essenciais agem também em proteínas da membrana citoplasmática (Knobloch et al., 1989). Hidrocarbonetos cíclicos poderiam agir sobre enzimas ATPases que são conhecidas por estarem localizados na membrana citoplasmática e rodeadas por moléculas lipídicas. E hidrocarbonetos lipídicos poderiam distorcer a interação lipídio-proteína, interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas da proteína são possíveis (Sikkema, 1995). Alguns óleos essenciais estimularam o crescimento de pseudomicélios, uma indicação de que pode atuar sobre enzimas envolvidas na síntese de componentes estruturais das bactérias (Conner e Beuchat, 1984).

Na sequência são relacionados alguns compostos e seu mecanismo de ação sobre microrganismos.

Carvacrol e timol: Timol possui estrutura similar ao carvacrol, diferem pela localidade do grupo hidroxila sobre o anel fenólico. As duas substâncias parecem tornar a membrana permeável (Lambert et al., 2001). Ambas as estruturas desintegram a membrana externa de bactérias Gram negativas liberando os lipopolissacarídeos (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP. A presença de cloreto de magnésio não

influencia nesta ação sugerindo um mecanismo de quelação de cátions diferente na membrana externa (Helander et al., 1998).

Eugenol: Concentrações de eugenol inibiram a produção de amilase e protease por *B. cereus*, degradação da parede celular e lise celular também foram encontradas (Thoroski et al., 1989).

p-Cimeno: Precursor do carvacrol, é hidrofóbico e provoca maior inchaço da membrana citoplasmática do que o carvacrol (Ultee et al., 2002).

Carvone: Quando testado em concentrações maiores do que a sua concentração inibitória mínima (CIM), o carvone dissipa o pH gradiente e o potencial da membrana celular. O crescimento de *E. coli*, *Streptococcus thermophilus* e *L. lactis* diminuiu de acordo com as concentrações de carvone, sugerindo que ele atue perturbando o estado metabólico geral da célula (Oosterhaven et al., 1995).

Cinamaldeído: O cinamaldeído é conhecido por ter ação inibitória sobre *E. coli* e *Salmonella Typhimurium* em concentrações parecidas com as do carvacrol e timol, mas não desintegra a membrana externa e nem enfraquece o ATP intracelular (Helander et al., 1998). O grupo carbonila tem afinidade com proteínas prevenindo a ação de aminoácidos descarboxilases em *E. aerogenes* (Wendakoon e Sakaguchi, 1995).

Na Tabela 1 são apresentados os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos vegetais de acordo com as classes já estudadas.

1.3. Assa Peixe (*Vernonia polyanthes* Less) (Asteraceae)

O assa peixe é uma planta perene nativa do território brasileiro que se espalha por sementes. É conhecida como planta daninha chegando a anular a lotação das pastagens (Lorenzi, 2000).

Apesar de no Brasil ser forte seu uso na medicina popular, suas propriedades químicas e farmacológicas ainda não foram muito bem descritas. Mas estudo mostra os efeitos de extrato de assa peixe em infecção urinária e taxa de fluxo urinário, assim como melhorando sintomas gastrointestinais e respiratórios (Costa-Neto e Oliveira, 2000).

Em estudo recente, Braga et al. (2007) observaram uma ação inibidora potente de extrato de assa peixe sobre linhagens de *Leishmania*, porém, embora fosse objetivo também do estudo verificar ação antifúngica do mesmo extrato, esta atividade não foi verificada nas condições que os ensaios foram realizados.

O extrato da própolis do assa peixe apresentou ação antimicrobiana contra *Paenibacillus larvae* em um estudo de Bastos et al. (2008) e Oliveira et al. (2007) relataram

que os extratos hidroalcoólicos de *V. polyanthes* apresentaram significativa ação antimicrobárias.

Tabela 1 - Principais classes de compostos com atividade antimicrobiana obtidas de plantas

Classe	Subclasse	Exemplos	Mecanismo
Fenólicos	Fenóis simples	Catecol	Impedir entrada de substrato
		Epicatequina	Desintegração da membrana
	Fenólicos ácidos	Ácido Cinâmico	?
	Quinonas	Hipericina	Ligação com adesinas, inativa enzimas, complexação com parede celular
	Flavonóide	Crisina	Ligação com adesinas
	Flavonas		Complexo com parede celular
		Abissinona	Inativa enzimas e inibi HIV transcriptase reversa
	Taninos	Ellagitânica	Privação de substrato, perturbação de membrana, Ligação com adesinas, inativa enzimas, ligação com proteínas, complexos com íon metal
	Cumarinas	Warfarina	Interação com DNA eucarioto (Atividade Antiviral)
Terpenóides, óleos essenciais		Capsaicina	Desintegração da membrana
Alcalóides		Berberina	Interage com parede celular e/ou DNA
		Piperina	
Lectinas e Polipeptídeos		Aglutinina manose específica	Forma pontes dissulfeto e interfere com a replicação viral
Poliacetilenos			?

Fonte: Adaptado de Cowan (1999)

1.4. Camomila (*Matricaria chamomilla* L) (Asteraceae)

Pertence a família Asteraceae, são plantas de hábito muito variado, que incluem ervas, subarbustos, trepadeiras ou excepcionalmente árvores. A grande maioria dos gêneros é constituída por plantas de pequeno porte (Joly, 1985).

O gênero *Matricaria* é frequentemente usado como fonte de fitofármacos de grande importância (Dragland et al., 2003), e empregado como componente de chás e ingrediente valioso no preparo de tinturas e extratos. Em alguns países como Argentina, Egito e Alemanha as áreas de plantio de *Matricaria* tem sido aumentadas com frequência. Devido ao grande conteúdo de ingredientes de seu óleo essencial, as flores de *Matricaria* são de especial valor, apesar de sua extrema facilidade de deteriorar (Zaiter et al., 2007).

É uma das plantas de uso mais antigo pela medicina tradicional européia, hoje incluída nas Farmacopéias de quase todos os países. Sua ação emenagoga foi descoberta

empiricamente por Dioscorides na Grécia antiga e comprovada cientificamente 2.000 anos mais tarde (Lorenzi & Matos, 2002).

Asolini et al. (2006) observaram que a camomila possui atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*.

1.5. Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia* D.C.) (Asteraceae)

A *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) é uma planta arbustiva que ocorre no Brasil, de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, nos países do Mercosul (Ferronato, 2007) e nos vales elevados da Bolívia (Loyaza et al., 1995). Nos estudos de atividades biológicas evidenciam-se os efeitos alelopáticos, antimicrobianos, citotóxicos, hipoglicemiantes e antiinflamatórios (Loyaza et al., 1995; Duarte et al., 2004; Barbosa-Filho et al., 2005). Em estudos realizados por Ferronato et al. (2007) é relatado que óleo de *Baccharis dracunculifolia* mostrou atividade inibitória sobre crescimento microbiano das cepas testadas (*E.coli*, *S.aureus*, *P. aeruginosa*). Além disto, são freqüentes os relatos que mencionam que o alecrim do campo é a planta considerada responsável pela elaboração da chamada própolis verde pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* (Sousa, 2007).

1.6. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (Myrtaceae)

A *Eugenia uniflora* L. é conhecida popularmente como pitanga e por ser excitante, febrífuga, antirreumática e antidisentérica (Mors, 2000 apud Lorenzi e Matos, 2002).

Eugenia uniflora L. pertence à família Myrtaceae, composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies de arbustos e árvores verdes durante todo o ano e cujas folhas opostas, com nervuras marginais são freqüentes nesta família. No Brasil a *Eugenia uniflora* pode ser encontrada em Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Auricchio et al., 2003). Na medicina popular brasileira, ela é usada como anti-diarréico, diurético, anti-reumático, anti-febril e agente anti-diabético. Extratos de folha de pitanga tem sido a base para verificação de ação antiinflamatória (Schapoval et al., 1994). Alguns compostos do extrato de folha de pitanga têm sido mencionados como eficiente na ação inibitória para o Epstein-Barr vírus e também para alguns fungos (Oliveira et al., 2006) além de atividade antimicrobiana sobre bactérias (Holetz et al., 2002).

Auricchio et al. (2007) verificaram a presença de flavonóides e taninos em estudo fitoquímico sobre amostra de *Eugenia uniflora*. Adebajo et al. (1989), tendo por base informações anteriores de que a composição do óleo essencial de frutos e de folhas de

Eugenia uniflora varia qualitativamente e quantitativamente, dependendo do momento da colheita, estação do ano, estágio de maturidade antes da colheita, estudaram estas variações através da avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas e frutos de *E.uniflora*, colhidos em diferentes estágios de maturação. Verificaram que para *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Trichophyton menthagrophytes* a ação antibacteriana foi variada para amostras colhidas em diferentes períodos do dia e em épocas distintas do ano, indicando uma variação na composição do óleo das diferentes amostras.

Segundo Bertucci et al.(2009), em estudos para 3 espécies do gênero *Eugenia*, os autores observaram ação inibidora sobre linhagens de *S.aureus*, *Mycobacterium*, *Candida* e *Aspergillus*.

1.7. *Escherichia coli*

Escherichia coli compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, os antígenos O, K e H. Nem todas as amostras de *E. coli*, provenientes do intestino humano como também de qualquer outro local do organismo, apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo (Trabulsi, 2008). É uma espécie versátil, podendo ser comensal ou pode causar infecções intestinais, urinárias, septicemias, meningites entre outros (Albert et al., 1995). Com relação às *E.coli* enteropatogênicas, as bactérias são classificadas em seis grupos: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EaaggEC), e *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (Quiroga et al.,2000).

1.8. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* apresenta-se na forma de cocos Gram-positivos, isolados ou agrupados em cachos. São anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis e catalase positivos, são bactérias mesófilas, com temperatura de crescimento variando entre 7°C a 47,8°C, com produção de enterotoxina entre 10°C a 46°C (Franco e Landgraf, 1996).

O gênero *Staphylococcus* está subdividido em 40 espécies, que se dividem de acordo com a síntese ou não da enzima coagulase, sendo a maioria, coagulase-negativa, com exceção do *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. coagulans, *S. intermedius*, *S. hyicus* e *S. delphini*

(Bannerman et al. 2003). Dentre as espécies desse gênero, *S. aureus* é considerada a mais importante em função da sua maior patogenicidade ao homem (Von Eiff et al., 2001).

Praticamente qualquer sistema de órgãos é propensa à infecção pelo *S. aureus*, as infecções mais importantes são a bacteremia, endocardites e infecções do trato respiratório (Kanafani, 2006). As bacteremias e endocardites são frequentemente associadas a sérias complicações e alta taxa de morte (Petti, 2003).

1.9. Drogas antimicrobianas

Cloranfenicol: O cloranfenicol é um potente inibidor da síntese de proteínas microbianas e em menor grau, em células eucarióticas (Ruiz & Ramirez, 1990). É um antibiótico produzida a partir de culturas de *Streptomyces Venezuelae* que pode ser facilmente sintetizado em laboratório (Trabulsi, 2008). O cloranfenicol se liga à subunidade 50s do ribossomo interferindo na ligação de novos aminoácidos. É principalmente bacteriostático e o crescimento microbiano recomeça quando se interrompe a administração (Jawetz, 2005).

Gentamicina: Pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, que são produzidos a partir de culturas de *Streptomyces griseus*, são ativos contra Gram negativas aeróbias e alguns estafilococcus (Trabulsi, 2008). Esse grupo tem como característica inibir a síntese protéica ao se ligar a subunidade 30s do ribossomo microbiano causando a morte da bactéria (Jawetz, 2005).

Tetraciclina: As tetraciclinas constituem um amplo grupo de antibióticos de largo espectro. São antibióticos de ação bacteriostática quando usados nas concentrações terapêuticas usuais. Seu mecanismo de ação atua na inibição da síntese protéica bacteriana, impedindo a penetração do RNA-t nos sítios aceptores nos ribossomos (Mims, 1999). Em geral, a ação inibitória é revertida com a suspensão do fármaco e inibe tanto bactérias gram positivas como gram negativas (Jawetz, 2005).

Sulfazotrim: É a junção entre Sulfametoxazol e Trimetoprima. Agem sinergicamente, bloqueando duas enzimas que catalisam estágios sucessivos na via de síntese do ácido tetraidrofólico (Trabulsi, 2008). A sulfonamida é uma droga bacteriostática que tem seu mecanismo de ação relacionado com o metabolismo da síntese protéica e dos ácidos nucleicos (Jawetz, 2005). Trimetoprima impede a incorporação da timina no DNA bacteriano por inibição da dihidrofolatoredutase (Goerke et al., 2005).

Cefalotina: É um antibiótico semi-sintético derivado da cefalosporina que são produzidas por fungos do gênero *Cephalosporium acremonium* (Trabulsi, 2008). Apresenta atividade bactericida sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, inibindo a síntese dos

peptidoglicanos formadores da parede celular e dos septos das bactérias sensíveis em crescimento (Mims, 1999). Bactérias podem se mostrar resistente à cefalotina por apresentarem parede celular impermeável à droga ou porque produzem beta-lactamases que inativam o antibiótico (Jawetz, 2005).

Ciprofloxacina: Ciprofloxacina atua como um agente antibacteriano prendendo DNA girase do DNA e, portanto, bloqueando a replicação (Goerke et al., 2005). Constitui a mais potente quinolona contra microorganismos Gram-negativos, sendo altamente ativa contra as enterobactérias. Apresenta um mecanismo de ação bactericida que age no cromossomo bacteriano, porém ainda não é totalmente conhecido. Ciprofloxacina, um antibiótico fluoroquinolonas, é bem tolerada e muito eficaz contra *E. coli* e *Shigella* (Trabulsi, 2008).

Rifampicina: A rifampicina foi descoberta em 1957, a partir do cultivo de uma cepa de *Streptomyces*, que foi denominada *Streptomyces mediterranei*, isolada pela primeira vez em 1963 (Rieder, 2002). A rifampicina é um composto semi-sintético produzido a partir da rifamicina B, que é obtida comercialmente pela fermentação a partir do *Streptomyces mediterranei* (ATCC 13685) (Floss et al., 2005). É uma rifamicina semi-sintética que apresenta atividade antimicrobiana superior à dos outros membros do grupo, tendo atividade contra Gram positivas e negativas. Interfere na síntese de RNA, ligando-se ao RNA-polimerase. No entanto, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas desenvolvem genes de resistência à rifampicina quando esta é utilizada de maneira isolada e por tempo prolongado. É indicada principalmente para o tratamento de tuberculose, hanseníase e da brucelose (Jawetz, 2005).

Cefepime: É uma cefalosporina de quarta geração que se revela ativa contra enterobactérias, pseudomonas e bactérias Gram-positivas (Jawetz, 2005), além de algumas bactérias anaeróbias (Trabulsi, 2008). Apresenta atividade contra microorganismos produtores de beta-lactamases, tanto de origem plasmidial como cromossômica (Jawetz, 2005).

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi verificar a ação antibacteriana de óleos e extratos das plantas medicinais Camomila (*Matricaria chamomilla* L.), Assa Peixe (*Vernonia polyanthes* Less), Alecrim do Campo (*Baccharis dracunculifolia* D.C.) e Pitanga (*Eugenia uniflora* L) sobre linhagens de *S. aureus* e *E.coli* isoladas de casos clínicos humanos;

Os objetivos específicos foram a determinação da concentração inibitória mínima, verificar ocorrência de interações desses produtos vegetais com drogas através da metodologia baseada no método dos discos (Kirby&Baueur) e confirmação dos casos de sinergismo pelo método de curva de sobrevivência, e verificar os compostos presentes nos extratos e óleos essenciais estudados.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, M.J., Faruque, S.M., Faruque, A.S.G., Neogi, P.K.B., Ansaruzzaman, M., Bhruian, K.A., Akbar, M.S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infection in Bangladesh children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 973-977, 1995.
- Asolini, F.C., Tedesco, A.M., Carpes, S.T., Ferraz, C., Ferraz, S.M. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds from extracts of plants used as tea. **Brazilian Journal Food Technology**, v.9, p. 209-215, 2006.
- Auricchio, M. T., Bacchi, E. M. *Eugenia uniflora* L. “brazilian cherry” leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. **Adolfo Lutz Institute Journal**, v.62, n.1, p.55 – 61, 2003.
- Auricchio, M. T., Bugno, A., Barros, S. B. M., Bacchi, E. M. Antimicrobial and Antioxidant Activities and Toxicity of *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.1, p.76-81, 2007.
- Bannerman, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In Murray, P.R; Baron, E.J; Jorgense, J.H. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: American Society Microbiology, 2003. p.384-404.
- Barbosa Filho, J.M., Vasconcelos T.H.C., Alencar A.A., Batista L.M., Oliveira R.A.G., Guedes D.N., Falcão H.S., Moura M.D., Diniz M.F.F.M., Modesto-Filho J., Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.15, n. 4, p. 392-413. , 2005.
- Bastos, E.M.A.F., Simone, M., Jorge, D.M., Soares, A.E.E., Spivak, M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.97, n.3, p. 273–281, 2008.
- Bertucci, A., Olivaro, C., Silva, P.A., Ramos, D., Cerdeiras, M.P , Vázquez, A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.1A, p.20-25, 2009.
- Braga F.G., Bouzada M.L.M., Fabri R.L., Matos M.O., Moreira F.O., Scio E., Coimbra E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p. 396-402, 2007.
- Burt, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, 223-253, 2004.
- Carvalho, A.C.B., Nunes, D.S.G., Baratelli, T.G., Shuqair, N.S.M.S.A. Q., Netto, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p.26-32, 2007.

- Cechinel Filho, V., Yunes, R.A. Estrategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Concepts about structural modification for improve the activity. **Química nova**, v.21,n.1, p.99-105, 1998.
- Costa-Neto, E.M., Oliveira, M.V.M. The use of medicinal plants in the county of Tanquinho, state of Bahia, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medicinal Plants**, v. 2, n.2, p. 1–8, 2000.
- Cowan, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564-582, 1999.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K., Blomhoff, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. **Journal of Nutrition**, v.133, n.5, p.1286-1290, 2003.
- Duarte M.C.T., Figueira G.M., Pereira B., Magalhães P.M., Delarmelina C., Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.14, supl.1, p. 6-8. 2004.
- Fernandez, M.M., De Marzi, M.C., Berguer , P., Burzyn, D., Langley, R.J., Piazzon, I., Mariuzza, R.A., Malchiodi, E.L. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. **Molecular Immunology**, v.43, n.7, p. 927-938, 2006.
- Ferronato R., Marchesan E.D., Pezenti E., Bednarski F., Onofre S.B., Antimicrobial activity of essential oils produced by *Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.2, p.224-230., 2007.
- Floss H.G., Yu T.W. Rifamycin - Mode of action, resistance and biosynthesis. **Chemical Reviews**, v.105, n.2, p.621-32, 2005.
- Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182p, 1996.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.
- Goerke, C., Köller, J., Wolz, C. Ciprofloxacin and Trimethoprim Cause Phage Induction and Virulence Modulation in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, n.1, p. 171–177, 2005.
- Holetz F.B., Pessini G.L., Sanches N.R., Cortez D.A.G., Nakamura C.V. and Filho B.P.D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027–1031, 2002.

- Jawetz, E., Melnik, J., Adelberg, E., Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. **Microbiologia médica**, 22^oed., McGraw-Hill, Rio de Janeiro, p.131-160, 2005.
- Joly, A. B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. 7^a ed. São Paulo: Nacional, 1985. 151p.
- Kanafani, Z.A., Fowler, V.G. Jr. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.24, n.3, p.182-93, 2006.
- Loyaza I.; Abujder D.; Aranda R.; Jakupovic J.; Collin G.; Deslauriers H.; Jean F.-I., Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, n.2, p. 381-389, 1995.
- Lorenzi, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2000, 608 p.
- Lorenzi, H., Matos, J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2002, 512 p.
- Maciel M. A. M., Pinto A. C., Veiga Jr V. F., Grynberg N. F., Echevarria A. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**, v.25, p 429 – 438, 2002.
- Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelin, D., Williams, R. **Microbiologia médica**. 2 ed. São Paulo: Manole Ltda; 1999, 411:442
- Nascimento G.G.F., Locatelli J., Freitas P.C., Silva G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p. 247-256, 2000.
- Oliveira, D.G., Prince K.A., Higuchi C.T., Santos A.C.B., Lopes L.M.X., Simões M.J.S., Leite C.Q.F. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v.28, n.2, p. 165-169, 2007.
- Oliveira, R.A.G., Lima, E. O., Vieira, W.V., Freire, L. K.R., Trajano, V.N., Lima, I.O., Souza, E.L., Toledo, M.S., Silva-Filho, R.N. Study of the interference of essential oils on the activity of some antibiotic used clinically. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.1, p. 77-82, 2006.
- Petti, C.A., Fowler, V.G.Jr. *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. **Cardiology Clinics**, v. 21, n.2, p. 219-233, 2003.
- Quiroga, M., Oviedo, P., Chinen, I., Pegels, E., Husulak, E., Binztein, N., Rivas, M., Schiavoni, L., Vergara, M. Asymptomatic infections by diarrheagenic *Escherichia coli* in children from Misiones, Argentina, during the first twenty months of their lives. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v.42, n. 1, p. 9-15, 2000.

- Rieder, H.L. **Interventions for tuberculosis control and elimination**. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD), 249 p., 2002.
- Sakagami Y., Kajamura K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin – resistant Enterococci. **Journal of Hospital Infection**, v.50, n.2, p.140-144, 2002.
- Sousa, J.P.B., **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Bacharis dracunculifolia*, cultivada utilizando cromatografia em fases gasosas e líquidas**. Ribeirão Preto. 164p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2007.
- Trabulsi, L.R., Alterthum, F., **Microbiologia**, 5ª ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 2008, 760 p.
- Veiga Junior, V. F., Pinto A.C., Maciel, M. A. M. Medicinal plants; safe cure? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.
- Von Eiff, C.; Becker, K.; Machka, K.; Stammer, H.; Peters, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n.1, p. 11-6, 2001.
- Zaiter L., Bouheroum M., Benayache S., Benayache F., León F., Brouard I., Quintana J., Estévez F. and Bermejo J., Sesquiterpene lactones and other constituents from *Matricaria chamomilla* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, n.8,p.533-538, 2007.

Manuscrito elaborado conforme instruções em Journal of Ethnopharmacology

CAPÍTULO I – Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais

Nathalia Cristina da Silva Cirone^a, Ary Fernandes Júnior^a

^a Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

Corresponding author. Tel.: +55 14 38116058; fax: +55 14 38116058236

E-mail address: ary@ibb.unesp.br (A. Fernandes Júnior).

Resumo: Atualmente as várias propriedades biológicas de plantas medicinais têm sido confirmadas, sendo que os relatos de ação antimicrobiana destas aumentam proporcionalmente ao surgimento de linhagens de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos conhecidos. Desta forma, objetivou-se estabelecer uma caracterização fitoquímica de extratos brutos e óleos essenciais de pitanga (*Eugenia uniflora*), alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), camomila (*Matricaria chamomilla*) e assa peixe (*Vernonia polyanthes*) e testar a ação antimicrobiana sobre 16 linhagens de *Staphylococcus aureus* e 16 de *Escherichia coli*, isoladas de casos clínicos humanos, através da determinação dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) pela metodologia da diluição. Verificou-se, pelos resultados obtidos, a presença de alguns compostos reconhecidamente com propriedades antimicrobianas, como por exemplo, os compostos fenólicos. Quanto a ação antimicrobiana dos produtos vegetais, verificou-se que os óleos essenciais foram mais eficientes que os extratos, sendo que os extratos de pitanga e assa peixe se destacaram frente as bactérias e os óleos essenciais de pitanga e alecrim do campo foram mais eficientes contra *S.aureus*, enquanto para *E.coli* os óleos essenciais de alecrim do campo e assa peixe foram os mais eficientes. Verificou-se também que a bactéria *S. aureus* foi mais susceptível aos produtos vegetais que a *E. coli*.

Palavras chaves: extratos alcóolicos, óleos essenciais, plantas medicinais, ação antibacteriana, análise fitoquímica

Antimicrobial activity and phytochemical analysis of extracts and essential oils of medicinal plants

Abstract: Currently the various biological properties of medicinal plants have been confirmed, and the reports of the antimicrobial action of these increases proportionally to the emergence of pathogenic bacteria resistant to antibiotics known. Thus, it was aimed to establish a phytochemical analysis of crude extracts and essential oils of Surinam cherry (*Eugenia uniflora*), “alecrim do campo” (*Baccharis dracunculifolia*), chamomile (*Matricaria chamomilla*) and “assa peixe” (*Vernonia polyanthes*) and test the antimicrobial activity of 16 strains *Staphylococcus aureus* and 16 *E. coli* isolated from human clinical cases, by determining the values of minimal inhibitory concentration (MIC) by dilution methodology. There was, for the results obtained, the presence of some compounds with known antimicrobial properties, such as phenolic. As the antimicrobial activity of plant products, it was found that essential oils had a higher efficiency than the extracts and that stood out for *S. aureus* the extracts of Surinam cherry and “assa peixe” and essential oils of “alecrim do campo” and Surinam cherry while for *E. coli*, extracts of Surinam cherry and “assa peixe”, and essential oils of “assa peixe” e “alecrim do campo” had the best antimicrobial efficiency. There was also that the bacterium *S. aureus* was more susceptible to plant products than *E. coli*.

Key Words: crude extracts, essential oils, medicinal plants, antibacterial activity, phytochemical analysis

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma estratégia antiga utilizada por praticamente todas as populações do mundo. Registros históricos datados desde 4.000 a.C. comprovam a utilização de plantas na busca pela cura de enfermidades nos povos egípcios, chineses, entre outros. Atualmente, especialmente na Ásia, África e América Latina, existe uma dependência na medicina tradicional como uma solução alternativa para problemas de saúde da população. No Brasil é comum, tanto nas regiões mais pobres do país como também nas grandes cidades brasileiras, o comércio de plantas medicinais em feiras livres, mercados populares e até mesmo plantadas nos quintais das casas (Duarte, 2006). As plantas eram usadas pelos povos indígenas em rituais de cura, da mesma maneira que os povos africanos faziam com rituais religiosos. Hoje, a fitoterapia tem adeptos em todo o mundo, e seu uso é cada vez mais difundido tanto na população em geral como pela comunidade médica. Isto tem resultado no aumento de pesquisas e estudos científicos envolvendo plantas medicinais na busca por novas drogas naturais (Duarte, 2006).

As plantas medicinais apresentam inúmeros compostos ativos que as tornam importantes para a busca de novos usos terapêuticos. Esses compostos, sintetizados pelas plantas durante o chamado metabolismo secundário, apresentam diversas propriedades biológicas, com destaque aqui para a ação antimicrobiana, que tem sido foco de inúmeros estudos no mundo inteiro devido ao aumento dos casos de resistência bacteriana às drogas antimicrobianas, embora o setor farmacêutico tenha desenvolvido novas drogas antimicrobianas. Desta forma, justificam-se os estudos com objetivo de obter um melhor conhecimento das propriedades das plantas, mesmo das que já tiveram seu potencial antimicrobiano comprovado (Schelz et al., 2006).

A *Eugenia uniflora* L. (pitanga), pertence à família Myrtaceae composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies (Tyler, 1996). Esta família possui espécies que produzem inúmeros compostos fenólicos com ação antioxidante. A pitanga é uma planta de frutos comestíveis, muito conhecida e apreciada no Brasil, e na medicina popular brasileira, ela é usada como anti-diarréico, diurético, anti-reumático, anti-febril e agente anti-diabético. Extratos de folha de pitanga tem sido a base para verificação de ação antiinflamatória (Schapoval et al., 1994) bem como a inibição de DNA polimerase de Epstein-Barr vírus (Lee et al. 2000) e também para alguns fungos (Oliveira et al., 2006) além de atividade antimicrobiana sobre bactérias (Holetz et al., 2002).

O gênero *Baccharis* (família Asteraceae) é constituído por mais de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, ocupando as

regiões mais elevadas. A partir das folhas da *B. dracunculifolia* e *B. genistelloides* do sudeste do Brasil são extraídos, por arraste a vapor, óleo de vassoura e óleo de carqueja, respectivamente, de alto valor para a indústria de fragrância. Terpenóides e flavonóides são os constituintes mais encontrados no gênero *Baccharis* (Verdi, 2005) e a espécie *Baccharis dracunculifolia* apresenta também compostos fenólicos (Funari, 2007). Sobre o alecrim do campo existem estudos que comprovam ação antimicrobiana dessa planta (Duarte et al., 2004, Ferronato et al., 2007).

Vernonia polyanthes L. pertence a família Asteraceae e é conhecida por assa-peixe. Suas folhas são empregadas na medicina popular em quadros de gripes, resfriados, tosses, bronquite, contusões, hemorróidas e infecções do útero, além de ser produtora de óleo essencial (Corrêa et al., 2004). Estudos revelaram também a sua ação sobre micobactérias (Oliveira et al., 2007).

A Camomila (*Matricaria chamomila*) além de apresentar atividade antimicrobiana (Romero et al., 2005, Asolini et al., 2006) é utilizada na forma de chá para cura de doenças do trato gastrointestinal como flatulência, diarreia, espasmos, colite, gastrite e hemorróidas, e também do sistema nervoso como agitação e insônia (Fragoso et al., 2008).

Pelo exposto, objetivou-se verificar a ação antimicrobiana de extratos e óleos de quatro plantas (pitanga, alecrim do campo, assa peixe e camomila) frente linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e também avaliar os constituintes químicos dos respectivos extratos brutos e dos óleos essenciais dessas plantas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Plantas e preparo de extratos e óleos essenciais

Para preparo dos extratos hidrometanólicos e óleos essenciais foram utilizados folhas de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), e de assa peixe (*Vernonia polyanthes*) coletadas em áreas próximas ao campus da UNESP–Botucatu no máximo até 9 horas da manhã, sendo feita também as coletas de amostras para identificação botânica e obtenção de exsicatas, contendo informações sobre local de coleta, coletores e descrição geral do local onde os exemplares foram obtidos. A amostra de camomila (*Matricaria chamomilla*) (flores) foi obtida na forma desidratada junto a empresa CentroFlora-Anidro/Botucatu/SP, tendo também sido depositada exsicata desta amostra. Quanto a pitanga (*Eugenia uniflora*), as folhas foram obtidas de produtor de óleos essenciais da região de Águas de Santa Barbara/SP (Fazenda Alpina – Ivo Gregori Ltda) e que foram utilizadas no preparo do respectivo extrato hidrometanólico e para respectiva exsicata, tendo estas obtidos os números de depósito

(BOTU 25794-camomila, BOTU 25795-alecrim do campo, BOTU 25796-pitanga e BOTU 25797-assa peixe) no Herbário Profa. Dra. Irina Delanova Gemtchujnicov sob responsabilidade do Depto de Botânica/IBB/UNESP/Botucatu.

Para o preparo dos extratos, após a coleta as folhas foram secas em estufa de circulação forçada de ar a temperatura média de 50°C e após secas, foram moídas em moinho mecânico. Após pesagem do material desidratado foi feita mistura em volumes de solução metanol 70% e mantido em temperatura de geladeira (média $\pm 4^\circ\text{C}$) por período de 48 horas, que após filtração, procedeu-se evaporação do solvente presente no filtrado em evaporador rotativo sob temperatura ao redor de 45°C. O peso seco dos extratos foi determinado em recipientes preparados com folhas de alumínio que previamente pesados receberam volume de 1 mL do extrato, e colocados sobre chapa aquecida para evaporação do solvente. Foram feitas pesagens a cada meia hora, sendo que após três pesagens com valores iguais foi calculado o peso seco do extrato (Betoni et al, 2006).

Os óleos essenciais foram preparados segundo a metodologia clássica de arraste direto pelo vapor d'água, utilizando um equipamento tipo Clevenger, da marca Marconi modelo M480 para camomila, assa peixe e alecrim do campo. Neste caso introduzia-se a planta em compartimento apropriado no equipamento para sofrer o processo de destilação através de vapor d'água no interior do equipamento que promovia destruição celular e conseqüente arraste dos compostos voláteis presentes na planta. O fluxo de vapor d'água e compostos voláteis era direcionado para um condensador, sendo o óleo essencial separado da água, que retornava a caldeira do destilador e o óleo essencial mantido na superfície do frasco tipo Fiorentino do destilador (Souza et al., 2004). No final do processo de extração, os volumes produzidos de óleos foram anotados e na seqüência acondicionados em frascos de vidro tipo âmbar e mantidos em geladeira. O óleo essencial de pitanga foi obtido diretamente de produtor (Fazenda Alpina–Ivo Gregori Ltda), que utilizou metodologia de arraste pelo vapor na produção deste óleo. Os valores de densidade dos óleos essenciais foram obtidos em tubos tipo *ependorfs*, sendo estes pesados (P_1) em balança analítica e depois foi adicionado 1 mL (V) do óleo sendo pesado novamente (P_2). A densidade (D) foi calculada utilizando fórmula a seguir, adaptado de Fonseca e Librand (2008).

$$D = \frac{P_2 - P_1}{V} = \frac{mg}{mL}$$

2.2. Análise fitoquímica dos extratos brutos

A metodologia adotada foi a preconizada por Matos (1988). Extratos de folhas e flores das plantas foram preparados a partir de 50g de cada material seco e pulverizados, submetidos à extração por maceração a frio (4°C) com metanol PA. Após quatro extrações para exaustão das tortas, os extratos filtrados foram concentrados no evaporador rotativo até cerca de 100 mL. Duas alíquotas de 15 mL desses extratos foram secas em béqueres a 50°C em estufa. Aos 70 mL restantes foi adicionada água destilada para completar o volume até 100 mL. Dessa solução hidroalcoólica, 40 mL foram submetidas à hidrólise ácida (adição de HCl até pH 1 a 3) sob refluxo e duas alíquotas de 30 mL foram separadas para os demais testes, conforme fluxograma geral apresentado na Figura 1. Todas as amostras descritas foram submetidas às reações clássicas descritas na marcha fitoquímica segundo Matos (1988), para a detecção de classes gerais de compostos secundários.

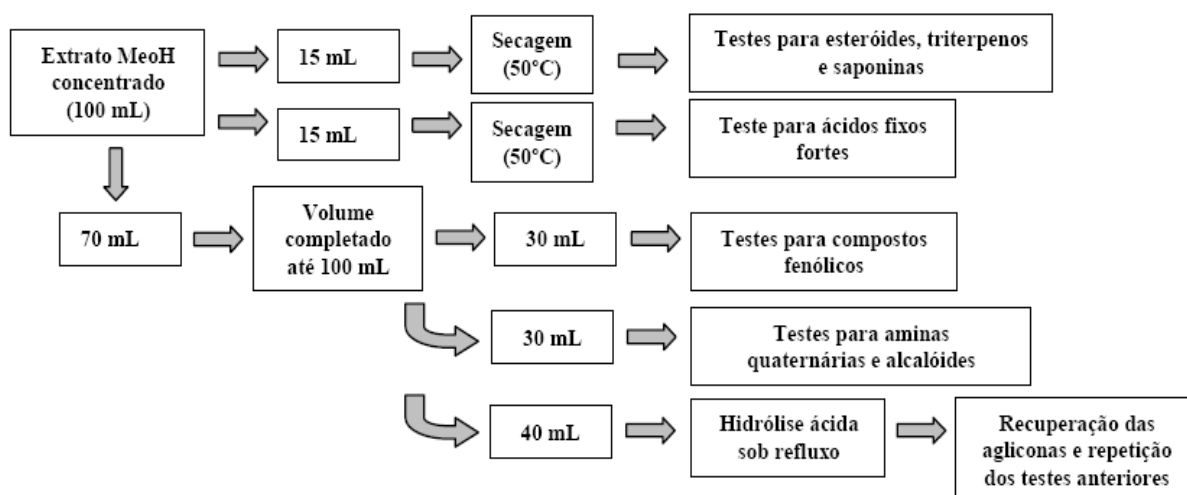


Figura 1: Esquema dos procedimentos para a análise fitoquímica (Matos, 1988).

2.3. Análise dos óleos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-MS) (Adams, 1989)

A análise química foi feita através de um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (GC-MS), da marca SHIMADZU, modelo QP5050A, utilizando-se uma coluna capilar, CBP-5, de 50m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25mm e 0,25µm de espessura do filme. A temperatura do injetor foi de 250°C, a temperatura da interface foi de 250°C, o detector operando em modo EI a 70eV e utilizando-se o He como gás de arraste. As condições cromatográficas adotadas foram as seguintes:

Camomila - Temperatura inicial de 60°C, aquecimento até 100°C, com taxa de 4°C.min⁻¹, aquecimento até 200°C a uma taxa de 6°C.min⁻¹ e manutenção desta temperatura por 3min., e

em seguida aquecimento a $20^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, até 220°C e temperatura constante por mais 25 minutos; **Alecrim do Campo** - Temperatura inicial de 60°C , aquecimento até 160°C , com taxa de $5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, aquecimento até 220°C a uma taxa de $15^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e manutenção desta temperatura por 25 minutos; **Assa Peixe** - Temperatura inicial de 60°C , aquecimento até 180°C , com taxa de $9^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, com manutenção desta por 4 minutos, aquecimento até 220°C a uma taxa de $3^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e manutenção desta temperatura por 4 minutos, aquecimento a $5^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ até 220°C e mantendo-a por 10 minutos; **Pitanga** - Temperatura inicial de 60°C , aquecimento até 160°C , com taxa de $3^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, aquecimento até 220°C a uma taxa de $15^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ e manutenção desta temperatura por 20 minutos. A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi feita com base na biblioteca NIST, análise dos espectros de massas e também nos dados da literatura.

2.4. Linhagens bacterianas

Linhagens de bactérias testadas foram das espécies *S. aureus* (n=15 + ATCC 25923) e *E. coli* (n=15 + ATCC25922) isoladas de casos clínicos humanos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. As linhagens foram reativadas em placas de Agar Sangue e encontravam-se identificadas (Koneman et al., 2001) e estocadas a -70°C . O parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP para utilização das amostras bacterianas foi obtido no dia 06/04/2009 com o protocolo CEP sob numero 3.152-2009.

2.5. Ensaios de sensibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foram realizados testes preliminares de acordo com a diluição dos produtos vegetais em Brain Heart Infusion (BHI-Difco) contendo concentrações em mg/mL, e inoculação de um valor aproximado de 10^5 UFC/mL para uma linhagem padrão de *S. aureus* (ATCC 33591) e outra de *E. coli* (ATCC 25922), e incubação a $37^{\circ}\text{C}/24$ horas e sub-culturas para quantificação da faixa de concentração dos respectivos produtos vegetais capaz de inibir o crescimento microbiano (CLSI/NCCLS, 2005).

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos respectivos produtos vegetais foram obtidas utilizando a metodologia da diluição dos antimicrobianos vegetais em placas de Petri com Mueller Hinton Agar (MHA-Difco) (volume final de 20 mL) mais 0,2% de Tween 80. As concentrações, inicialmente obtidas em %v/v (para os óleos concentrações entre 0,05 a 3 %v/v e extratos de 2 a 44%v/v), tiveram seus valores convertidos em mg/mL para cada um

dos produtos vegetais. Foram preparadas placas controles do crescimento normal das bactérias (Silva et al., 2009). Os ensaios foram realizados em duplicatas.

A inoculação das linhagens nas placas de MHA, contendo concentrações dos derivados vegetais, foi feita com multiinoculador de Steer utilizando 32 suspensões bacterianas padronizadas na escala 0,5 de MacFarland, obtendo-se uma concentração bacteriana final ao redor de 10^5 - 10^6 UFC/mL, seguida de incubação a 37°C/18-24 horas. Os valores de CIM foram considerados aqueles em que não eram verificadas formação de colônias (NCCLS, 2003), sendo na seqüência utilizados para determinação das respectivas CIM90%.

2.6. Análise estatística

Os resultados de CIM foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para confrontar tratamentos independentes. Com análise significativa ($p < 0,05$), foram aplicados os testes de Dunn e o de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas entre os tratamentos (SAS for Windows versão 9.1.3).

3. RESULTADOS

3.1. Análise fitoquímica dos extratos, composição química dos óleos, densidade de óleo, peso seco dos extratos e rendimento dos óleos

Os resultados obtidos de peso seco dos extratos, densidade e rendimento dos óleos, análise fitoquímica dos extratos e dos compostos dos óleos das plantas testadas são apresentados na Tabela 1. Fenóis, flavonóides e ácidos fixos fortes foram estabelecidos em todos os extratos, sendo que a maioria dos compostos encontrados já foi descrito na literatura como compostos com marcante ação antimicrobiana (Cowan, 1999, Silva, 2002, Burt, 2004).

Em relação aos óleos, além dos compostos majoritários apresentados na tabela, o óleo de alecrim do campo apresentou β -pineno, β -mirceno, elemeno, β -cariofileno, germacreno B, cadineno, espatulenol e cadinol; o óleo de camomila β -elemeno, cariofileno, α -farneseno, azuleno, germacreno, spatulenol e óxido de bisabolol; o óleo de pitanga β -mirceno, ocimeno, terpinoleno, β -elemeno, α -cariofileno e espatulenol; e o óleo de assa peixe teve além dos compostos majoritários o β -pineno, carvacrol, copaeno, elemeno, α -cariofileno, espatulenol e δ -cadinol.

Verificou-se também uma diferença considerável nos valores de mg/mL para os produtos vegetais, tendo os extratos um valor de aproximadamente 10% dos valores em mg/mL dos óleos essenciais. Estes valores foram utilizados para transformação da CIM em

%v/v, empregados nos ensaios de sensibilidade, para mg/mL, utilizado na comparação da ação inibidora dos produtos vegetais.

Tabela 1- Aspectos gerais sobre caracterização dos produtos vegetais utilizados

Espécies	Densidade (mg/mL) (Óleos essenciais)	Peso seco (mg/mL) (Extratos)	Rendimento (%)	Compostos presentes nos extratos brutos	Compostos majoritários dos óleos
<i>Eugenia uniflora</i> (pitanga)	924	145	0,19	Fenóis, Taninos, chalconas, auronas, flavonas, catequinas, flavonóides, saponinas, ácidos fixos fortes, bases quaternárias, esteróides livre e quinonas	Selina 1,3,7(11) trien-8- ona(30,1%), Selina 1,3,7(11) trien-8-ona- epoxido (21,89%), β cariofileno (6,51%)
<i>Vernonia polyanthes</i> (assa peixe)	856	62,5	0,15	Fenóis, Taninos, chalconas, auronas, flavonóides, saponinas, ácidos fixos fortes, esteróides livre, quinonas e flavananóis	Germacreno D (27,79%), ε-cariofileno (16, 2%), Germacreno B (15,01%)
<i>Bachararis dracunculifolia</i> (alecrim do campo)	857	76	0,20	Fenóis, Taninos, flavonas, catequinas, flavonóides, saponinas, ácidos fixos fortes, bases quaternárias e xantonas	nerolidol (18,77%), germacreno D (10,45%), limonemo (8,75%)
<i>Matricaria chamomilla</i> (camomila)	940	100	0,17	Fenóis, flavonas, flavonóides, ácidos fixos fortes, bases quaternárias, quinonas, xantonas, triterpenos livres	Camazuleno (31,48%) α-bisabolol e óxido de bisabolona (15,71%)

3.2. Concentração Inibitória Mínima

Os valores obtidos de CIM (%v/v e mg/mL) para 90% das linhagens testadas são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (% v/v e mg/mL) para 90% das linhagens de *S. aureus* e *E. coli* frente aos extratos e óleos essenciais das plantas em estudo.

Microrganismos	Pitanga		Assa Peixe		Alecrim do campo		Camomila	
	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL	%v/v	mg/mL
<i>S. aureus</i> (n=16)								
Extratos	2,0	2,9	2,0	1,24	7,2	5,47	3,7	3,7
Óleos	0,24	2,21	2,8	24,08	0,39	3,35	0,3	2,82
<i>E. coli</i> (n=16)								
Extratos	11,0	15,95	43,4	26,91	42,8	32,53	43,4	43,4
Óleos	3,0	27,6	3,0	25,8	3,0	25,8	3,0	28,2

Observam-se diferenças dos resultados dependendo da forma de apresentar os valores de CIM, seja %v/v ou mg/mL, o que possibilita evidenciar que dependendo da forma como são apresentados os resultados, a eficiência de um produto pode ser interpretado como maior ou menor que o outro. Verifica-se que o *S. aureus* se mostrou o mais susceptível das duas bactérias estudadas frente a todos os derivados vegetais estudados.

Os resultados apontam os extratos de pitanga e assa peixe como os mais efetivos sobre *S. aureus* e *E. coli*. Em relação aos óleos, os óleos de alecrim do campo e pitanga foram os mais eficientes sobre *S. aureus*. Em relação a *E. coli*, observamos que na relação mg/mL, evidenciou-se que os óleos de assa peixe e alecrim do campo foram mais eficientes. As comparações, segundo análise estatística, entre os produtos naturais são apresentadas nas tabelas 3 e 4, considerando separadamente as duas espécies bacterianas testadas. O único extrato que apresentou ação antimicrobiana melhor do que os óleos foi o extrato de assa peixe sobre linhagens de *S. aureus*, sendo que para os demais ensaios, os óleos essenciais apresentaram melhor ação antimicrobiana.

Tabela 3- Análise estatística dos resultados obtidos para Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) para os produtos naturais testados frente a 16 linhagens de *S. aureus*

Plantas	Mediana CIM (Extratos)	Mediana CIM (Óleos)
Alecrim do campo	6,08 ^a	2,58 ^{ab}
Assa Peixe	1,24 ^b	21,5 ^c
Camomila	4 ^{ac}	2,82 ^a
Pitanga	2,9 ^{bc}	0,92 ^b

Letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre produtos quando $p \leq 0,05$.

Tabela 4- Análise estatística dos resultados obtidos para Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL) para os produtos naturais testados frente a 16 linhagens de *E. coli*.

Plantas	Mediana CIM (Extratos)	Mediana CIM (Óleos)
Alecrim do campo	33,44 ^{ab}	25,8 ^a
Assa Peixe	27,28 ^{ac}	25,8 ^a
Camomila	44 ^b	28,2 ^b
Pitanga	23,2 ^c	27,6 ^c

Letras diferentes nas colunas representam diferenças significativas de atividade antimicrobiana entre produtos quando $p \leq 0,05$.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Todas as plantas testadas apresentaram ação antimicrobiana, seja na forma de extrato bruto ou óleo essencial, e esta ação variou também conforme a espécie de bactéria testada. Desta forma, fica evidente o potencial do uso destas plantas como agente antimicrobiano. Outro aspecto importante foram as diferenças entre os valores de CIM obtidos para *S.aureus* e *E.coli*; além de diferenças para a eficiência dos antimicrobianos vegetais na forma de óleos essenciais ou de extratos brutos.

Embora sejam possíveis resultados distintos de ação antimicrobiana para produtos naturais, uma explicação possível para as diferenças observadas entre os produtos vegetais é que os óleos são mais concentrados que os extratos. Conforme apresentado na tabela 1, nota-se que os óleos apresentam concentrações muito elevadas, pois neste caso é considerada a totalidade dos compostos presentes no óleo enquanto que para os extratos brutos, é obtido o peso seco após a evaporação do solvente (mg/mL), e por isto considerado apenas a parte solúvel presente no extrato, seja esta presente na forma de suspensão ou solução. A sensibilidade maior de Gram positivas pode ser devido as diferenças na estrutura em relação às Gram negativas, principalmente de parede bacteriana, que pode ter dificultado a ação dos produtos antimicrobianos testados.

A maioria dos compostos estabelecidos nos óleos essenciais foram monoterpenos ou sesquiterpenos, aos quais pode ser atribuído o efeito antimicrobiano dos óleos, embora muitos outros compostos presentes em cada um dos óleos também possam ter participado para o efeito antimicrobiano dos mesmos, inclusive com interações sinérgicas entres eles.

Rosato et al. (2007) também relatam valores de CIM maiores para *E.coli* do que para *S.aureus* quando testaram óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis*,

Origanum vulgare, *Thymus serpyllum*, *Pelargonium graveolens* e *Myrtus communis*, confirmando, desta forma, os resultados aqui obtidos.

Em estudo de Gonçalves et al. (2005) é relatada atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da pitanga sobre as *E.coli*, *S.aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp e *Shigella sonnei*. Estes resultados, comparativamente aos obtidos nesta pesquisa, possibilitam considerar que a pitanga apresenta um potencial como antimicrobiano que merece um destaque maior entre as várias plantas estudadas neste momento. Auricchio et al. (2003) demonstraram a presença de flavonóides e taninos na caracterização fitoquímica de extrato de pitanga, que comparado com nossos resultados que também demonstram a presença desses compostos, é possível então considerar que este composto é característico desta espécie vegetal, embora estudos futuros devam caracterizar individualmente tais tipos de flavonóides e taninos em particular.

Terpenóides e flavonóides foram os constituintes mais encontrados no gênero *Baccharis* (Verdi, 2005), sendo que a espécie *B.dracunculifolia* apresenta também compostos fenólicos (Funari, 2007), sendo estes compostos (flavonóides) detectados em nossa análise química para esta planta, além de outros compostos fenólicos. Em estudo realizado por Ferronato et al.(2007) ficou estabelecido que 10µl de óleo de *B. dracunculifolia* em 15 mL de Mueller Hinton Agar apresentou efeito antimicrobiano sobre linhagens de *E.coli*, *S.aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto nossos resultados mostraram ser necessários CIM superiores para inibir o crescimento das linhagens de *S.aureus* e *E.coli*. Duarte et al. (2004) relatam que a CIM do extrato hidroalcoólico de alecrim do campo sobre linhagens de *Streptococcus faecium* foi de 0,5 mg/mL, que comparando aos resultados aqui obtidos, mostrou necessidade de valores de CIM 10 vezes superiores para a bactéria Gram positiva, embora tenha sido testado linhagens bacterianas diferentes.

As diferenças de CIM observadas podem ser atribuídas à composição química dos antimicrobianos vegetais testados, e isto têm justificativa sob vários aspectos edafo-climáticos (época de colheita, horário, localidade, entre outros fatores) que alteram a produção dos compostos ativos nas plantas. Esta afirmação encontra suporte em estudo de Gobbo-Netto e Lopes (2007), que relatam a influência dos fatores ambientais na produção dos compostos secundários das plantas, resultando em produtos vegetais com diferentes composições químicas e com isto capacidades distintas para inibição de crescimento microbiano.

Souza et al. (2008) realizaram estudo fitoquímico em assa peixe e verificaram nesta planta compostos como ácidos fixos, alcalóides, cumarinas, glicosídeos favônicos e glicosídeos saponínicos. Braga et al. (2007) também relatam a presença de alcalóides,

cumarinas e flavonóides, assim como triterpenos, enquanto nesse estudo apenas flavonóides, saponinas e saponinas triterpênicas foram estabelecidas, além de outros compostos não mencionados pelos autores.

Oliveira et al. (2007) relatam que os extratos hidroalcoólicos de *Vernonia polyanthes* (Assa Peixe), *Aristolochia triangularis* (Cipó mil homem), *Tabebuia ovellanedae* (Ipê-roxo) e *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) apresentaram significativa ação antimicrobiana. É mencionado também que o extrato de assa peixe inibiu as células viáveis no período de três horas de contato segundo ensaio de curva de sobrevivência. O extrato da própolis, elaborada pelas abelhas a partir de coletas feitas em plantas do assa peixe, apresentou ação antimicrobiana contra *Paenibacillus larvae* em estudo de Bastos et al. (2008), utilizando a metodologia de difusão em discos impregnados com volumes de 20 µl do extrato de própolis. Apesar das metodologias adotadas serem distintas, foi possível estabelecer que os resultados obtidos nesta pesquisa também foram satisfatórios para o extrato de assa peixe. Por outro lado, Braga et al. (2007) não observaram ação antifúngica de extrato metanólico dessa planta utilizando metodologia da diluição em ágar.

A camomila apresentou atividade antibacteriana sobre *S.aureus* (Romero et al., 2005, Asolini et al., 2006) e os compostos fenólicos presentes em extrato etanólico de camomila foram os responsáveis pela propriedade antimicrobiana (Asolini et al., 2006). Nogueira et al. (2008) observaram em seu estudo com óleo essencial de camomila que não houve inibição de *P. aeruginosa*, no entanto, na concentração de 4% apresentou atividade inibitória sobre o crescimento de três linhagens de *S. aureus* e sobre duas linhagens de *Candida albicans*, com halos de inibição variando entre 10 e 12 milímetros de diâmetro. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que tanto o extrato como o óleo essencial de camomila apresentaram ação inibidora satisfatória sobre *S.aureus*, sendo que na caracterização fitoquímica constatou-se presença de compostos fenólicos, estando assim estes resultados de acordo com Asolini et al. (2006). Porém, não é descartado que outros compostos encontrados nos extratos e nos óleos essenciais possam ser responsáveis pela ação antimicrobiana juntamente com os fenóis.

Os óleos apresentam uma maior eficiência em relação ao extrato, porém sua extração exige equipamentos especiais além do que há necessidade de uma quantidade significativamente maior de plantas para obter volumes pequenos dos respectivos óleos. Mas existem formas de aumentar a produção de óleo essencial de determinadas plantas, dependendo da forma de cultivo, da época e horário da colheita; e aumentando o rendimento dos óleos essenciais, estes representam uma alternativa econômica mais viável que o extrato

devido a sua ação antimicrobiana maior, ou seja, necessidade de menores valores de CIM sobre os microrganismos testados.

Embora também não tenha sido objetivo desta pesquisa verificar a ação antimicrobiana dos produtos vegetais especificamente sobre linhagens resistentes, ou mesmo multirresistentes, os resultados aqui obtidos apontam para o potencial de uso destas plantas como agentes antimicrobianos, embora a forma de utilização (extratos brutos ou óleos essenciais) ainda mereça atenção especial, visando estabelecer economicamente a melhor forma de preparo de cada derivado vegetal. Destacamos também que os usos destas plantas são relacionados na literatura, especialmente aqueles de uso populares, mas acrescentamos que estudos futuros devem estabelecer os parâmetros de toxicidade, para com isto ampliar os usos no tratamento de doenças infecciosas. Quanto a caracterização química destes produtos, também se espera um aprofundamento neste aspecto, e com isto possibilitar o preparo de fitoterápicos tendo como base os produtos derivados destas plantas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Prof. Dr. Julio Toshimi Doyama pela análise cromatográfica dos óleos essenciais, Dr. Leonardo Noburo Seito, pelo auxílio na análise fitoquímica dos extratos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R. P., 1989. Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectroscopy, Academic Press, INC., San Diego, California, 302p.
- Asolini, F.C., Tedesco, A.M., Carpes, S.T., Ferraz, C., Ferraz, S.M., 2006. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds from extracts of plants used as tea. Brazilian Journal Food Technology. 9, 209-215.
- Auricchio, M. T., Bacchi, E. M., 2003. *Eugenia uniflora* L. “brazilian cherry” leaves: pharmacobotanical, chemical and pharmacological properties. Adolfo Lutz Institute Journal. 62, 55 – 61.
- Bastos, E.M.A.F., Simone, M., Jorge, D.M., Soares, A.E.E., Spivak, M. , 2008. *In vitro* study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology. 97, 273–281.
- Betoni, J.E.C., Mantovani, R.P., Barbosa, L.N., Di Stasi, L.C., Fernandes Junior, A., 2006. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 101, 387-390.
- Braga F.G., Bouzada M.L.M., Fabri R.L., Matos M.O., Moreira F.O., Scio E. Coimbra E.S. , 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. Journal of Ethnopharmacology. 111, 396-402.
- Burt, S., 2004. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology. 94, 223-253.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/National Comitee for clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS), 2005. Peformance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Information Supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15. Wayne, PA.
- Corrêa, R.M., Bertolucci, S.K.V., Pinto, J.E.B.P., Reis, E.S., Alves, T.L., 2004. The essential oil yield and organoleptic leaves characteristics of “assa-peixe” under various dry methods. Ciência e Agrotecnologia. 28, 339-344.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12, 564-582.
- Duarte, M.C.T., 2006. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. MultiCiências, 7.

- Duarte, M.C.T.; Figueira, G.M.; Pereira, B.; Magalhães, P.M. Delarmelina, C., 2004. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 14, 06-08.
- Ferronato R., Marchesan E.D., Pezenti E., Bednarski F., Onofre S.B., 2007. Antimicrobial activity of essential oils produced by *Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae), *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 17, 224-230.
- Fonseca, P., Librand, A.P.L., 2008. Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 44, 271-277.
- Fragoso, L.R., Esparza, J.R., Burchiel, S. W., Ruiz, D.H., Torres, E., 2008. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 227, 125–135.
- Funari, C.S., Ferro, V.O., Mathor, M.B. 2007. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC.(Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. 111, 206–212.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*. 30, 374-381.
- Gonçalves A. L., Alves Filho, A., Menezes, H., 2005. Comparative study on antimicrobial activity of some native tree extracts. *Arquivos Instituto de Biologia*. 72, p.353-358.
- Holetz F.B., Pessini G.L., Sanches N.R., Cortez D.A.G., Nakamura C.V. and Filho B.P.D., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for treatment of infectious diseases, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97, 1027–1031.
- Koneman, E.W., Allen S.D., Janda N.M., Sherechkenberger, P.C. Winn J.R., 2001. *Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed., JB Lippincott, Philadelphia, 1395 p.
- Lee, M.H., Chiou, J.F., Yen, K.Y. and Yang, L.L., 2000. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Letters*. 154,131–136.
- Limberger, R.P., Apel, M.A., Sobral, M., Schapoval, E.S.,Henriques, A.,1998. Investigação da atividade antimicrobiana do  leo vol til de espécies da família Myrtaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 79, 49-52.
- Matos, F.J.A., 1988. *Introdução   fitoquímica experimental*, 1 ed., Edi  es UFC, Fortaleza, 126p.

- National Comitee for clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS), 2003. Method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6.ed. Approved Standard M7.A6. Wayne, PA.
- Nogueira, J.C.R., Diniz, M. F. M., Lima, E.O., 2008. In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. 74, 118-24.
- Oliveira A.L., Lopes R.B., Cabral F.A. Eberlin M. N., 2006. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). Food Chemistry. 99, 1-5.
- Oliveira, D.G., Prince K.A., Higuchi C.T., Santos A.C.B., Lopes L.M.X., Simões M.J.S., Leite C.Q.F., 2007. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences. 28, 165-169.
- Romero, C.D., Chopin, S.F., Buck, G., Martinez, E., Garcia, M., Bixby, L., 2005. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. Journal of Ethnopharmacology. 99, 253–257.
- Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D., Milillo, M.A., 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. Phytomedicine. 14, 727–732.
- Schapoval E.E.S., Silveira S.M., Miranda M.L., Alice C.B., Henriques A.T., 1994. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L, Journal of Ethnopharmacology. 44, 137–142.
- Schelz, Z.M.J., Hohmann, J., 2006. Antimicrobial and antiplasmod activities of essential oils. Phytotherapy. 77, 279-285.
- Silva, K. L., Cechinel Filho, V., 2002. Plants of de genus Bauhinia: Chemical composition and pharmacological potential. Quimica Nova. 25, 449-454.
- Silva, M.T.N.; Ushimaru, P.I.; Barbosa, L.N.; Cunha, M.L.R.S.; Fernandes Jr, A., 2009. Antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens. Brazilian Journal of Medicinal Plants. 11, 257-262.
- Souza, F.A., Sena, J., Maranhão, L.T., Oliveira, C.M.R., Guimarães, A.T.B., 2008. *Apium leptophyllum* (Pers.) F. Muell. ex Benth. (Apiaceae), *Elvira biflora* L. (DC.) and *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae) aerial parts infusions: preliminary phytochemical study. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 89, 24-27.
- Souza, S.M.C., Pereira, M.C., Angélico, C.L., Pimenta, C.J., 2004. Evaluation of condiments essential oils on micelial growth of fungi associated to bread-making products. Ciência e Agrotecnologia. 28, 685-690.

- Tyler, V.E., 1999. Phytomedicines: back to the future. *Journal of Natural Products*. 62, 1589-1592.
- Verdi, L.G., Brighente, I.M.C., Pizzolatti, M.G., 2005. The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. *Quimica Nova*. 28, 85-94.

Manuscrito elaborado conforme instruções em Biomedicine and Pharmacotherapy

CAPITULO II – Sinergismo entre extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e drogas antimicrobianas

Nathalia Cristina da Silva Cirone^a, Lidianne Nunes Barbosa^a, Ana Angélica Henrique
Fernandes^b, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha^a,
Ary Fernandes Júnior*

^aDepartment of Microbiology and Immunology, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Chemistry and Biochemistry, Institute of Biosciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil

Corresponding author. Tel.: +55 14 38116058; fax: +55 14 38116058236

E-mail address: ary@ibb.unesp.br (A. Fernandes Júnior).

Resumo: As bactérias patogênicas ao homem e animais vêm mostrando níveis crescentes de resistência aos antimicrobianos conhecidos, sendo atualmente os extratos e óleos essenciais de plantas bastante estudados visando a terapêutica das doenças infecciosas. Esta pesquisa objetivou verificar sinergismo, utilizando metodologia dos discos (Kirby & Bauer) e quando o sinergismo era confirmado, as curvas de sobrevivência foram realizadas, entre produtos vegetais (extratos hidrometanólicos e óleos essenciais) e drogas antimicrobianas. Na metodologia dos discos, para *Staphylococcus aureus* houve sinergismo entre o óleo de assa peixe e óleo de alecrim do campo com as oito drogas testadas; para os óleos de camomila e pitanga apenas três drogas apresentaram sinergismo e em relação aos extratos apenas o extrato de camomila mostrou sinergismo com duas drogas. Para *Escherichia coli*, o extrato de assa peixe mostrou sinergismo com duas drogas e o extrato de pitanga para uma droga, enquanto o extrato de camomila apresentou antagonismo com 4 drogas e o extrato de alecrim do campo com uma droga. Verificou-se sinergismo entre óleo de assa peixe e cefepime, sulfazotrin e rifampicina; óleo de alecrim do campo com sulfazotrin e cefepime; óleo de camomila e rifampicina e ciprofloxacina frente a linhagens de *S.aureus*. Nos casos de sinergismo foram possíveis inibições de crescimento bacteriano superiores às drogas testadas isoladamente, enquanto o antagonismo foi verificado apenas com linhagens de *E.coli*. Pelos resultados obtidos, verificou-se o potencial de uso dos produtos naturais como coadjuvante no tratamento de doenças infecciosas.

Palavras chaves: sinergismo, óleos essenciais, extrato hidroalcolico, plantas medicinais, bactérias

Synergism between extracts and essential oils of medicinal plants and antimicrobial drugs

Abstract: Bacteria that are pathogenic to men and animals have shown increasing resistance to the known antimicrobials; thus, plant extracts and essential oils have been currently studied for the therapeutics of infectious diseases. The present investigation aimed to verify synergism by using disk test (Kirby & Bauer); when synergism was confirmed, survival curves were plotted for the combination between plant products (hydromethanolic extracts and essential oils) and antimicrobial drugs. Considering *Staphylococcus aureus*, “assa peixe” and “alecrim do campo” oils had synergism with all eight tested drugs, whereas chamomile and Surinam cherry oils had a synergistic interaction with only three drugs; as regards extracts, only chamomile showed synergism with two drugs. For *Escherichia coli*, there was synergism between “assa peixe” extract and two drugs, as well as between “Surinam cherry” extract and one drug; however, chamomile extract had antagonism with 4 drugs and “alecrim do campo” extract with one drug. Synergism was confirmed against *S. aureus* strains for “assa peixe” oil combined with cefepime, sulfazotrin and rifampicin; “alecrim do campo” oil with sulfazotrin and cefepime; chamomile oil with rifampicin and ciprofloxacin. Bacterial growth inhibition in cases of synergism was superior to that when drugs were tested alone. Antagonism was only detected for *E. coli* strains. Results indicated the potential use of natural products as coadjuvants in the treatment of infectious diseases.

Key Words: synergism, essential oils, ethanolic extracts, medicinal plants, bacteria

1. INTRODUÇÃO

A tradição popular pelo uso de plantas na cura de enfermidades apresenta aspectos básicos fundamentais para a farmacologia moderna, sendo que atualmente inúmeras drogas utilizadas pela medicina convencional têm origem, direta ou indireta, em plantas medicinais. Porém, alguns autores mencionam que tais drogas freqüentemente não possuem a mesma eficácia por tratar-se de componentes isolados das plantas que foram sintetizados ou purificados [1].

No Brasil, um número significativo de plantas é usado na forma de extratos brutos para tratar infecções comuns embora, poucas evidências científicas sejam relatadas que comprovam a eficácia desse tratamento. Sob este aspecto, verifica-se que a fitoterapia vem crescendo no Brasil, tornando-se este um setor econômico importante devido a sua popularidade como alternativa nos cuidados com a saúde [2]. Quanto a busca de novos antimicrobianos, é possível enfatizar aqueles de origem vegetal, e sendo o Brasil um importante centro para estudos de novos antimicrobianos devido ao fato de possuir a maior biodiversidade do planeta. Além do que muitas plantas já foram amplamente utilizadas e testadas por centenas de anos para as mais diversas finalidades. Também existem relatos que a maior parte da população brasileira (80%) consome apenas 37% dos medicamentos disponíveis, dependendo quase exclusivamente de medicamentos de origem natural [3].

Os estudos sobre ação antimicrobiana de plantas tem sido constante na literatura [4; 5; 6; 7; 8]. Bertucci et al.(2009), em estudo *in vitro* sobre ação antimicrobiana para 3 espécies do gênero *Eugenia* relatam que houve efeito inibidor importante sobre linhagens de *S.aureus*, *Mycobacterium*, *Candida* e *Aspergillus* [9]. Além destes, Ferronato et al.(2007) verificaram que 10µl do óleo de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) diluído em 15 mL de Mueller Hinton Agar foi capaz de inibir o desenvolvimento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* [10]. Asolini et al. (2006) observaram inibição do crescimento de *S.aureus* pela camomila (*Matricaria chamomilla*) [11], e Oliveira et al. (2007) relataram que os extratos hidroalcoólicos de *Vernonia polyanthes* (assa peixe), apresentou significativa ação anti-micobactérias, diminuindo a multiplicação bacilar em 2 log₁₀ de UFC/mL no tempo de exposição de tempo entre 30 minutos a 1 hora [12].

Os aspectos sobre estudos de ação antimicrobiana para derivados vegetais e a possibilidade de sinergismos com drogas antimicrobianas convencionais tem sido freqüente [13], sendo que a interação sinérgica para associações de antibióticos com extratos de plantas medicinais sobre linhagens microbiana resistentes pode ser uma nova estratégia para tratamento de infecções, possibilitando o uso de drogas antimicrobianas quando esta de forma isolada não

apresentar-se eficaz sobre determinadas linhagens bacterianas [14]. Estudos de combinação com produtos naturais de plantas e drogas sintéticas são limitadas a poucos relatos, porém os resultados apresentados são muitas vezes positivos. A 7 naphthoquinone-methyljuglone, isoladas de raiz de *Euclea natalensis*, uma planta africana, em combinação com isoniazida e rifampicina resultou em uma redução de quatro a seis vezes o concentração inibitória mínima (CIM) dessas drogas sintéticas sobre *Micobacterium* sp. [15]. Betoni et al. (2006) relatam ocorrência de sinergismo entre 8 extratos de plantas e 13 drogas antimicrobianas, com sinergismo para 2 drogas com extrato de gengibre e com 11 drogas para capim limão e cravo da Índia quando testadas linhagens de *S. aureus* [13]. Ushimaru (2007) não observou o mesmo perfil de sinergismo quando este mesmo tipo estudo foi realizado com linhagens de *E.coli*, tendo sido observando inclusive casos de antagonismo [16].

Este tipo de estudo também foi realizado por Gallucci et al. (2006) utilizando terpenos comuns em óleos essenciais, como carvona, carvacrol, timol, eugenol e mirceno em cultivo juntamente com penicilina sobre uma linhagens padrão ATCC de *S. aureus* metilicina resistente (MRSA) e outra de *E. coli*. Para a linhagem de MRSA verificou sinergismo apenas com carvona e antagonismo com o timol. Em relação a *E. coli* mencionam sinergismo com eugenol e timol, porém antagonismo com mirceno. Concluem os autores que este tipo de combinação entre terpenos e antibióticos apresenta um aspecto promissor para uso no tratamento destas doenças [5].

O extrato aquoso de sementes de *Cuminum cyminum* (Cominho) possibilitou um aumento de 35% dos níveis de rifampicina no plasma de ratos, tendo esta atividade sido atribuída a presença no extrato de um glicosídeo flavonóide [17].

Van Vuuren et al. (2009), estudaram o sinergismo nas diferentes concentrações de óleos comerciais de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Mentha piperita* (hortelã pimenta) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) juntamente com ciprofloxacina em linhagens de *S. aureus* e *K. pneumoniae*; e com amphotericina B sobre linhagens de *Candida albicans*. Relatam um perfil predominantemente antagônico para *R. officinalis* com as drogas testadas sobre *S. aureus* e *C. albicans* e sinergismo quando *K. pneumoniae* foi testada. Quanto a *M. alternifolia* verificou-se uma frequência maior para antagonismo em relação ao sinergismo. O *T.vulgaris* apresentou antagonismo sobre todos os microrganismos testados enquanto a *M. piperita* apresentou sinergismo sobre *S. aureus*; antagonismo contra *C. albicans* enquanto para *K. pneumoniae* os resultados mostraram ocorrência de antagonismo ou sinergismo, porém dependente da concentração utilizada [18].

Desta forma, e considerando a possibilidade de interações entre produtos antimicrobianos, objetivamos verificar *in vitro* interações possíveis entre extratos e óleos essenciais de camomila (*Matricaria chamomilla* L), assa peixe (*Vernonia polyanthes* Less), alecrim do campo (*Bacharis dracunculifolia* D.C.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L) com drogas antimicrobianas como cloranfenicol, ciprofloxacina, tetraciclina, cefepima, sulfazotrim, rifampicina, cefalotina e gentamicina, sobre linhagens de *S.aureus* e *E.coli*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Plantas e preparo de extratos e óleos

As folhas de alecrim do campo e assa peixe foram coletadas de indivíduos que cresciam naturalmente em áreas próximas ao campus da UNESP–Botucatu (22° 57' 13,67" S e 48°30' 23,19" O), sendo a coleta feita em horário que não ultrapassou às 9 horas da manhã. A amostra de pitanga foi obtida, na forma de folhas desidratada, de produtor de óleos essenciais Fazenda Alpina/Município de Santa Bárbara/SP, de propriedade do Senhor Ivo Gregori (23° 01' 58",5 S e 49° 09' 52",7 O) e as flores de camomila, na forma também desidratada, foi cedida para a realização do estudo por empresa do setor de plantas medicinais (CentroFlora- Anidro/Botucatu/SP-22° 57' 30,72" S e 48° 31' 27,13" O). Todas as amostras vegetais foram identificadas e as respectivas exsicatas depositadas no Herbário Profa. Dra. Irina Delanova Gemtchujnicov do Depto de Botânica/IBB/UNESP/Botucatu, tendo recebido os números de depósito: BOTU 25794 (camomila), BOTU 25795 (alecrim do campo), BOTU 25796 (pitanga) e BOTU 25797 (assa peixe).

No preparo dos extratos foram utilizadas folhas previamente desidratadas (estufa de circulação forçada de ar a 50°C) e moídas (moinho de faca) e misturadas a solução de metanol 70% seguido de 48 horas/±4°C para extração e filtração em papel de filtro comum. Na sequência procedeu-se evaporação do solvente (metanol) do filtrado em evaporador rotativo (Marca Phoenix), com temperatura ±45°C. Aliquotas de 1 mL dos extratos foram transferidas para recipientes feitos com lâminas de alumínio (folhas de alumínio comuns) previamente pesadas e na sequência colocados sobre chapa aquecida para evaporação do solvente e pesagens sucessivas até peso constante, sendo após pesagem feito cálculo do peso seco dos extratos (mg/mL) [13].

Os óleos essenciais de alecrim do campo, assa peixe e de pitanga foram preparados a partir de folhas recém coletadas, enquanto para o óleo de camomila foi utilizado flor desidratada e o óleo de pitanga foi obtido na forma pronta de produtor de óleos essenciais Fazenda Alpina. Os óleos essenciais de camomila, assa peixe e alecrim do campo foram

produzidos no depto de Microbiologia e Imunologia/IBB/UNESP segundo a metodologia clássica de arraste direto pelo vapor d'água em um equipamento Clevenger (Marconi modelo M480) [19], enquanto o óleo de pitanga foi produzido também pelo arraste com vapor, porém em equipamento para a produção comercial deste óleo. A densidade dos óleos foi determinada, segundo formula abaixo [20], onde P_1 , obtido em balança analítica, é o peso do recipiente tipo eppendorf; P_2 é o peso do recipiente tipo eppendorf contendo 1 mL (V) do óleo essencial em análise.

$$D = \frac{P_2 - P_1}{V} = \frac{mg}{mL}$$

2.2. Linhagens bacterianas

Linhagens de bactérias das espécies *S. aureus* (n=15) e *E. coli* (n=15) isoladas de casos clínicos humanos de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. As linhagens foram identificadas [21] e mantidas em Agar Nutriente (Difco). Foram utilizadas também duas linhagens padrões ATCC (*S.aureus* ATCC 33591, *E. coli* ATCC 25922). O parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP para utilização das linhagens bacterianas foi obtido no dia 06/04/2009 com o protocolo CEP sob numero 3.152-2009.

2.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os produtos vegetais e drogas antimicrobianas

Os ensaios para verificação da CIM, e na seqüência obtenção dos valores de CIM90% das linhagens testadas, foram realizados para o total de 32 linhagens (15 *S. aureus*, 15 *E. coli*, 1 *S. aureus* ATCC 33591, 1 *E.coli* ATCC 25922) tendo sido utilizada metodologia da diluição [22] dos produtos naturais em Agar Mueller Hinton (MHA) mais 0,2% de Tween 80, totalizando 20 mL de meio em cada placa, e obtidas as concentrações, inicialmente em %v/v, de 2 a 44%v/v para os extratos e 0,05 a 3 %v/v para os óleos, sendo estes valores posteriormente convertidos para mg/mL, utilizando os dados de peso seco dos extratos e densidade dos óleos essenciais. Foram preparadas placas controles do crescimento normal das bactérias e os ensaios foram realizados em duplicatas [23]. A inoculação das linhagens foi feita com multiinoculador de Sterr utilizando suspensões bacterianas padronizadas na escala 0,5 de MacFarland e concentrações bacterianas ao redor de 10^5 - 10^6 UFC/mL e incubação a 37°C/18-24horas. A leitura dos ensaios, e determinação dos valores de CIM, baseou-se na verificação da formação ou não das colônias bacterianas [24].

Os valores de CIM para as drogas antimicrobianas foram obtidos com uso da metodologia da diluição [22] dos sais das drogas, quando a partir de uma diluição mãe foram preparadas concentrações entre 0,008µg/mL a 1024µg/mL em volume final de 2,5 mL de Brain Heart Infusion (BHI). O inóculo foi padronizado na escala 0,5 de MacFarland, sendo inoculados os tubos em aproximadamente 10^5 UFC/mL. Após 37°C/24 horas, foi feita leitura dos ensaios, e os valores de CIM para as drogas antimicrobianas foram aqueles nos quais não havia turvação do meio devido ao crescimento bacteriano nos tubos de cultivo.

2.4. Sinergismo entre óleos e extratos das plantas e drogas antimicrobianas pelo método de disco (Kirby&Bauer)

Foi utilizado a metodologia da difusão dos discos, conforme adaptação utilizada por Fernandes Junior et al. (2005) e Betoni et al. (2006) a partir do protocolo preconizado pelo NCCLS (2003) (13, 24, 25).

Foram realizados dois tipos de ensaios, para um total de 10 linhagens de *S. aureus* e 10 de *E.coli*, sendo um antibiograma denominado controle, segundo metodologia dos discos [24], e outro denominado tratamento, segundo metodologia também dos discos, porém com mistura dos respectivos produtos naturais ao meio de cultura em concentrações que equivalentes a ¼ dos valores da CIM 90% obtidas previamente para cada extrato e óleos essenciais. Foram utilizadas placas 150x10mm, contendo meio de cultura Mueller Hinton Agar (MHA), mais Tween 80 (0,2%) [23]. Após incubação (37°C/18-24horas), as leituras dos halos de inibição (milímetros) foram anotadas, sendo os resultados para os antibiogramas controles e tratamentos comparados estatisticamente. As drogas antimicrobianas testadas frente as produtos vegetais foram Cloranfenicol (30µg), Gentamicina (10µg), Cefepime (30µg), Tetraciclina (30µg), Sulfazotrin (25µg), Cefalotina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Rifampicina (5µg). Para todas as drogas os discos para antibiograma utilizados foram da Marca Laborclin.

2.5. Verificação do sinergismo pelo método da curva de sobrevivência

Em outra etapa do estudo, visando confirmar apenas os casos de sinergismo positivo observados na etapa anterior pela metodologia dos discos, foram realizados ensaios para obtenção de curvas de sobrevivência, em meio de BHI mais Tween 80 (0,2%), para uma linhagem de cada espécie bacteriana utilizando misturas de drogas antimicrobianas e respectivos produtos naturais nas proporções de ¼ dos valores de CIM obtidos para as drogas

antimicrobianas e nas proporções de $\frac{1}{4}$ dos valores de CIM90% obtidos para os produtos vegetais.

Estes ensaios foram executados num período de incubação de 24 horas, com inóculo inicial de aproximadamente 10^5 UFC/mL, e nos tempos de 0, 2, 4, 8 e 24 horas a 37°C foram retiradas alíquotas dos cultivos para sub-culturas (método Pour Plate) em meio Mueller Hinton Agar (MHA Difco) para contagem de células viáveis. A bactéria foi inoculada em 30 mL de BHI e depois para cada avaliação era retirado uma alíquota de 1 mL diluída em 9 mL de salina e em sequência retirado 0,1 mL para a realização do método Pour Plate. Os valores de contagem de células viáveis foram obtidos após incubação a $37^\circ\text{C}/24$ horas e contagem com uso de contador de colônia digital marca Phoenix. Os valores de UFC/mL foram transformados em Log, para observação de efeito bactericida (quando havia redução de 3 log na contagem) ou efeito bacteriostático (quando o número de células viáveis permaneciam próximo do valor inicial do inóculo). Além dos ensaios contendo as misturas dos produtos antimicrobianos nas combinações definidas, foram obtidas curvas para os produtos naturais e drogas antimicrobianas nos respectivos valores de CIM90% e CIM, bem como também foi obtido curva de crescimento controle de cada espécie bacteriana.

2.6. Análise estatística

Nos testes sobre sinergismo pelo método dos discos foi utilizado o teste Mann-Whitney Rank Sum Test e teste T, sendo o resultado considerado significativo se $p < 0,05$ (SAS for Windows versão 9.1.3).

3.RESULTADOS

3.1. Análise dos produtos naturais (peso seco e rendimento)

Os valores obtidos para os parâmetros peso seco (mg/mL) dos extratos e densidade dos óleos essenciais (mg/mL) são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores obtidos para peso seco dos extratos, densidade dos óleos (mg/mL) e rendimento dos óleos essenciais (%).

Plantas	Extratos (mg/mL)	Óleos Essenciais (mg/mL)	Rendimento (grama óleo por grama de planta)
Alecrim do campo	76,0	857,0	0,20%
Camomila	100,0	940,0	0,17%
Assa Peixe	62,5	856,0	0,15%
Pitanga	145,0	924,0	0,19%

Verifica-se que de acordo com os resultados, o rendimento para os óleos essenciais foi ao redor de 0,15%, que caracteriza um rendimento bastante baixo.

3.2. Resultados para valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Na tabela 2 são apresentados os valores de CIM90% para os produtos naturais e na tabela 3 os valores de CIM obtidos para uma linhagem de *S. aureus* e *E. coli* frente as drogas antimicrobianas testadas.

Tabela 2: Valores de Concentração Inibitória Mínima (mg/mL) para 90% das linhagens (CIM90%) de *S. aureus* e *E. coli* frente aos extratos e óleos essenciais das plantas em estudo.

Microrganismos	Pitanga	Assa Peixe	Alecrim do campo	Camomila
	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
<i>S. aureus</i> (n=15 + ATCC 33591)				
Extratos	2,9	1,24	5,47	3,7
Óleos	2,21	24,08	3,35	2,82
<i>E. coli</i> (n=15 + ATCC 25922)				
Extratos	15,95	26,91	32,53	43,4
Óleos	27,6	25,8	25,8	28,2

Tabela 3: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL para as drogas testadas frente a uma linhagem de *S. aureus* e *E. coli*

	CIP	GEN	TET	CLO	RIF	CPM	SUT
<i>E. coli</i>	1,024	256	0,128	1,024	0,064	64	1024
<i>S. aureus</i>	128	32	128	16	64	0,256	1024

Legenda: CIP: Ciprofloxacina, GEN: Gentamicina, TET: Tetraciclina, CLO: Cloranfenicol, RIF: Rifampicina, CPM: Cefepime, SUT: Sulfazotrim.

Os valores apresentados de CIM90% para os produtos naturais são fundamentais para realização dos ensaios sobre interações entre os produtos naturais e drogas antimicrobianas, e embora não seja objetivo deste estudo verificar o potencial antimicrobiano de cada um destes produtos, e de acordo com as CIM90% obtidas, é possível inferir que todos os produtos testados foram efetivos no controle do crescimento das bactérias testadas.

3.3. Sinergismo entre produtos antimicrobianos pela metodologia dos discos

Nos ensaios para verificação de sinergismo entre os produtos vegetais e drogas antimicrobianas utilizando a metodologia dos discos, foram utilizados ¼ dos respectivos valores de CIM90% nas placas que receberam os produtos vegetais, denominado tratamento, e o sinergismo foi estabelecido de acordo com análise estatística e comparação dos resultados

obtidos para cada linhagem, totalizando 10 para *S. aureus* e 10 para *E. coli*, nos antibiogramas controle e tratamento. Assim, foram obtidos resultados conforme apresentados nas tabelas 4 e 5 para *S. aureus* e *E.coli* respectivamente.

Tabela 4: Resultados para sinergismo entre óleos essenciais e extratos com drogas antimicrobianas sobre linhagens de *S.aureus*.

Drogas	Alecrim do campo		Assa Peixe		Camomila		Pitanga	
	Óleo	Extratos	Óleo	Extratos	Óleo	Extratos	Óleo	Extratos
Cefalotina	S	I	S	I	I	I	I	I
Gentamicina	S	I	S	I	I	I	S	I
Tetraciclina	S	I	S	I	I	S	I	I
Sulfazotrin	S	I	S	I	S	I	S	I
Ciprofloxacina	S	I	S	I	S	I	S	I
Cefepime	S	I	S	I	I	I	I	I
Cloranfenicol	S	I	S	I	I	I	I	I
Rifampicina	S	I	S	I	S	S	I	I

Sinergismo foi considerado quando $p < 0.05$)

S - Sinergismo, I – Indiferente

Tabela 5: Resultados para sinergismo entre óleos essenciais e extratos com drogas antimicrobianas sobre linhagens de *E.coli*.

Drogas	Alecrim do campo		Assa Peixe		Camomila		Pitanga	
	Óleo	Extratos	Óleo	Extratos	Óleo	Extratos	Óleo	Extratos
Cefalotina	I	I	I	I	I	A	I	I
Gentamicina	I	I	I	S	I	A	I	I
Tetraciclina	I	I	I	I	I	I	I	I
Sulfazotrin	I	I	I	I	I	I	I	I
Ciprofloxacina	I	I	I	I	I	I	I	I
Cefepime	I	I	I	S	I	A	I	S
Cloranfenicol	I	A	I	I	I	A	I	I
Rifampicina	I	I	I	I	I	I	I	I

Antagonismo ou sinergismo foi considerado quando $p < 0.05$)

S - Sinergismo, A – Antagonismo, I – Indiferente

As interações foram analisadas pelo teste Mann-Whitney Rank Sum Test e teste T, e o sinergismo ou antagonismo foram considerados quando $p < 0,05$.

Verifica-se diferença marcante para frequência de sinergismo quando consideradas as duas espécies bacterianas, sendo que enquanto verifica-se um número absoluto de 24 casos de sinergismo entre os vários produtos naturais e drogas antimicrobianas para a espécie *S. aureus*, houve apenas 3 eventos de sinergismo para *E.coli*. Vale destacar que os óleos de alecrim e assa peixe mostraram sinergismo com todas as drogas testadas nos ensaios para *S. aureus*. Por outro lado, verifica-se uma frequência superior de casos de antagonismo (total de 5 casos) frente a *E.coli*, sendo a incidência de antagonismo elevada para o extrato de

camomila. Também observa-se que os casos de sinergismo frente ao *S.aureus* ocorreu quase que exclusivamente para os óleos essenciais, tendo ocorrido apenas dois casos de sinergismo para o extrato de camomila. Por outro lado, em relação a *E. coli* verifica-se 100% de indiferença entre os óleos e drogas antimicrobianas.

3.4. Determinação de sinergismo através de curvas de sobrevivência

Na etapa de verificação de sinergismo pela metodologia da curva de sobrevivência, objetivou-se confirmar apenas o sinergismo verificado nas combinações testadas pela metodologia dos discos. Porém, destacamos que mesmo tendo ocorrido casos de sinergismo com a droga cefalotina, não foram possíveis tais ensaios devido a restrição quanto a obtenção do sal desta droga juntos aos fornecedores.

Nas figuras 1 até 8, são apresentados os perfis de sobrevivência para as combinações testadas sobre as linhagens bacterianas bem como as curvas de sobrevivência quando as espécies bacterianas foram submetidas nos respectivos valores de CIM90% dos produtos naturais e CIM para as drogas antimicrobianas e controle do crescimento normal de cada bactéria. Observa-se que para a maioria das interações houve um perfil semelhante para as curvas de sobrevivência com a da droga testada ou mesmo menores, sendo que várias combinações confirmou-se o sinergismo, verificado pela redução contagem bacterianas, inclusive com a eliminação completa da bactéria do meio de cultura.

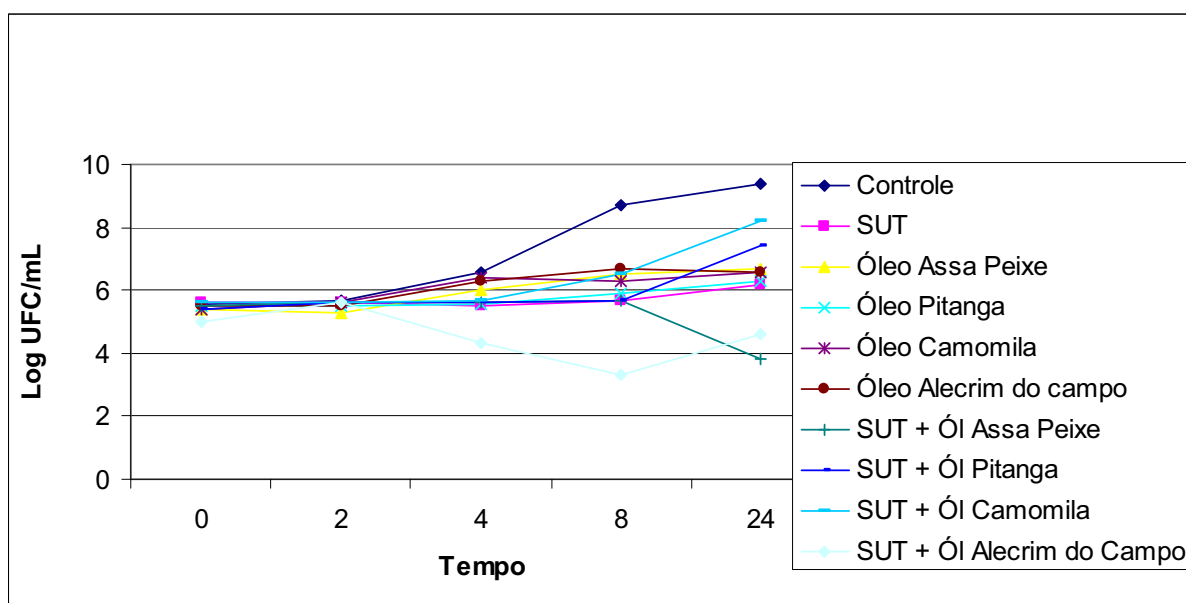


Figura 1: Curvas de sobrevivência obtidas para a bactéria *S.aureus* durante período de 24 horas frente aos diferentes produtos vegetais com interação com o Sulfazotin (SUT).

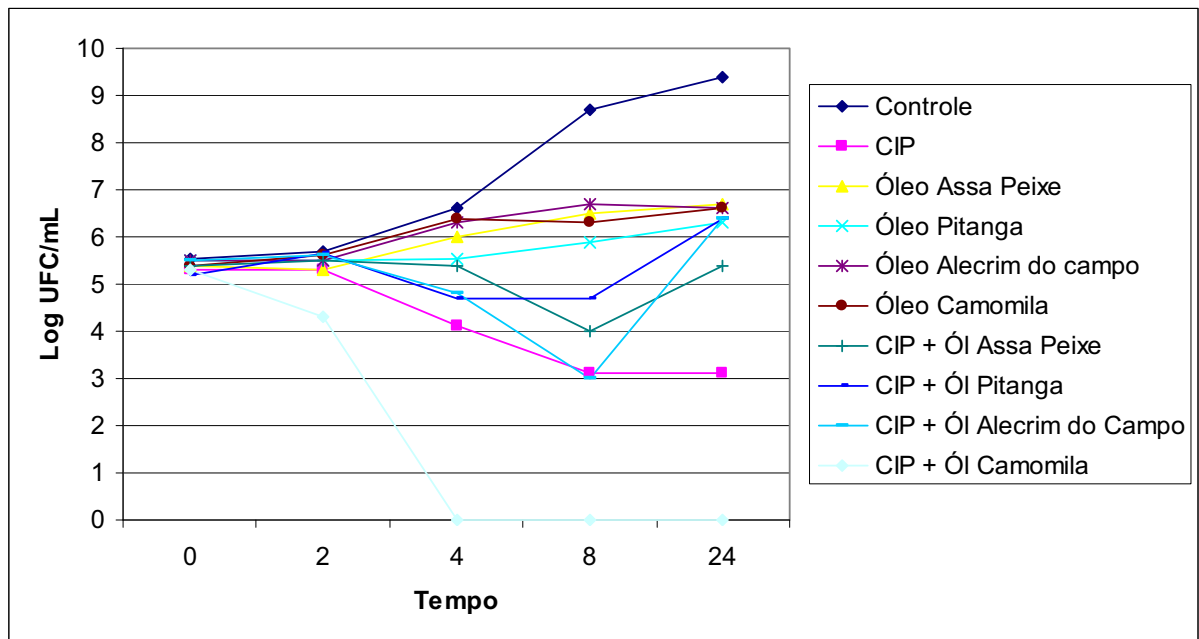


Figura 2: Curvas de sobrevivência obtidas para a bactéria *S.aureus* durante período de 24 horas frente aos diferentes produtos vegetais com interação com a Ciprofloxacina (CIP).

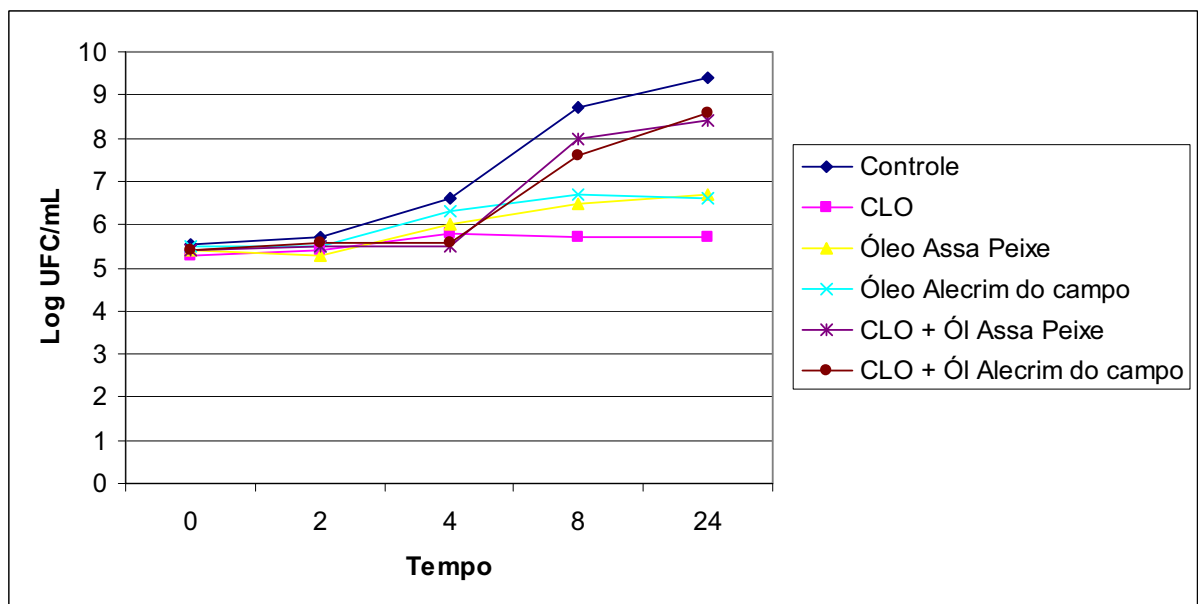


Figura 3: Curvas de sobrevivência obtidas para a bactéria *S.aureus* durante período de 24 horas frente aos diferentes produtos vegetais com interação com o Cloranfenicol (CLO).

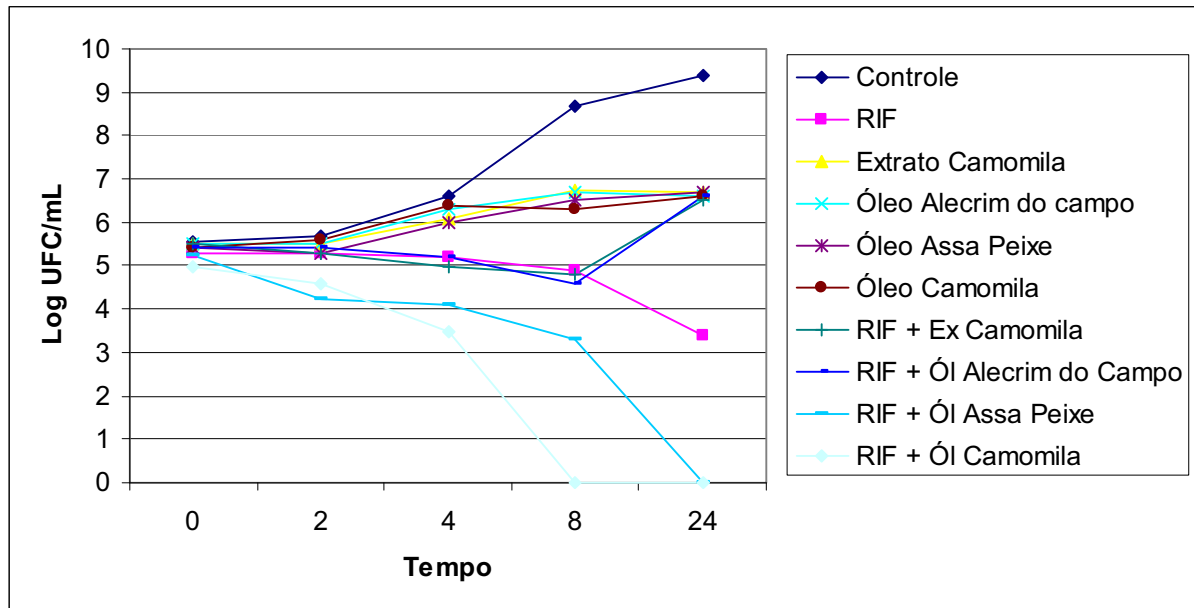


Figura 4: Curvas de sobrevivência obtidas para a bactéria *S.aureus* durante período de 24 horas frente aos diferentes produtos vegetais com interação com a Rifampicina (RIF).

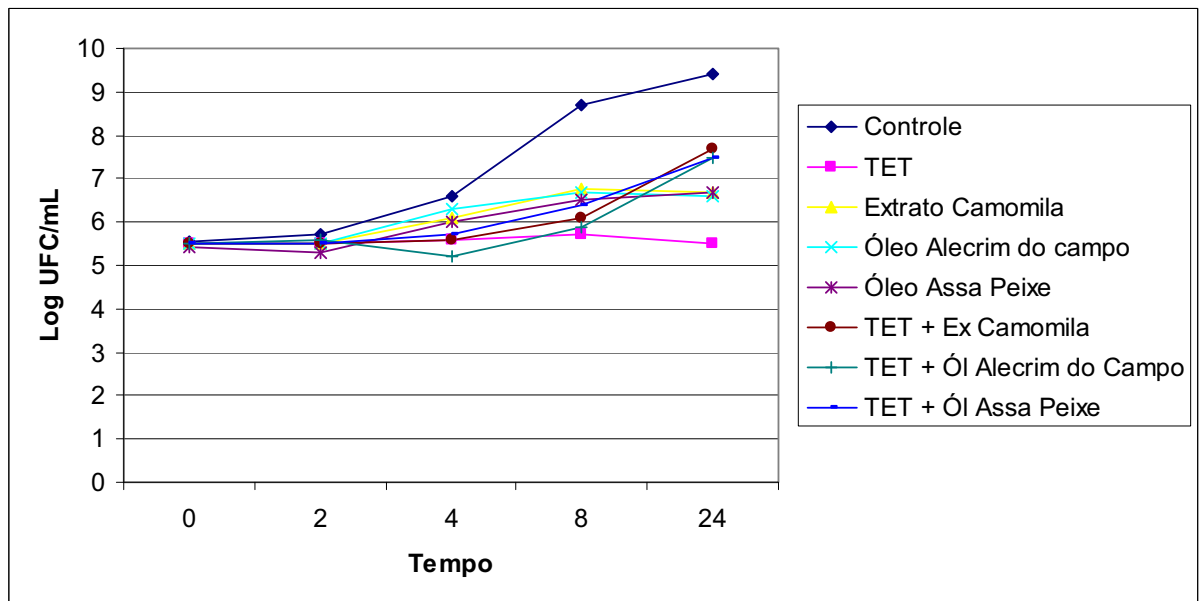


Figura 5: Curvas de sobrevivência obtidas para a bactéria *S.aureus* durante período de 24 horas frente aos diferentes produtos vegetais com interação com a Tetraciclina (TET).

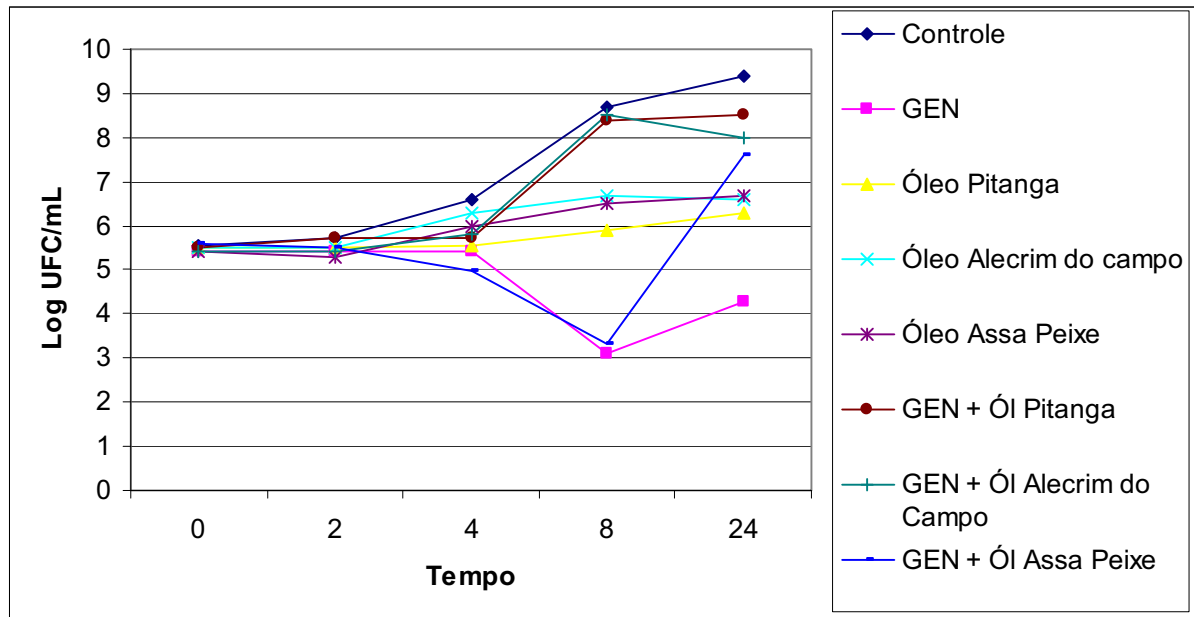


Figura 6: Curvas de sobrevivência obtidas para a bactéria *S.aureus* durante período de 24 horas frente aos diferentes produtos vegetais com interação com a Gentamicina (GEN).

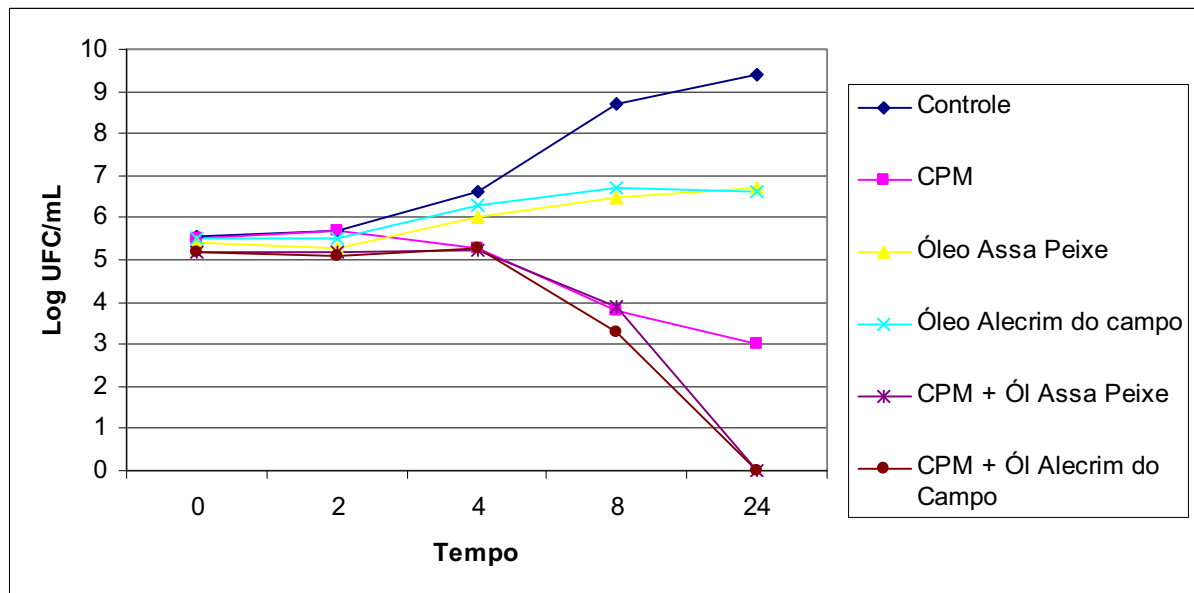


Figura 7: Curvas de sobrevivência obtidas para a bactéria *S.aureus* durante período de 24 horas frente aos diferentes produtos vegetais com interação com o Cefepime (CPM).

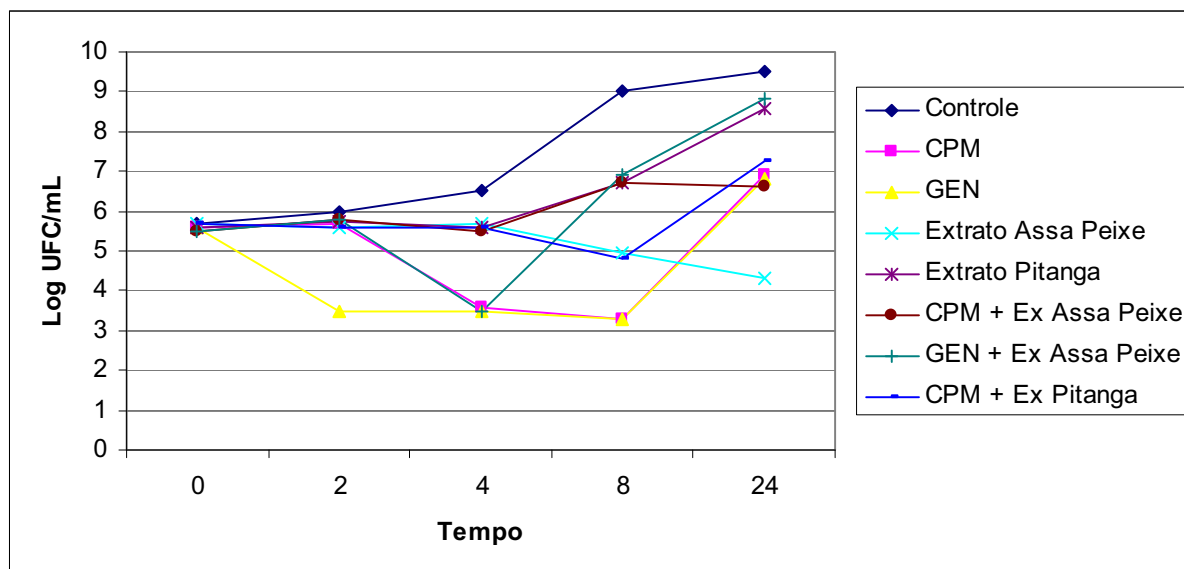


Figura 8: Curvas de sobrevivência obtidas para a bactéria *E.coli* durante período de 24 horas frente aos diferentes produtos vegetais.

Para os resultados obtidos com *S.aureus* observa-se que houve interações entre sulfazotrim (Figura 1) e óleos de assa peixe e alecrim do campo, com sinergismo nítido e capaz de reduzir o crescimento microbiano de forma mais eficiente que quando a droga foi testada isoladamente. Quanto a Figura 2, para ciprofloxacina, verifica-se interação sinérgica apenas com o óleo de camomila, inclusive com efeito bactericida. Quanto a rifampicina (Figura 4), tanto o óleo de camomila, como o de assa peixe apresentaram efeito sinérgico com esta droga. Nas combinações entre cefepime e óleos de assa peixe e alecrim do campo (Figura 7) também verifica interações tipo sinergismo. Nas interações com as drogas cloranfenicol (Figura 3), gentamicina (Figura 6) e tetraciclina (Figura 5) verifica-se um crescimento bacteriano maior que no perfil apresentada pelas drogas isoladamente.

Quanto os resultados para *E. coli*, (Figura 8) nas interações entre cefepime e extrato de assa peixe e cefepime e extrato de pitanga observou-se um perfil da curva parecido com a curva das drogas, enquanto a interação entre gentamicina e extrato de assa peixe apresentou uma curva com taxa de crescimento das bactérias maior do que a da droga.

De maneira geral, todas as curvas das interações entre os produtos naturais e as drogas apresentaram um perfil de crescimento bacteriano inferior aos observados para as curvas controles, ou seja, aqueles ensaios sem adição de qualquer inibidor do crescimento bacteriano.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O trabalho apresentou resultados relevantes sobre ação sinérgica com drogas convencionais e plantas medicinais, revelando assim o potencial de plantas na cura de doenças infecciosas.

Através do peso seco de extratos e densidade dos óleos, observamos que os óleos são mais concentrados que os extratos, apresentando grande diferença de concentração, sendo esta uma possível justificativa para uma maior atividade dos óleos em relação ao sinergismo. Porém tal comparação torna-se difícil, uma vez que peso seco do extrato representa a porção sólida, em solução ou suspensão no solvente, que no caso do extrato, por ter havido remoção do metanol, é constituído basicamente de água. Quanto ao óleo essencial, este representa praticamente todo o material, que no caso da densidade é considerada toda a massa no volume de 1 mL por exemplo.

Em relação à CIM dos produtos naturais é observado que os extratos de pitanga e assa peixe foram os extratos mais efetivos contra *S.aureus*, porém apenas o extrato de camomila apresentou algum sinergismo. Em relação aos óleos, o óleo de camomila e pitanga apresentaram maior ação inibitória contra *S.aureus*, mas foram os óleos de assa peixe e alecrim do campo que mostraram a maior taxa de sinergismo pela metodologia dos discos, mostrando que uma maior capacidade antimicrobiana pode não se refletir na maior taxa de sinergismo. Em relação a *E.coli*, a taxa de sinergismo foi baixa, mas houve 2 casos de sinergismo com o extrato de assa peixe que teve CIM alta, com baixa ação antimicrobiana. Betoni et al. (2006) verificou resultado semelhante em relação ao extrato de capim limão, que apresentou alto valor para CIM, porém foi o extrato com maior taxa de sinergismo juntamente com os valores obtidos para o extrato de cravo da Índia [13].

Nos ensaios para verificação de sinergismo pela metodologia dos discos verificou-se resultados promissores sobre linhagens de *S. aureus* com um índice considerável de sinergismo para os óleos essenciais, sendo esta taxa em 100% de sinergismo para alecrim do campo e assa peixe. Por outro lado, os extratos não demonstraram o mesmo potencial, tendo ocorrido apenas dois casos de sinergismo frente a *S. aureus*, embora não tenha sido verificados casos de antagonismo. Quanto a *E.coli*, observou-se um perfil completamente contrário ao obtido para *S. aureus*, pois não houve casos de sinergismo para qualquer dos óleos testados, ficando estabelecido apenas para os extratos de assa peixe e pitanga os casos de sinergismo. Também, merece destaque o fato da camomila apresentar o maior índice de antagonismo (4 casos). Assim, verifica-se que o tipo de derivado vegetal (óleo essencial ou extrato bruto) influencia no comportamento das drogas antimicrobianas, o que mostra que em

estudos desta natureza a caracterização fitoquímica torna-se crucial para o melhor entendimento dos fenômenos observados nos ensaios de interação entre os produtos naturais e drogas.

Outro aspecto que também deve ser considerado no estudo é a maior sensibilidade das Gram positivas em relação às Gram negativas, que de certa maneira traduziu-se nos maiores índices de sinergismo para o *S. aureus*, totalizando 24 casos de sinergismo contra 3 casos para a *E. coli*. Uma explicação natural para tal fenômeno deve-se a estrutura da parede bacteriana distintas de ambos grupos bacterianos. Porém, no caso dos óleos essenciais, naturalmente lipossolúveis, esperava-se uma capacidade antimicrobiana maior sobre a *E. coli*, que apresenta uma membrana externa rica em lipídeos bem como um peptidoglicano delgado, que com isso teria menor restrição quanto a sua entrada na célula bacteriana. Portanto, segundo tais observações, aparentemente espera-se uma eficácia maior do uso dos produtos naturais durante terapia combinada com antimicrobianos quando tratar-se de infecções por *S. aureus*. Estudos para outros Gram positivos são necessários visando estender o potencial de recomendação do uso de terapia combinada para outras bactérias Gram positivas, como por exemplo *Streptococcus*, *Bacillus*, etc..

O estudo teve também o objetivo de testar através da curva de sobrevivência os casos de sinergismo detectado na metodologia dos discos. Assim, da mesma forma que em alguns casos as curvas de sobrevivência confirmaram os resultados de sinergismo verificados pela metodologia dos discos (óleo de assa peixe com sulfazotrim, rifampicina e cefepime; óleo de camomila com ciprofloxacina e rifampicina e óleo de alecrim do campo com sulfazotrim e cefepime para *S. aureus*) também foi verificado que em alguns casos as interações apresentaram perfil de crescimento maior do que o da droga isoladamente, não confirmando desta forma o sinergismo apresentado pelo método do disco, como por exemplo as interações com o cloranfenicol e tetraciclina que nenhuma curva foi igual ou menor que a curva de crescimento desta droga. Outro exemplo de antagonismo na curva de crescimento e sinergismo na metodologia do disco foram as interações entre rifampicina e extrato de camomila e com óleo de assa peixe. Para as curvas que não mostraram o sinergismo esperado, uma justificativa é que na realização dos ensaios foram utilizadas as CIM obtidas previamente, que foram valores diferentes aos estabelecidos nos discos de Kirby&Bauer. Porém, vale destacar que mesmo sem um sinergismo evidente, todas as interações testadas mostram um perfil de crescimento bacteriano abaixo dos ensaios controles do crescimento bacteriano na ausência de qualquer inibidor de crescimento.

Desta forma, conforme vem sendo observado em relatos sobre ação antimicrobiana de produtos naturais, a metodologia adotada representa um aspecto fundamental para obtenção de resultados conclusivos, assim como a forma de preparo dos derivados vegetais, as linhagens microbianas testadas, as drogas antimicrobianas testadas nos ensaios de sinergismo, podem influenciar nos resultados observados.

Estudos recentes também demonstraram ocorrência de sinergismo entre produtos naturais e drogas antimicrobianas, sendo que em relato feito por Betoni et al. (2006), um aspecto que mostra interesse maior é que para o sinergismo verificado entre 8 extratos de plantas e 13 drogas antimicrobianas houve uma incidência de sinergismo para as drogas com ação sobre a síntese de proteínas das bactérias [13]. No presente estudo a preferência para tal tipo de droga antimicrobiana não ocorreu, sendo inclusive mais freqüentes os casos de antagonismo, verificado para *E. coli* e a droga cloranfenicol, totalizando dois casos de antagonismo e também um caso de antagonismo para a droga gentamicina. Ushimaru (2007) também observou casos de antagonismo, com essas mesmas drogas, frente linhagens de *E. coli* [16]. Casos de antagonismo entre produtos naturais e drogas frente a bactéria Gram negativa, no caso linhagens de *Klebsiella pneumoniae*, também foram observados por Van Vuuren et al. [18]. Desta forma, nossos resultados corroboram com os obtidos para *E. coli*, demonstrando assim, além da maior resistência das Gram negativas, a ocorrência mais frequente dos casos de antagonismo entre produtos naturais e drogas antimicrobianas.

Segundo os resultados obtidos, e nas condições dos experimentos, ficou estabelecida a ocorrência de sinergismo entre os produtos naturais e as drogas testadas, com uma prevalência deste efeito para os óleos essenciais das plantas estudadas frente as linhagens de *S. aureus*. Isto permite concluir que existe um maior potencial de uso combinado destes agentes antimicrobianos frente as bactérias Gram positivas, considerando os aspectos de similaridades entre as espécies deste grupo bacteriano. Porém, vale destacar que os estudos foram realizados *in vitro* e isto nos revela a necessidade de estudos futuros utilizando modelos *in vivo* que possibilitarão conclusões mais próximas de uma real utilização destes derivados vegetais em associação com drogas antibacterianas convencionais, para que se estabeleçam os riscos potenciais da citotoxicidade dos compostos presentes nos derivados vegetais durante sua utilização como coadjuvante no tratamento de doenças infecciosas.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o prof. Dr. Luciano Barbosa, do Depto de Bioestatística do IBB/UNESP, pela análise estatística.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Silver L L, Bostian K A. Discovery and Development of New Antibiotics: the Problem of Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 377-83.
- [2] Lima M R F, Ximenez E C P A, Luna J S, Sant'Ana A E G, The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Braz J Pharmacogn* 2006;16:300-06,.
- [3] Funari C S, Ferro V O. Ethical use of the brazilian biodiversity: necessity and opportunity. *Braz J Pharmacogn* 2005; 15:178-82.
- [4] Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferra D, Polissiou M, Sokmen A, Akpulat H A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *J Ethnopharmacol* 2003; 87: 215-20.
- [5] Gallucci N, Casero C, Oliva M, Zygadlo J, Demo M. Interactions between terpenes and penicillin on bacterial strains resistant to beta lactam antibiotics. *Mol Med Chemistry* 2006; 10: 30-2.
- [6] Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Milillo M A, Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin, *Phytomedicine* 2007; 14: 727–32.
- [7] Aguiar J S, Costa M C C D, Nascimento S C, Sena K X F R. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Braz J Pharmacogn* 2008; 18: 436-40.
- [8] Costa A C, Santos B H C, Santos Filho L, Lima E O. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. *Braz J Pharmacogn* 2009; 19: 236-41.
- [9] Bertucci A, Olivaro C, Silva P A, Ramos D, Cerdeiras M P , Vázquez A. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay River. *Braz J Pharmacogn* 2009; 19: 20-5.
- [10] Ferronato R, Marchesan E D, Pezenti E, Bednarski F, Onofre S B, Antimicrobial activity of essential oils produced by *Baccharis dracunculifolia* D.C. and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Braz J Pharmacogn* 2007;17: 224-30.
- [11] Asolini F C, Tedesco A M, Carpes S T, Ferraz C, Ferraz S M. Antioxidant and antibacterial activities of phenolic compounds from extracts of plants used as tea. *Braz J Food Technol* 2006; 9: 209-15.
- [12] Oliveira D G, Prince K A, Higuchi C T, Santos A C B, Lopes L M X, Simões M J S, Leite C.Q.F. Antimycobacterial activity of some Brazilian indigenous medicinal drinks. *J Basic Appl Pharm Scie* 2007; 28: 165-69.

- [13] Betoni J E C, Mantovani R P, Barbosa L N, Di Stasi L C, Fernandes Junior A, Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101: 387-90.
- [14] Kumar A S, Venkateshwaran K, Vanith J, Saravanan V S, Ganesh M, Vasudevan M, Sivakumar T. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. Bangladesh J Pharmacol 2009; 4: 13-6.
- [15] Bapela N B, Lall N, Fourie P B, Franzblau S G, Van Rensburg C E. Activity of 7-methyljuglone in combination with antituberculous drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. Phytomedicine 2006; 13: 630–35.
- [16] Ushimaru P I. Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. [Monografia] Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 51p., 2007.
- [17] Sachin B S, Sharma S C, Sethi S, Tasduq S A, Tikoo M K, Tikoo A K, Satti N K, Gupta B D, Suri K A, Johri R K, Qazi G N. Herbal modulation of drug bioavailability: enhancement of rifampicin levels in plasma by herbal products and a flavonoid glycoside derived from *Cuminum cyminum*. Phytother Res. 2007; 21: 157–63.
- [18] Van Vuuren S F, Suliman S, Viljoen A M. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. Lett Appl Microbiol 2009; 48: 440–46.
- [19] Souza S M C, Pereira M C, Angélico C L, Pimenta C J. Evaluation of condiments essential oils on micelial growth of fungi associated to bread-making products. Ciênc Agrotecnol 2004; 28: 685-90.
- [20] Fonseca P, Librand A P L. Evaluation of physico-chemical and phytochemical characteristics of different tinctures of barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). Braz J Pharm Sci 2008; 44: 271-77.
- [21] Koneman E W, Allen S D, Janda N M, Sherechkenberger, P.C. Winn J.R. Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed., JB Lippincott, Philadelphia, 2001. 1395 p.
- [22] Clinical and Laboratory Standards Institute/National Comitee for clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth Information Supplement. CLSI/NCCLS document M 100-S15. Wayne, PA; 2005.

- [23] Silva M T N, Ushimaru P I; Barbosa L N, Cunha M L R S, Fernandes Jr A. Antibacterial activity of plant essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains isolated from human specimens. Braz J Medicinal Plants 2009; 11: 257-62.
- [24] National Committee for clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard. 8.ed. NCCLS document M2-A8. Wayne, PA; 2003.
- [25] Fernandes Jr A, Balestrin E C, Betoni J E C, Orsi R O, Cunha M L R D, Montelli A C. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005, 100: 563-66.

Anexos



Anexo 1: Extração de óleos essenciais pela metodologia de arraste a vapor a partir de aparelho tipo Clevenger.



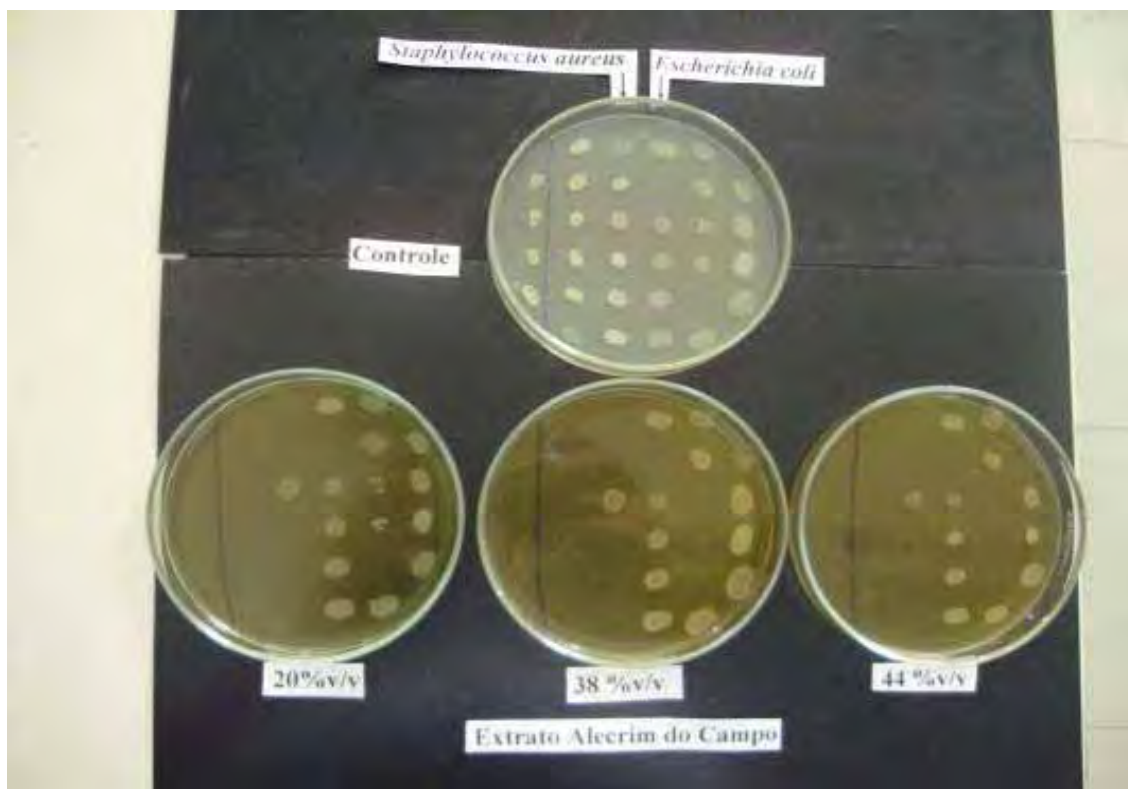
Anexo 2: Multiinoculador de Steer, utilizado para inocular as bactérias em placas utilizadas para a determinação da concentração inibitória mínima.



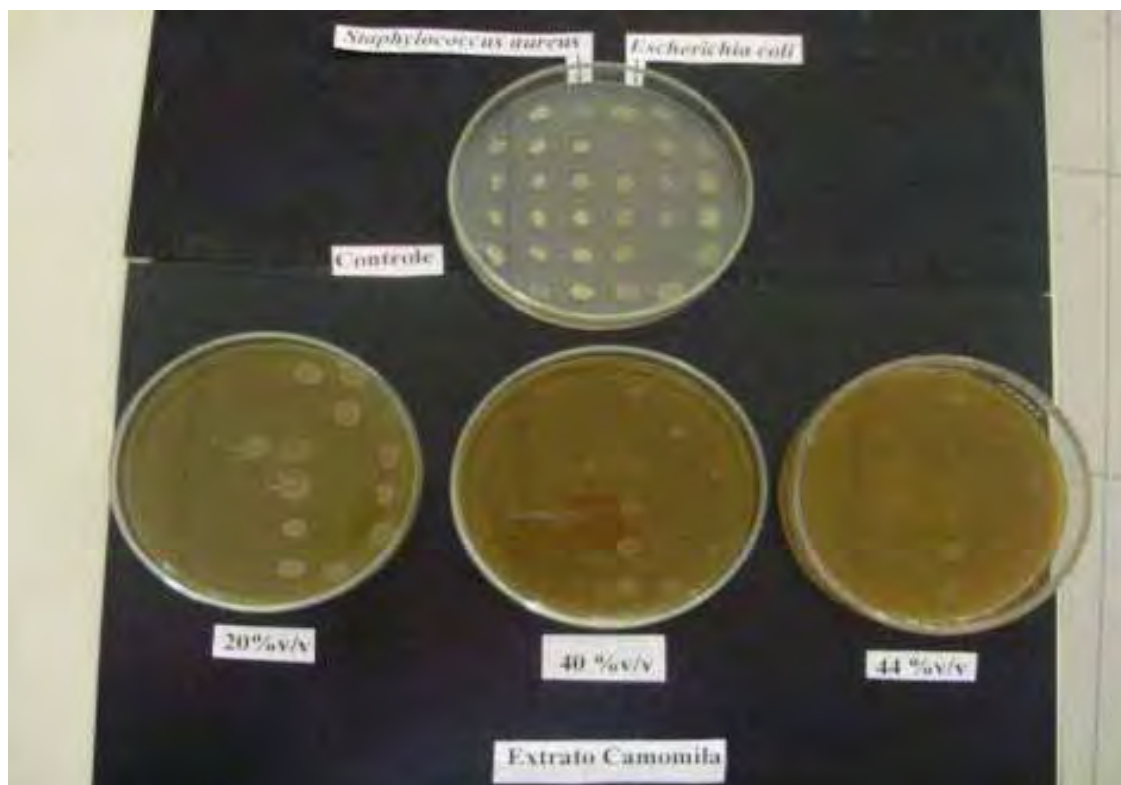
Anexo 3: Aparelho de destilação por arraste de vapor tipo Clevenger marca Marconi, modelo MA480, do Depto de Microbiologia e Imunologia/IBB/UNESP/Botucatu – utilizado para extração dos óleos essenciais.



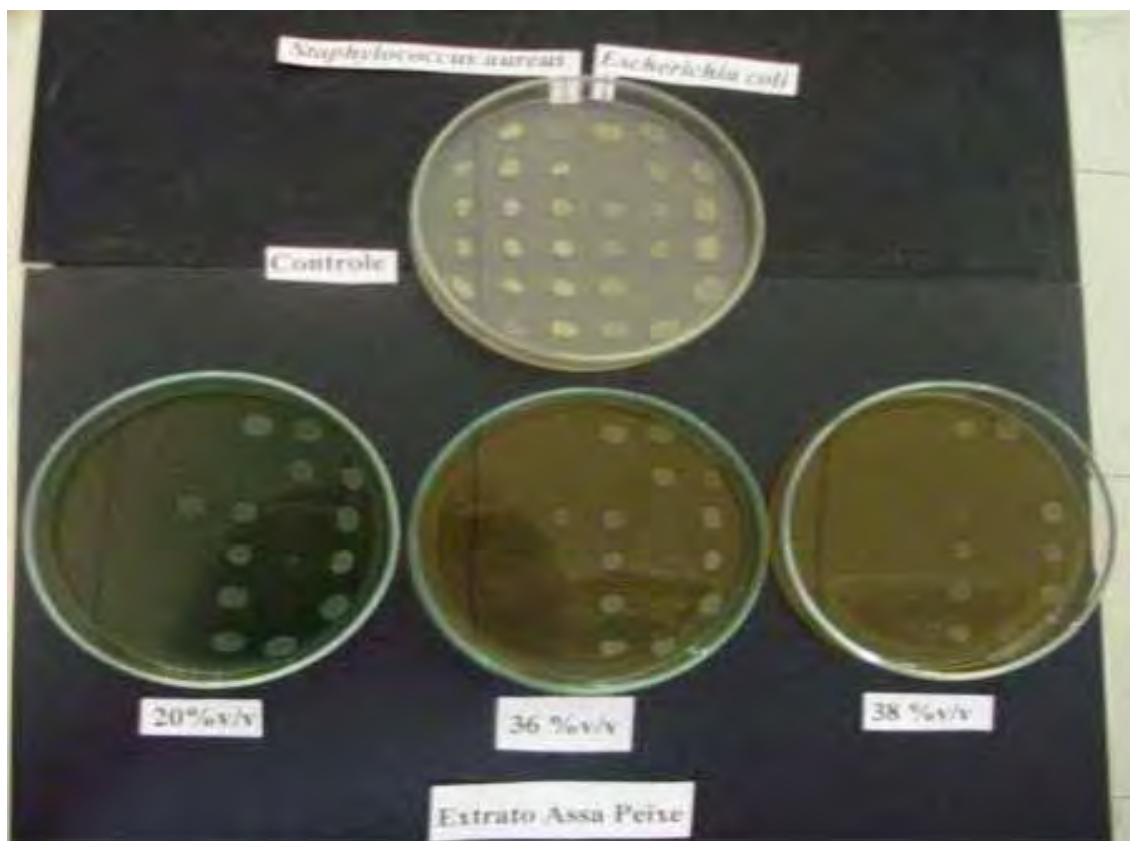
Anexo 4: Evaporador rotativo do laboratório de Microbiologia Imunologia/IBB/UNESP/Botucatu – utilizado para evaporação do solvente dos extratos.



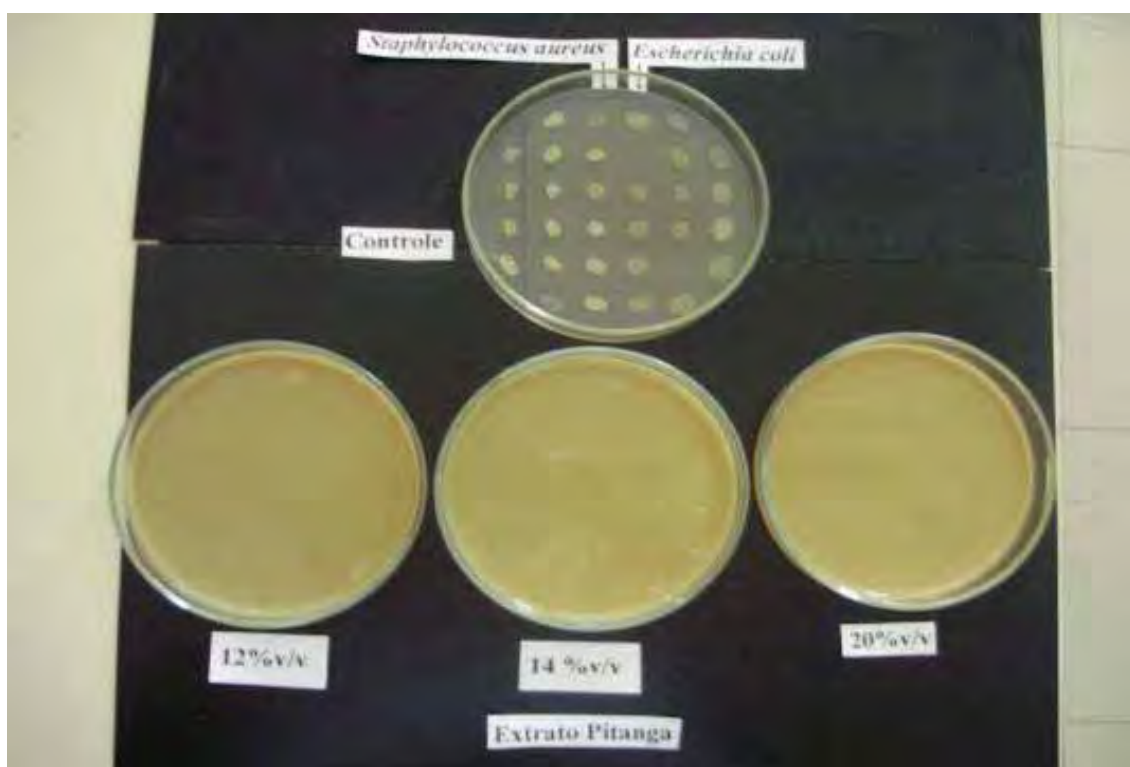
Anexo 5: Determinação da CIM para linhagens de *S.aureus* e *E.coli* submetidas ao extrato de alecrim do campo



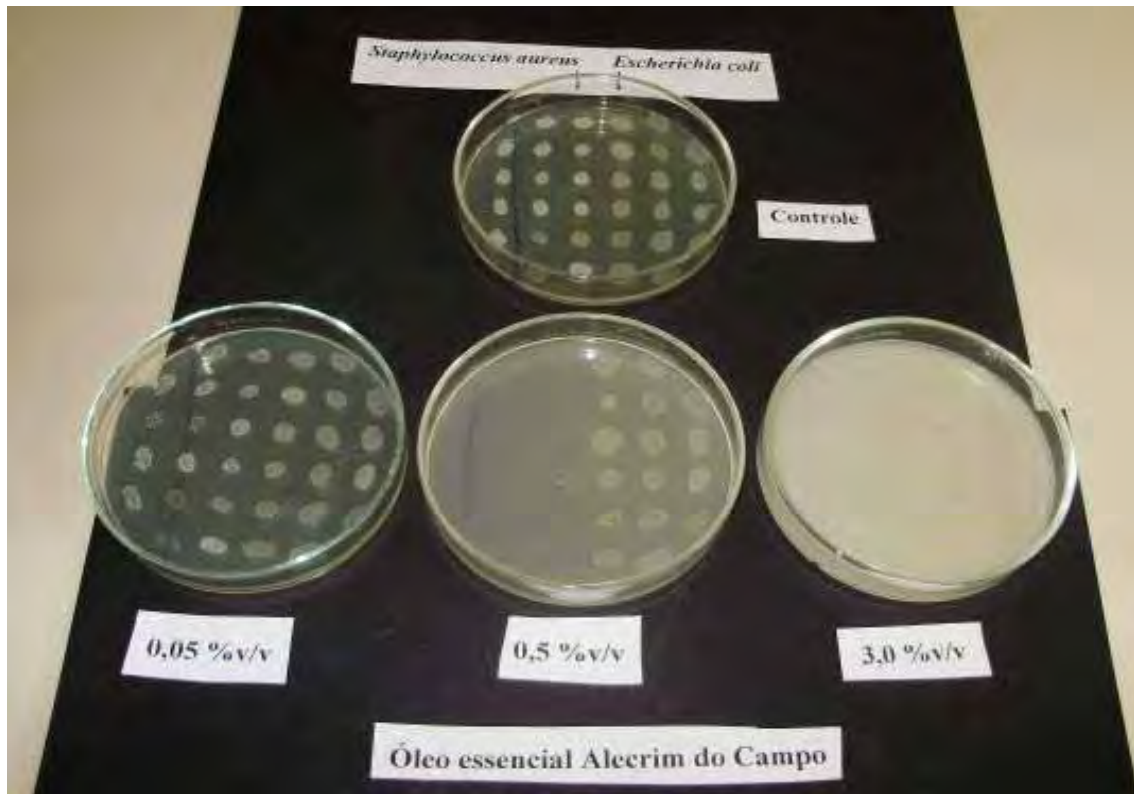
Anexo 6: Determinação da CIM para linhagens de *S.aureus* e *E.coli* submetidas ao extrato de camomila



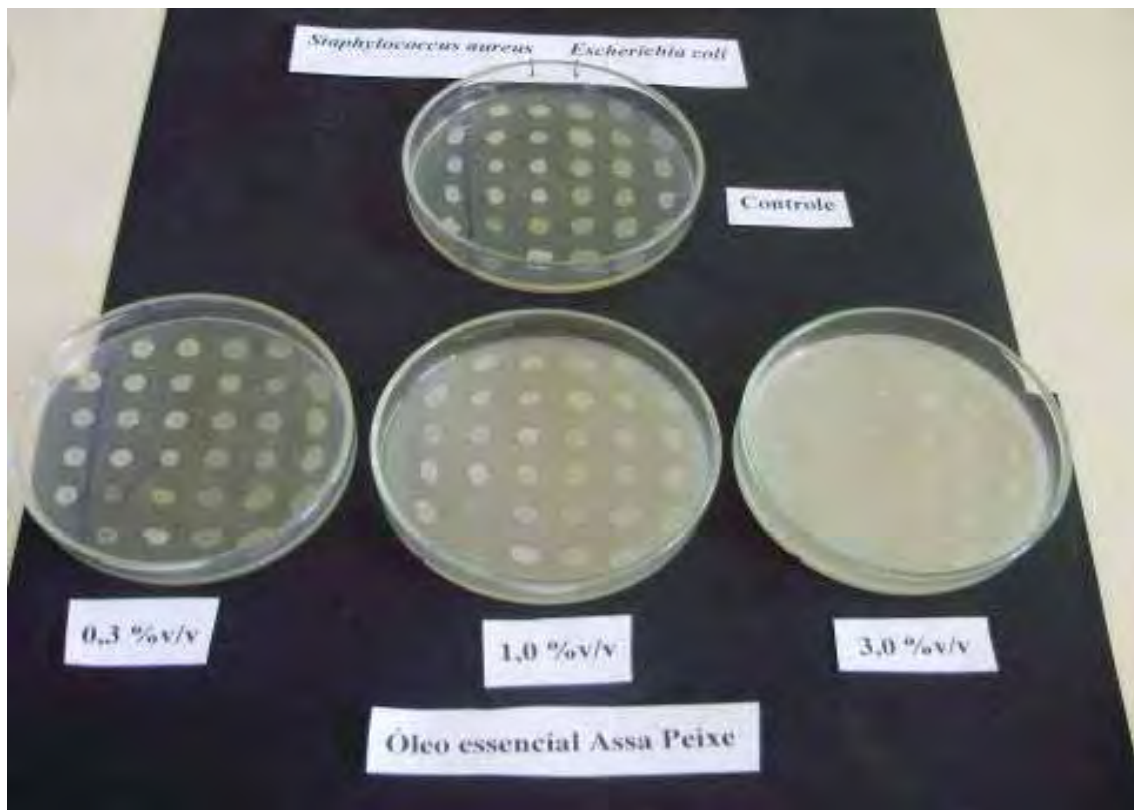
Anexo 7: Determinação da CIM para linhagens de *S.aureus* e *E.coli* submetidas ao extrato de Assa Peixe



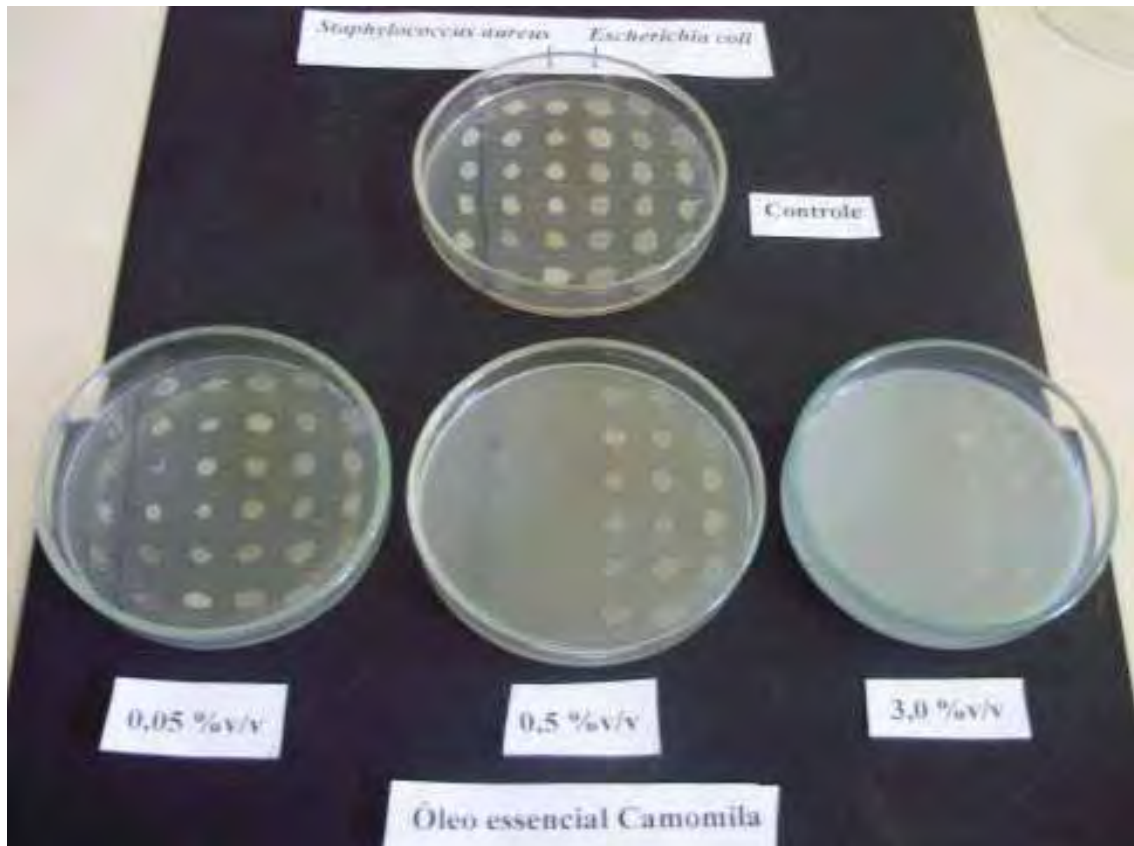
Anexo 8: Determinação da CIM para linhagens de *S.aureus* e *E.coli* submetidas ao extrato de Pitanga



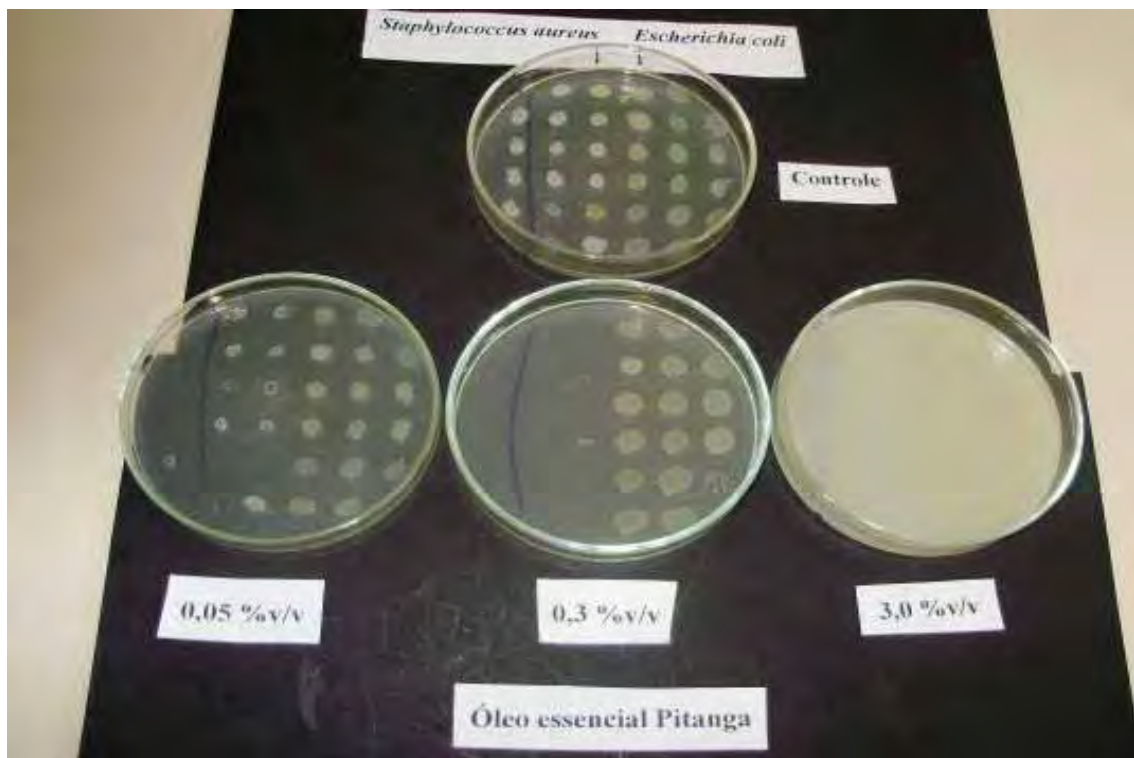
Anexo 9: Determinação da CIM para linhagens de *S.aureus* e *E.coli* submetidas ao óleo de Alecrim do Campo



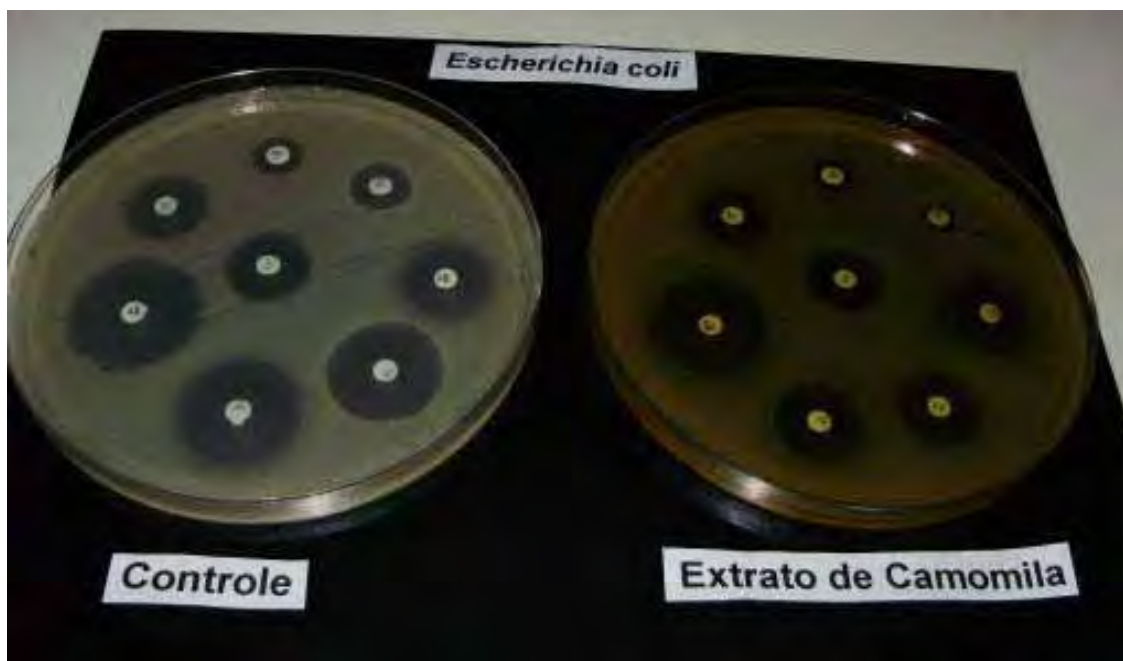
Anexo 10: Determinação da CIM para linhagens de *S.aureus* e *E.coli* submetidas ao óleo de Assa Peixe



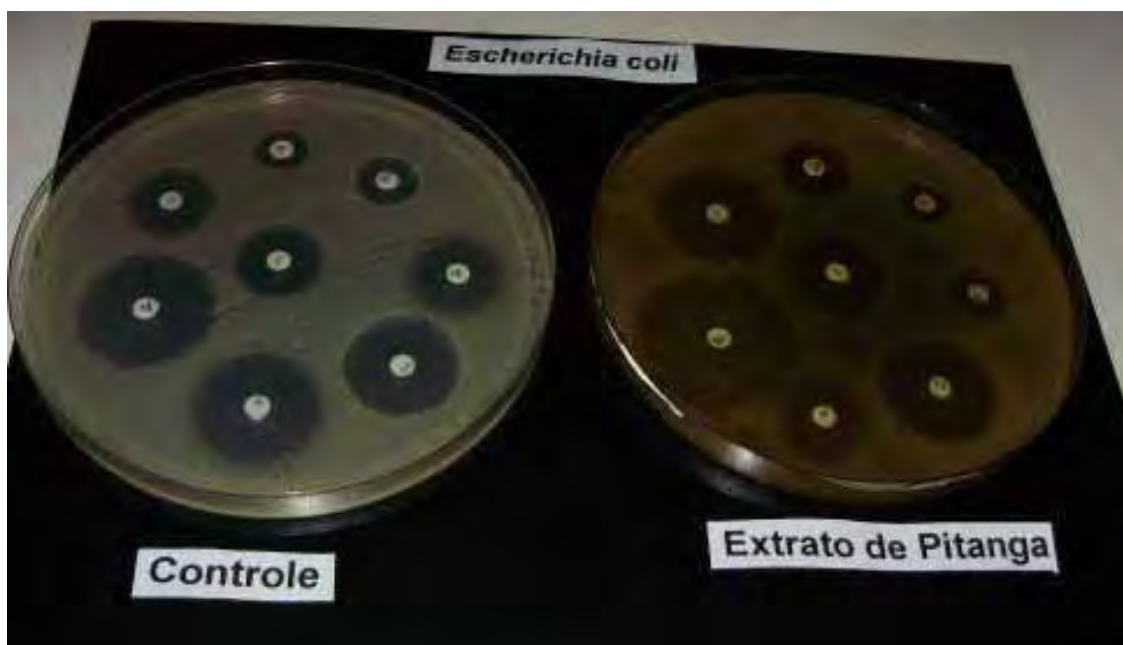
Anexo 11: Determinação da CIM para linhagens de *S.aureus* e *E.coli* submetidas ao óleo de Camomila



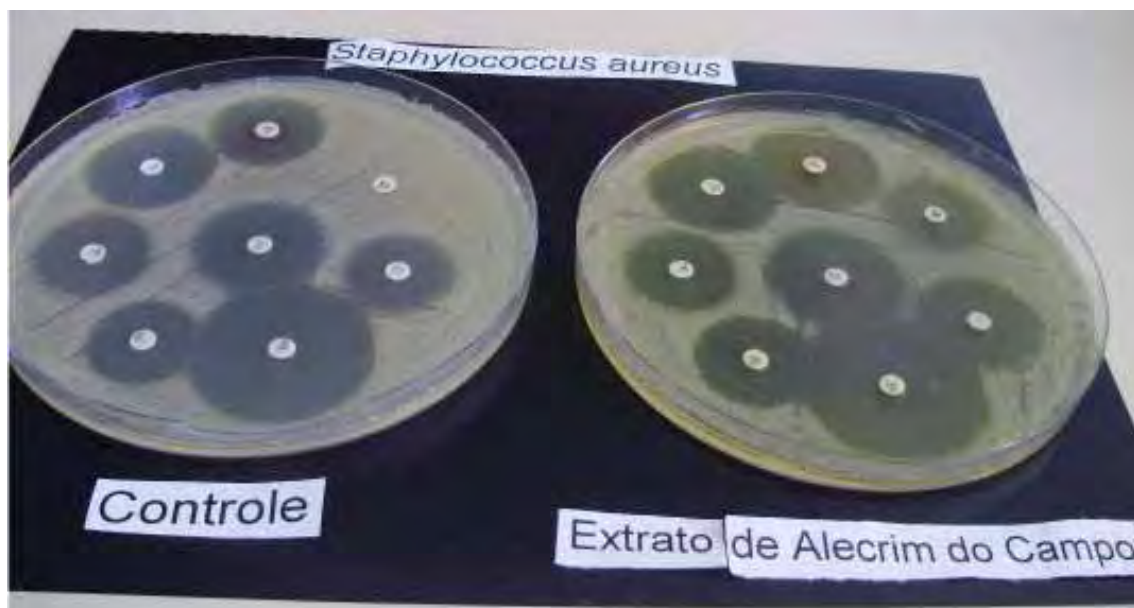
Anexo 12: Determinação da CIM para linhagens de *S.aureus* e *E.coli* submetidas ao óleo de Pitanga



Anexo 13: Aspecto geral dos ensaios para verificação das interações de drogas com o extrato de camomila pelo método do disco para a *E.coli*.



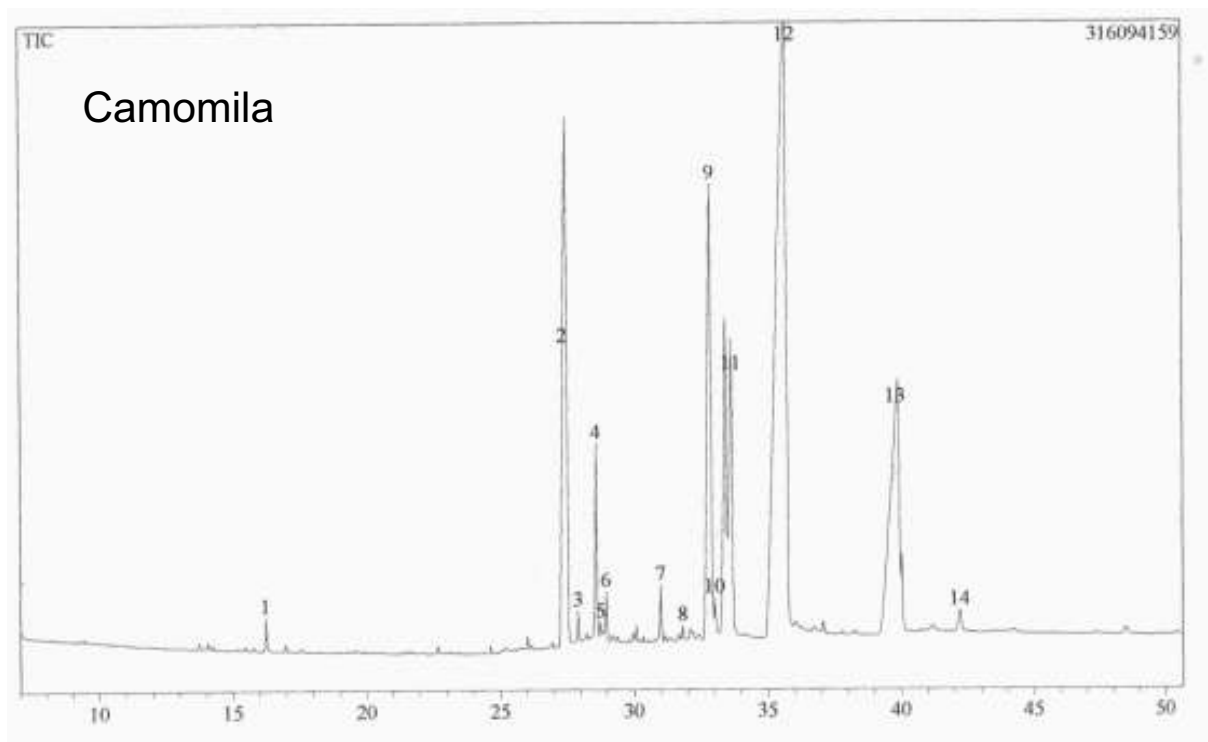
Anexo 14: Aspecto geral dos ensaios para verificação das interações de drogas com o extrato de pitanga pelo método do disco para a *E.coli*.



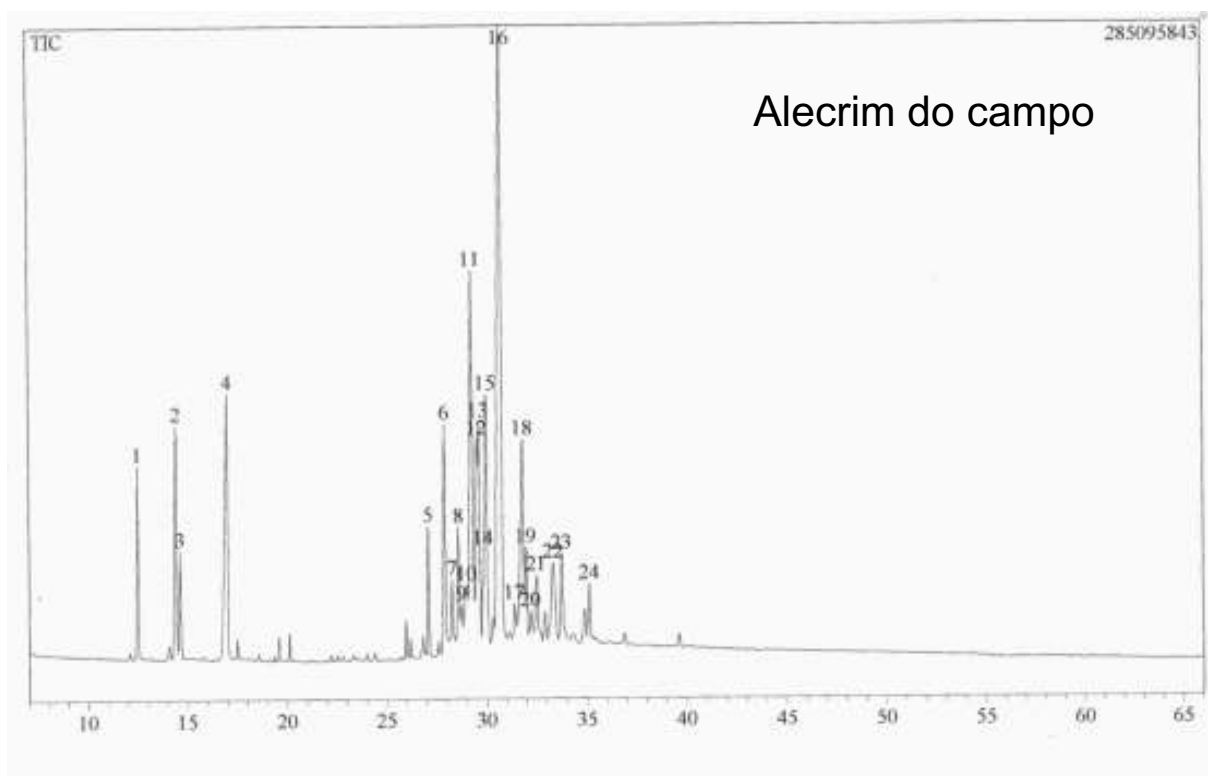
Anexo 15: Aspecto geral dos ensaios para verificação das interações de drogas com o extrato de alecrim do campo pelo método do disco para a *S.aureus*.



Anexo 16: Aspecto geral dos ensaios para verificação das interações de drogas com óleo de alecrim do campo pelo método do disco para a *S.aureus*.

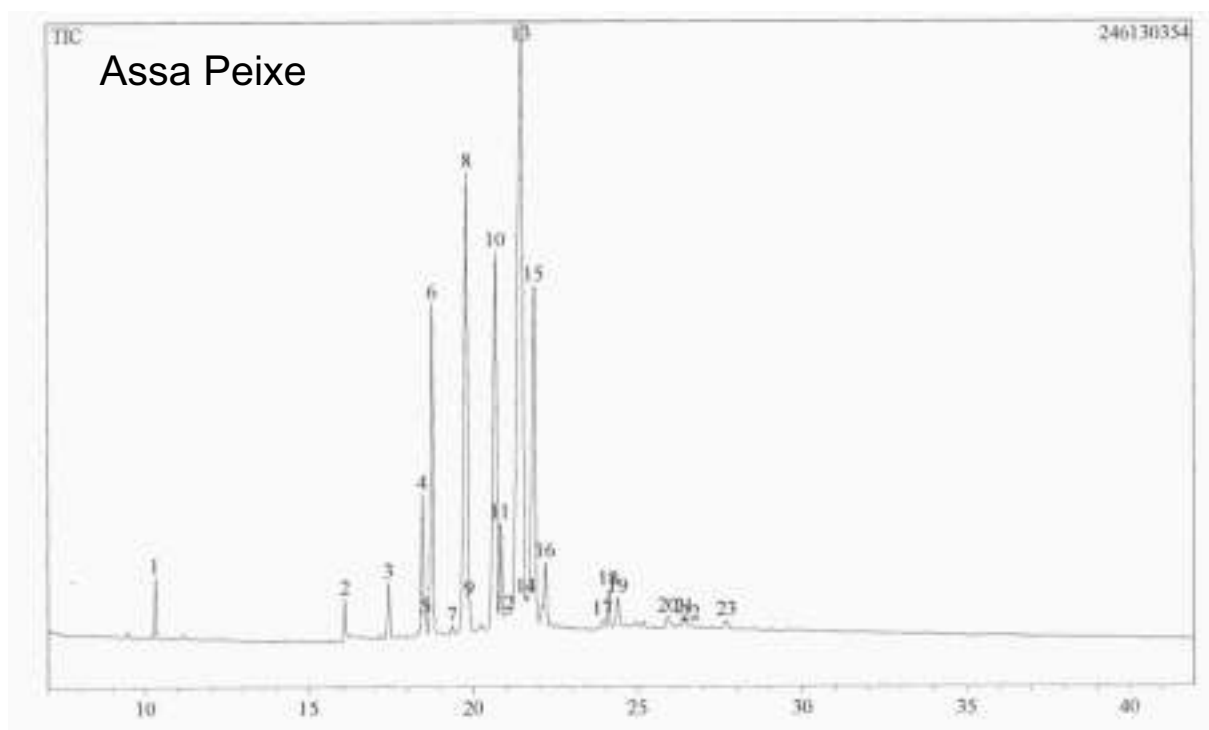


Anexo 17: Cromatograma para os compostos do óleo essencial de camomila. São apresentados os seguintes compostos: 1. β – elemeno, 2. Cariofileno, 4. α – farneseno, 5. Azuleno, 6. Germacreno, 7. Spatuleno, 9. Óxido de bisabolol, 11a. α –bisabolol, 11b. Óxido de bisabolona, 12. Camazuleno.

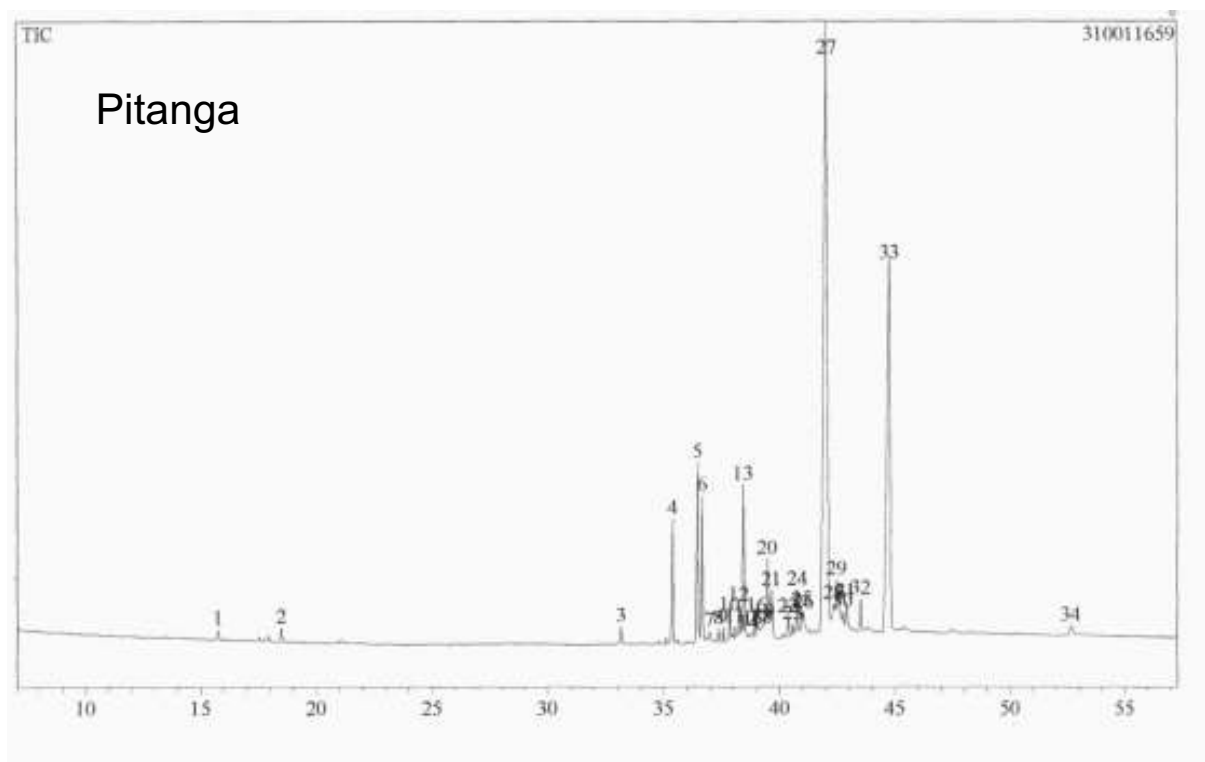


Anexo 18: Cromatograma para os compostos do óleo essencial de alecrim do campo. São apresentados os seguintes compostos: 2. β – pineno, 3. β – mirceno, 4. Limoneno, 5. Elemeno,

6. β – cariofileno, 8. α – cariofileno, 11. Germacreno D, 13. Germacreno B, 15. Cadineno, 16. Nerolidol, 18. Epatulenol, 22. Cardinol.



Anexo 19: Cromatograma para os compostos do óleo essencial de assa peixe. São apresentados os seguintes compostos: 1. β – pineno, 2. Carvacrol, 4. Copaeno, 6. Elemeno, 8. E – cariofileno, 10. α – cariofileno, 13. Germacreno D, 15. Germacreno B, 18. Epatulenol, 20. S – cadinol.



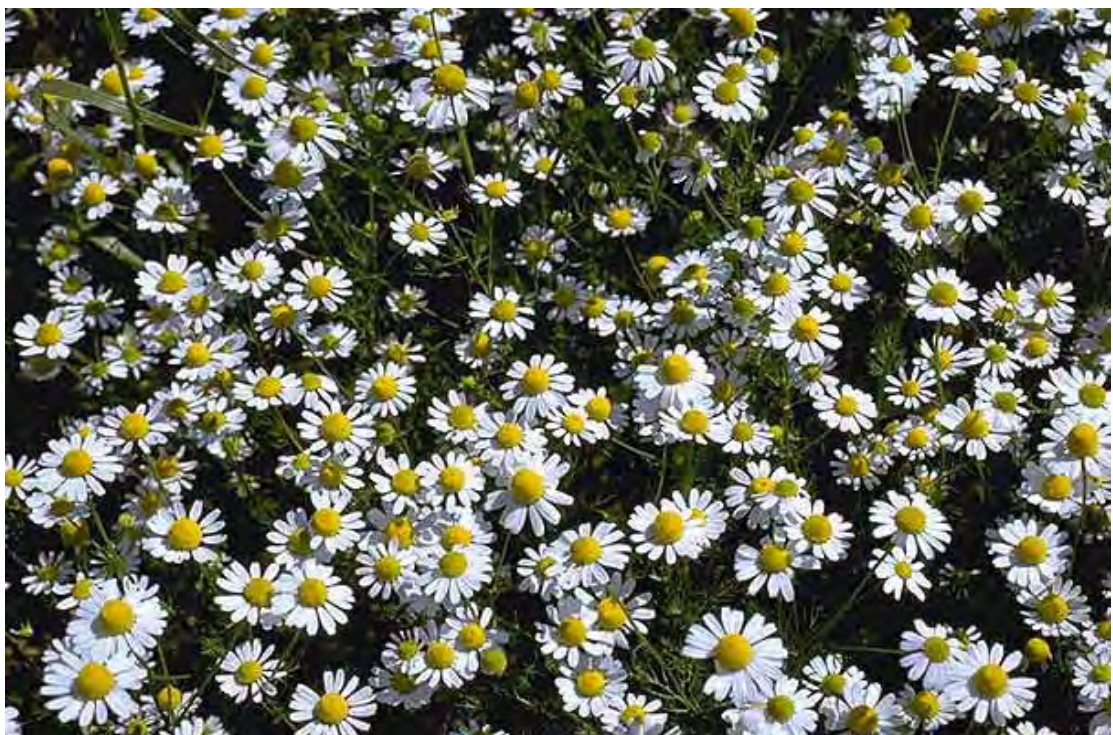
Anexo 20: Cromatograma para os compostos do óleo essencial de pitanga. São apresentados os seguintes compostos: 1. β – mirceno, 2. Ocimeno, 3. Terpinoleno, 4. β – elemeno, 5. β – cariofileno, 8. α – cariofileno, 23. Espatulenol, 27. Selina-1,3,7(11) trien-8-ona, 33. Selina-1,3,7(11) trien-8-ona-epoxido.



Anexo 21: Foto da planta medicinal Assa Peixe (*Vernonia polyanthes*). Fonte: www.curaplantas.fortunecity.com/infoverde7.htm.



Anexo 22: Foto da planta medicinal Pitanga (*Eugenia uniflora*)



Anexo 23: Foto da planta medicinal Camomila (*Matricaria chamomilla*). Fonte: http://www.ib.ns.ac.yu/VRDNIK/pages/Matricaria-chamomilla_gif.htm



Anexo 24: Foto da planta medicinal Alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*)