

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências
Departamento de Microbiologia e Imunologia

**Atividade antibacteriana de plantas do cerrado
da região de Botucatu - São Paulo**

Gabriela Soares da Silva

Orientador: Prof. Dr. Ary Fernandes Junior

Monografia apresentada ao departamento de Microbiologia/Imunologia do Instituto de Biociências – UNESP – Campus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Botucatu-SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Silva, Gabriela Soares da.

Atividade antibacteriana de plantas do cerrado da região de Botucatu - São Paulo / Gabriela Soares da Silva. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Ary Fernandes Junior

Capes: 21200009

1. Plantas medicinais. 2. Cerrado. 3. Microrganismos.

Palavras-chave: Análise fitoquímica; Atividade antimicrobiana; Extratos vegetais; Plantas medicinais do cerrado.

***Dedico este trabalho aos meus pais Suleny
e Adalberto e aos meus irmãos Bianca e Nil.
Obrigada pela força e o amor incondicional.
Esta caminhada não seria possível sem vocês.***

Agradecimentos

A **Deus**, pelas bênçãos concedidas, força e luz nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ary Fernandes Junior**, que durante esses anos foi mais que um mestre, foi sim um verdadeiro PAI. Sou grata pelos ensinamentos diários, preocupações, conselhos, oportunidade, confiança e dedicação depositados em mim e no meu trabalho.

A **Prof.^a Dr.^a Eliana M^a Nicolini Gabriel**, pelo apoio, sabedoria, confiança e pela oportunidade proporcionada durante esse ano de aprender a cada dia com o seu o amor pela educação.

A **BIO XLI NOTURNO**, minha segunda família e a melhor turma da GALÁXIA!!!! Sou muito grata por ter convivido com pessoas tão especiais durante esses anos. Meus dias e noites não seriam iguais sem vocês. Já sinto saudade dos nossos almoços, viagens, jogadas de mafioso..rs, e até das aulas...claro que com vocês ao meu lado. Que esse amor seja eterno.

As minhas eternas companheiras-irmãs-amigas de república, **Cólica, Ké, Mazzaropi e Tuga**. Obrigada por TUDO durante esse tempo. Cada dia em que passamos juntas, “gordices”, festinhas, risadas e até mesmos os puxões de orelha, tornaram esses anos inesquecíveis e os melhores da minha vida.

Aos agregados (mais que especiais) da república, **Birra, Breja, Bulldog, Bunda, Hã, Japa, Jaque, Kati, Mintirinha, Sami, Tedéu, Vegetal e Zuca**.

A equipe da **EMA**, onde pude vivenciar um ano incrível de muito aprendizado. O meu amor e gratidão a todos vocês. Especialmente a **Tedéu e Tuga**, minhas irmãs nesta caminhada, obrigada pela paciência, companheirismo e amor.

As minhas grandes amigas **Graciele** e **Thalita**, pelas risadas, reencontros, conversas e principalmente pela amizade verdadeira que não se abalou com a distância e com o tempo que passamos longe. Amo vocês!

As **amigas de laboratório**, pelo auxílio nesse projeto, pelo carinho e amizade.

Aos meus **pais** e **irmãos**, que estiveram presente a cada dia ao meu lado (mesmo que tão longe). Obrigada pelo apoio e força nos momentos mais difíceis durante todos esses anos. Vocês foram fundamentais para essa conquista.

A **toda minha família**, que de alguma maneira me incentivou e também fez parte dessa trajetória.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida
e sim a caminhada.
Caminhando e semeando,
no fim terás o que colher”*

Cora Coralina

Sumário

1. Introdução	12
2. Materiais e Métodos	17
2.1. Plantas e Preparos dos Extratos	17
2.2. Linhagens Bacterianas	18
2.3. Testes de Sensibilidade das linhagens bacterianas frente aos extratos de plantas	18
2.3.1. Ensaio Preliminares	18
2.3.2. Ensaio realizados pela metodologia da diluição em Agar e determinação da CIM	19
2.4. Análise Fitoquímica dos extratos brutos	20
2.5. Análise Estatística	21
3. Resultados e Discussão	22
4. Conclusões	34
5. Referências Bibliográficas	35
6. Anexos	42

Resumo

Atividade antibacteriana de plantas do cerrado da região de Botucatu - São Paulo

Os estudos relacionados à pesquisa de novos produtos antimicrobianos têm recebido atenção especial por parte dos pesquisadores, em especial devido ao surgimento de linhagens microbianas resistentes aos antimicrobianos convencionais. Assim, o presente estudo objetivou-se testar ação antibacteriana de extratos hidroalcoólicos de plantas coletadas em área de cerrado da região de Botucatu/SP, sendo estas as espécies: *Achyrocline satureioides* (Lam) DC (macela), *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville (barbatimão), *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC (quaresma-branca), *Davilla elliptica* A. St-Hil (lixinha), *Siparuna guianensis* (negramina) e *Solanum lycocarpum* A.St-Hil (lobeira).

As plantas foram coletadas sempre na parte da manhã, em áreas próximas a sede do município de Botucatu/SP, sendo que os extratos foram preparados utilizando como solvente uma solução de metanol 70% a partir de material desidratado (50°C) e moídos em moinho de facas. A extração foi feita durante 48 horas em temperatura de geladeira, seguido de filtração e eliminação do solvente metanol em evaporador rotativo e determinação do peso seco dos extratos (mg/mL) e análise fitoquímica dos mesmos. Os ensaios de sensibilidade para 10 de *S. aureus*, 11 de *E. coli* e 11 de *P. aeruginosa*, isoladas de casos clínicos humanos, foram realizados a partir da diluição de volumes dos extratos em Mueller Hinton Agar (MHA) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (mg/mL). De acordo com os resultados obtidos e análise estatística, verificou-se que em função das bactérias testadas, e em ordem decrescente de atividade antibacteriana, para *S. aureus*: Lixinha folha > Barbatimão folha > Quaresma-branca > Macela > Lixinha fruto > Barbatimão casca > Lobeira > Negramina; para *E. coli*: Lixinha folha > Barbatimão folha > Lixinha fruto = Barbatimão casca > Quaresma-branca > Macela = Lobeira > Negramina e para *P. aeruginosa*: Lixinha folha > Barbatimão casca > Barbatimão folha > Lixinha fruto > Macela > Lobeira > Quaresma-branca = Negramina. De acordo com análise fitoquímica, foi detectada a presença dos seguintes compostos nos extratos das plantas testadas: compostos fenólicos no barbatimão (folha), lixinha (fruto), macela, lobeira e negramina; flavonóides em todas

as plantas estudadas; saponinas presente em barbatimão (casca e folha), lixinha (fruto e folha) e quaresma-branca; triterpenos e esteróides livres presentes em barbatimão (folha), lixinha (folha), macela, quaresma-branca, lobeira e negramina; os taninos em barbatimão (casca e folha), lixinha (frutos e folhas) e na quaresma-branca; quinonas presentes em barbatimão (folha), lixinha (folha); cumarinas em barbatimão (folha), quaresma-branca e negramina; e por fim os alcalóides presentes apenas no extrato de negramina. De forma geral, verificou-se uma maior sensibilidade da bactéria *S. aureus* frente aos derivados vegetais testados, com um destaque para o extrato preparado com folhas de lixinha.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, plantas medicinais do cerrado, extratos vegetais, barbatimão, lixinha, lobeira, macela, quaresma-branca, análise fitoquímica.

Abstract

Antimicrobial activity of cerrado plants in Botucatu, Sao Paulo

The studies related to research on new antimicrobial products have received special attention from researchers, especially given the emergence of microbial strains resistant to conventional antimicrobials. Thus, the present study was aimed to test the antimicrobial action of hydro-alcoholic extracts of plants collected in Cerrado region of Botucatu, following the species: *Achyrocline satureioides* (Lam) DC (macela), *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville (barbatimão), *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC (quaresma-branca), *Davilla elliptica* A. St-Hil (lixinha), *Siparuna guianensis* (negramina) e *Solanum lycocarpum* A.St-Hil (lobeira).

The plants were always collected in the morning, in areas near the town of Botucatu, and extracts were prepared using a solvent such as methanol 70% from materials dried (50°C) and ground into mill knives. The extraction was performed for 48 hours at refrigerator temperature, followed by filtration, removal of methanol solvent in a rotary evaporator, determination of the dry weight of the extracts (mg / mL) and phytochemical analysis of the same. The sensitivity tests for 10 *S. aureus*, 11 *E. coli* and 11 *P. aeruginosa*, isolated from human clinical cases were performed by diluting volumes of the extracts in Mueller Hinton Agar (MHA) and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) (mg / mL). According to the results and statistical analysis, it was found that depending on the bacteria tested, and in descending order of antibacterial activity for *S. aureus*: Lixinha sheet > Barbatimão sheet > Quaresma-Branca > Macela > Lixinha fruit > Barbatimão shell > Lobeira > Negramina; *E. coli*: Lixinha sheet > Barbatimão sheet > Lixinha fruit = barbatimão peel > Quaresma-Branca > Macela = Lobeira > Negramina and *P. aeruginosa*: Lixinha leaf > Barbatimão bark > Barbatimão leaf > Lixinha fruit > Macela > Lobeira > Quaresma - Branca = Negramina. According to phytochemical analysis, were detected the presence of the following compounds in the extracts of plants tested: phenolic compounds in barbatimão (leaf), lixinha (fruit), macela, lobeira and negramina; flavonoids in all species studied; saponins present in barbatimão (bark and leaf), lixinha (fruit and leaf) and quaresma-branca; triterpenes and free steroids present in barbatimão (leaf), lixinha (leaf), macela, quaresma-branca, lobeira and negramina; tannins in barbatimão (bark and leaf), lixinha (fruits and leaves) and

quaresma-branca; quinones present in barbatimão (leaf), lixinha (sheet); coumarins in barbatimão (leaf), quaresma-branca and negramina, and finally the alkaloids present only in the extract negramina. Overall, there was a greater sensitivity of the bacterium *S. aureus* compared to vegetable products tested, with an emphasis on the extract prepared from leaves of lixinha.

Key words: antimicrobial activity, medicinal plants of cerrado, plant extracts, barbatimão, lixinha, lobeira, macela, quaresma-branca, phytochemical analysis.

1. Introdução

O Brasil possui cinco áreas de grande abundância de plantas nativas, estando entre elas o bioma Cerrado (Guarim Neto & Morais, 2003). Esse bioma é apontado como grande detentor de diversidade biológica mundial e estima-se que sua flora apresente aproximadamente 10 mil espécies de plantas sendo inúmeras dessas com potencial alimentício, ornamental, condimentar, corante, têxtil, corticeiro, tanífero, oleaginosas, apícola, medicinais e artesanais (Almeida *et al.*, 1998; Ribeiro *et al.*, 1998).

No entanto aproximadamente 55% da área original de cerrado foram desmatadas ou transformadas por ação antrópica, ocorrendo então danos ambientais incluindo perda de grande parte da biodiversidade (Machado *et al.*, 2004)

A região de Botucatu, situada no centro-oeste do Estado de São Paulo, possui remanescentes de cerrado com diferentes graus de perturbação antrópica, com previsão de total extinção. O conhecimento e a valorização da flora deste Bioma pode ser um mecanismo eficiente para a sua conservação (Maroni *et al.*, 2004).

Por tanto já que a riqueza da flora do cerrado em espécies com potencial terapêutico é imensa (Mendonça *et al.*, 1998) e a utilização de medicamentos como os fitoterápicos têm uma crescente demanda, é de extrema importância o conhecimento sobre essas plantas para uma possível utilização desses produtos naturais no combate à diversas enfermidades.

Atualmente são utilizadas drogas sintéticas e semi-sintéticas no combate de infecções causadas por microrganismos. Porém um problema encontrado com esse tipo de terapia é a resistência apresentada por alguns destes microrganismos a determinados medicamentos, resistência essa que geralmente é causada pela automedicação e como consequência tem-se uma alteração na natureza genética das bactérias tornando-as menos sensíveis aos antibióticos (Vargas *et al.*, 2004; Schelz *et al.*, 2006).

A resistência a drogas de patógenos humanos é um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo demasiado de antibióticos tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública (Duarte, 2006).

Uma alternativa para reverter essa situação de resistência seria a utilização de produtos naturais, já que reduzem os efeitos provocados pela terapia hoje empregada que utiliza fármacos sintéticos e semi-sintéticos. O uso das espécies vegetais, com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas, remonta ao início da civilização, desde o momento em que o homem despertou e começou um longo percurso de manuseio, adaptação e modificação dos recursos naturais para seu próprio benefício (Di Stasi, 1996).

Muitas espécies vegetais têm sido usadas por apresentar características antimicrobianas, ação essa verificada em compostos sintetizados pelo metabolismo secundário da planta. Estes produtos são reconhecidos por suas substâncias ativas, como é o caso dos compostos fenólicos, que fazem parte dos óleos essenciais e dos taninos (Loguercio *et al.*, 2005 *apud* Nascimento *et al.*, 2000). Os metabólitos secundários presentes em algumas plantas podem ser influenciados por inúmeros fatores ambientais que modificam diretamente sua quantidade e qualidade (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Assim, a pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais ou determinar a sua presença, quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, além disto, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma (Falkenberg *et al.*, 2001).

Dentre as plantas medicinais com alta atividade antimicrobiana utilizadas no combate de diversas doenças podemos citar a *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC., conhecida como marcela, marcela-do-campo, marcela-da-terra (Almeida, 1993), macela, camomila nacional e macela-amarela (Lorenzi, 2002). É uma erva anual da família Asteraceae, possui ramificações de até 1,5 m de altura coberta de pilosidades brancas. As folhas são alternas, inteiras, sésseis lineares, lanceoladas. Possui inflorescências do tipo capítulos em dois tipos de flores, reunidas em panículas corimbosas. As flores são amarelo-dourado, as centrais hermafroditas, em número de uma a duas, e as flores marginais são quatro ou cinco. O fruto é do tipo aquênio, glabro e pardo (Castro & Chemale, 1995). Na medicina popular é utilizada principalmente em infusões para uso digestivo, sedativo, anti-inflamatório, anti-espasmódico, analgésico e diurético e também como bronco dilatador (Simões *et al.*, 1988). Estudos mostram que o extrato etanólico de *A. satureioides* é efetivo na inibição de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e

Staphylococcus aureus, onde o último apresentou um maior halo de inibição (Asolini *et al.*, 2006). Através de técnica de Sistema de Tubos Múltiplos verificou-se *in vitro* que *A. saturoioides* apresenta ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis* (Mota, 2008). A *A. saturoioides* tem demonstrado atividade *in vitro* contra *Salmonella* e *Escherichia coli*, o que pode explicar o seu uso popular em infecções intestinais, diarreias e desenterias. Este efeito mutagênico é devido principalmente à quercetina (Ohshima *et al.*, 1998 *apud* Asolini *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2002; Polydoro *et al.*, 2004).

Outra planta bastante utilizada popularmente é *Stryphnodendron adstringens*, mais conhecido como barbatimão. A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae), possui um fruto que é um legume sésil, grosso e carnoso. Apresenta inflorescências com número variável de flores pequenas de cor marrom, e frutos em algum estágio de maturação durante o ano todo (Felfili *et al.*, 1999 *apud* Corrêa, 1984; Lorenzi, 1992; Oliveira, 1991). O decocto das cascas desta planta é popularmente empregado na maioria das regiões do Brasil no tratamento da leucorréia, hemorragias, diarreia, hemorróidas, para limpeza de ferimentos e na forma de gotas contra conjuntivite (Nunes *et al.*, 2003; Macedo & Ferreira, 2004). Apresenta ação tripanocida (Herzog-Soares *et al.*, 2002), e seu extrato hidroalcoólico bruto a ação antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, *Kocuria rhizophila*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida krusei* (Orlando, 2005). O extrato hidroalcoólico bruto de barbatimão foi ativo frente aos microrganismos *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei*, o que sugere então o uso como adjuvante no controle da cárie dental (Soares *et al.*, 2008). Essas ações devem-se principalmente a presença de metabólitos secundários em suas folhas e casca, como tanino e flavonóides (Santos *et al.*, 2006; Oliveira & Figueiredo, 2007).

Davilla elliptica, também conhecida como lixinha, é usada principalmente no tratamento de hemorróidas, hérnia e diarreia, e em aplicações tópicas como antisséptico na limpeza de ferimentos. É empregada como adstringente, tônico, laxativo, sedativo, diurético (Silva *et al.*, 2001 *apud* Soares *et al.*, 2005; Rodrigues & Carvalho, 2001). Em suas folhas foram verificadas a presença de flavonóides, triterpenóides, esteróides, ácido gálico, catequinas, taninos, saponinas e cumarinas (Soares *et al.*, 2005). O extrato apolar obtido a partir das folhas possui atividade

efetiva na ação contra *Mycobacterium fortuitum* (Arantes et al., 2005), já o extrato metanólico das folhas e cascas apresentam atividade contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Shigella* spp, *Candida albicans* e *E. faecalis* sendo observado uma maior atividade no extrato das folhas (Michelin et al., 2005). Alguns estudos mostram também, que o extrato de clorofórmio feito a partir da lixinha pode apresentar compostos bactericidas contra *Mycobacterium tuberculosis* já que mostrou atividade antimicobacteriana sobre o mesmo (Lopes et al., 2007)

A *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil, que pertence a família Solanaceae, conhecida popularmente como lobeira ou fruta-do-lobo, também é uma espécie arbustiva de ocorrência rara na vegetação nativa (Felfili et al., 1992), e amplamente distribuída em ambientes perturbados do Cerrado (Lombardi & Motta Jr., 1993). As plantas do gênero *Solanum* apresentam alguns alcalóides tais como a solanina, solamargina e solasodina (Motidome et al., 1970) e também possuem fenóis que são comumente encontrados nas folhas (Güntner et al., 1997).

Já a *Miconia rubiginosa*, popularmente denominada como quaresma-branca, é uma espécie constituinte da família Melastomataceae e alguns estudos mostram que os extratos do gênero *Miconia* e seus compostos isolados demonstraram atividades biológicas tais como ação antitumoral, analgésica e antifúngica (Antoun et al., 1993; Hasrat et al., 1997; Li et al., 2001), mas esses estudos ainda são escassos. No entanto especialmente a espécie *M. rubiginosa* mostrou-se efetiva na ação antimicrobiana (Celloto et al., 2003), ação que pode ser explicada pela presença de uma variedade de substâncias em seu extrato como, ácidos do triterpenos.

A espécie *Siparuna guianensis*, conhecida popularmente como negramina, pertence à família Monimiaceae, é uma espécie medicinal e aromática, arbórea da flora brasileira (Zoghbi et al., 1998). São monóicos, com altura entre 5 a 15 metros, apresenta casca cinza e lisa (Renner e Hausner, 2005). Suas folhas são utilizadas na forma de banho para sinusite e para dores no corpo (Carmona et al., 2001; Souza, 1995), ainda podem usadas na forma de decocto e infusão para cura de malina que é descrita como uma dor de cabeça causada pela exposição demasiada ao sol, que provoca corrimento de sangue nasal e também para resfriados (Fontinelle, 1997). A folha é o órgão vegetal que apresenta maior concentração de

óleo essencial e não apresenta variabilidade sazonal em sua produção (Castelani, 2006).

Devido a grande quantidade de espécies com propriedade antimicrobiana e ao escasso número efetivo de estudos nessa área, principalmente com espécies nativas de cerrado, objetivou-se avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* de extratos de seis plantas, deste bioma através de estudo preliminar pela metodologia dos discos e verificação de halo de inibição seguido pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através da metodologia da diluição em Agar, frente a linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de casos clínicos humanos e finalizando com a análise fitoquímica dos extratos .

2. Materiais e Métodos

2.1. Plantas e Preparos dos Extratos

Para as plantas selecionadas para os experimentos foram utilizados diferentes órgãos vegetais devido a diferença entre os princípios ativos produzido pelos mesmos, sendo assim foram coletadas folhas de lobeira, folhas e casca de barbatimão e flores de macela em área da Escola do Meio Ambiente localizada na cidade de Botucatu/SP (22° 55' 34,86"S - 48°27'33,33" O). As folhas e frutos de lixinha foram coletados de um exemplar localizado no distrito de Rubião Junior/Botucatu (22° 53' 01,26"S - 48°30'26,63" O), e as folhas de quaresma-branca e negramina foram coletadas em região próxima ao lago formado no rio Tiete pela represa da Barra bonita/SP (22° 42' 14,88" S - 48° 20' 38,17"O). As coletas foram feitas sempre no período da manhã, sendo que os materiais vegetais coletados foram imediatamente processados e colocados em estufa com circulação forçada de ar em temperatura de 45° C por um período de aproximadamente 48 horas. Na seqüência procedeu-se a moagem dos órgãos vegetais em moinho de facas, e posteriormente ocorreu a preparação dos extratos vegetais que foram preparados utilizando como solvente o metanol 70%, obtendo assim um filtrado após 48 horas de extração em temperatura de geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) seguido de evaporação do solvente em rota vapor marca Phoenix (Betoni *et al.*, 2006). Após obtenção dos extratos, foram tomadas cinco alíquotas de 1ml para cada extrato, cada alíquota permaneceu em estufa de circulação forçada de ar (45°C) para evaporação do solvente, após secagem do material procedeu-se pesagem e obtenção do peso seco em mg/mL. Foram preparadas exsiccatas de cada material vegetal, para identificação e depósito no Herbário Profa. Dra. Irina Delanova Gemtchujnicov do Depto de Botânica/IBB/UNESP/Botucatu. As exsiccatas foram catalogadas com a seguinte numeração: *Stryphnodendron adstringens* (25961), *Siparuna guianensis* (25962), *Solanum lycocarpum* (25963), *Achyrocline satureioides* (25964), *Davilla elliptica* (25965) e *Miconia rubiginosa* (25966).

2.2. Linhagens Bacterianas

Foi testada a ação antibacteriana dos extratos sobre linhagens de *S. aureus*, *E. coli* e *P.aeruginosa* isoladas de casos clínicos humanos, e identificadas segundo (Koneman, 2001), de pacientes do Hospital das Clínicas UNESP-Campus Botucatu/SP. Para cada espécie foi utilizada também uma linhagem ATCC (American Type Culture Collection) sendo essas: *Sa*-ATCC 25923, *Ec*-ATCC 22652 e *Pa*-ATCC 27853. Estas amostras encontravam-se estocadas em meio de ágar nutriente no Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB/UNESP/Botucatu-SP. Foi obtida autorização junto ao Comitê de Ética na Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP/campus de Botucatu, sob protocolo 3098/2009-CEP, por tratar-se de microrganismos isolados de casos clínicos humanos.

2.3. Testes de Sensibilidade das linhagens bacterianas frente aos extratos de plantas.

2.3.1. Ensaio preliminares

Quanto a verificação preliminar de sensibilidade das linhagens bacterianas, foram realizados dois tipos de ensaios, utilizando as linhagens padrões ATCC (*Staphylococcus aureus* - *Sa*-ATCC 25923, *Escherichia coli* - *Ec*-ATCC 22652 e *Pseudomonas aeruginosa* - *Pa*-ATCC 27853) objetivando realizar um estudo preliminar da ação antimicrobiana dos derivados vegetais, sendo que um é uma adaptação do método da difusão do antimicrobiano a partir de disco de papel impregnados com os respectivos extratos das plantas e outro é o método da diluição em meio líquido de extratos e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2005).

Na metodologia dos discos, foram preparados discos de papel (estéreis) com aproximadamente 6 mm de diâmetro seguido de adição de volumes de 20 µL dos respectivos extratos e mantidos a temperatura ambiente até realização dos ensaios. As bactérias foram semeadas através de “swab” estéreis em placas de Petri com Mueller Hinton Agar (MHA-Merck) a partir de suspensões bacterianas padronizadas

na escala 0,5 de MacFarland. Em cada placa foram colocados nove discos, sendo oito embebidos com os extratos das plantas e um disco contendo o antibiótico Tetraciclina (TET) como controle de sensibilidade bacteriana. Após 35°C/24 horas, foram feitas leituras dos halos de inibição com uso de uma régua comum. Os testes foram realizados em triplicata para cada uma das espécies testadas e os resultados expressos em mm através da média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições.

No método de diluição, foram utilizadas as mesmas linhagens ATCC frente aos extratos para determinação das respectivas CIM para cada microrganismo utilizando a metodologia da diluição dos extratos em meio de cultura líquida (BHI-Merck). Vale destacar que para facilitar a realização dos ensaios adotou-se a nomenclatura das concentrações em %v/v (volume extrato/volume meio de cultura) variando de 5 a 30%v/v, sendo posteriormente estes valores transformados nos respectivos valores em mg/mL. Foram utilizadas placas de Elisa estéreis com 24 poços e capacidade para aproximadamente 3 ml em cada poço. Após preparo das concentrações (5, 10, 15, 20, 25 e 30%v/v) em um volume total de 2 ml em cada poço, foram adicionados volumes de 1,6 µl de volume das respectivas suspensões bacterianas padronizadas na escala 0,5 de Mac Farland visando obtenção de concentrações bacterianas na faixa entre 10^5 e 10^6 UFC/ml como concentração inicial de inóculo para cada bactéria testada. Após incubação a 35°C/24 horas foram realizadas sub-culturas em placas de MHA para determinação dos valores aproximados de CIM. Feito este procedimento, procedeu-se adição de 5µl de uma solução 1% de resazurina, que com viragem de cor roxa para vermelha nos respectivos poços da placa de Elisa, revelava a presença de bactérias viáveis no meio de cultura e conseqüentemente crescimento bacteriano. Quando finalizados estes ensaios, procedeu-se a transformação dos valores de concentração em %v/v para mg/mL utilizando os valores de peso seco dos extratos.

2.3.2. Ensaios realizados pela metodologia da diluição em Agar e determinação da CIM

Após estes estudos preliminares, foram realizados ensaios para determinação da CIM para um total 10 linhagens de *S. aureus*, 11 de *E.coli* e 11 de *P. aeruginosa*

utilizando a metodologia da diluição dos extratos em ágar (CLSI, 2005). Foram utilizadas concentrações entre 1,0 a 40 (% v/v), essas concentrações foram obtidas a partir da diluição dos respectivos volumes dos extratos em placa de Petri contendo Mueller Hinton Agar e posteriormente semeadas com as respectivas bactérias (32 no total) utilizando um multiinocular, denominado multiinocular de Sterr. As linhagens bacterianas a partir de culturas em BHI (37° C/18-24 horas) foram padronizadas na escala 0,5 de MacFarland e diluições feitas em meio BHI para obtenção de inóculo na faixa entre 10⁵ a 10⁶ UFC/ml. Em seguida procedeu-se a inoculação das linhagens nas respectivas placas e levadas a estufa para incubação a 37°C/18-24 horas, para posterior leitura dos valores de CIM para cada linhagem, leitura esta verificada pela formação ou não de colônias bacterianas nas várias concentrações testadas. Os ensaios foram realizados em duplicata. Após a determinação da CIM foram realizados os cálculos para obtenção dos valores de CIM 90% para cada espécie bacteriana. Durante o ensaio para a determinação de CIM, nem todas as concentrações foram possíveis de serem testadas devido a ausência de solidificação do meio utilizado, especialmente nas concentrações elevadas (acima de 20%v/v), que devido características próprias do barbatimão e quaresma-branca não possibilitavam a solidificação do meio de cultura. No caso de concentrações acima de 20%v/v preparamos o MHA numa concentração 1,5 vezes o que é especificado pelo fabricante, justamente para evitar problemas de falta de nutrientes para as bactérias nas concentrações elevadas e também para não diluir demasiadamente o ágar presente no meio de cultura prejudicando a solidificação do meio de cultura.

2.4. Análise fitoquímica dos extratos brutos

A metodologia adotada foi preconizada por Matos (1988). Os extratos foram preparados a partir de 50g de cada material seco e pulverizado, submetidos a extração por maceração a frio (4°C) com metanol puro. 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 em estufa a 50°C. 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 foram submetidas às reações clássicas descritas na marcha fitoquímica de Matos (1988), para a detecção de classes gerais de compostos secundários.

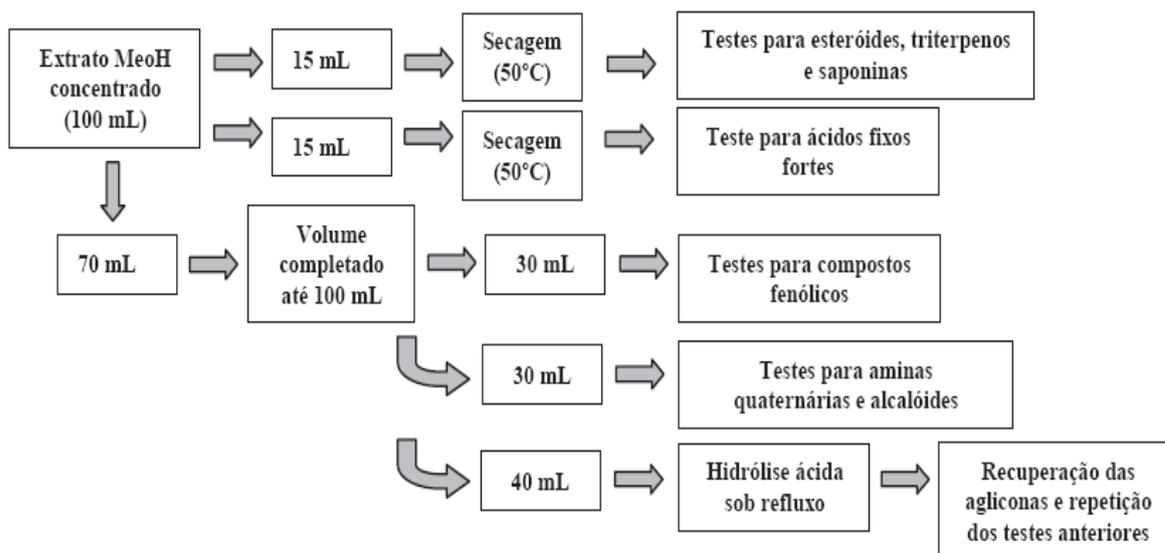


Figura 1. Esquema dos procedimentos para análise fitoquímica (Matos, 1988)

4.5. Análise Estatística

A análise estatística desse experimento foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis ou Análise de Variância não-paramétrica.

3. Resultados e Discussão

Os resultados apresentados representam as observações feitas durante ensaios sobre ação antibacteriana de extratos de plantas coletadas na região de cerrado do município de Botucatu/SP, tendo sido escolhidas em função de usos populares no tratamento de doenças infecciosas.

Um aspecto importante no estudo das plantas medicinais é a determinação do peso seco dos extratos, já que através destes valores é possível a obtenção dos respectivos valores de CIM em mg/ml. Os valores, apresentados na Tabela 1, foram obtidos após evaporação do solvente ainda presente no respectivo extrato. Ainda nessa tabela são mostrados os valores do peso seco das plantas que foram obtidos após a secagem de um total de 10 gramas de material vegetal fresco coletado, em estufa por aproximadamente 48 horas, objetivando determinar a matéria seca presente nas plantas recém coletadas. De modo geral pode-se observar que ocorreu grande variação entre o peso seco dos extratos estudados, sendo o menor valor o da lixinha (folha) com 35 mg/ml e o maior o do barbatimão (casca) com o valor de 179,5 mg/ml. O mesmo não foi verificado quanto ao peso seco das plantas, houve uma pequena variação onde o menor valor foi encontrado na folha da lobeira com 2,61 g e o maior valor da quaresma-branca com 5,38 g. Podemos então classificar os valores de peso seco do menos concentrado para o mais concentrado, os teremos: Lixinha (folha) < Macela (flor) < Lixinha (fruto) < Lobeira (folha) < Negramina (folha) < Barbatimão (folha) < Quaresma-Branca (folha) < Barbatimão (casca).

Os resultados obtidos no ensaio realizado pela metodologia dos discos apresentados na Tabela 2 e Figura 2 mostram uma visão preliminar de uma possível ação antimicrobiana dos extratos testados. Nessa metodologia além dos extratos testados foi também utilizado um disco impregnado com Tetraciclina como controle. Neste primeiro ensaio verificou-se que para a linhagem de *S. aureus*, o maior halo de inibição foi verificado com o extrato de Barbatimão (folha) com 18,6 mm, e em ordem decrescente de tamanho de halo temos barbatimão (casca) com e 16,6 mm, a lixinha (folha) com 14,6 mm, a lobeira (folha) com de 14 mm, a lixinha (fruto) com 13 mm, a quaresma-branca com 11 mm, a negramina com 11 mm e o menor o extrato da macela (flor) com halo de 9,3 mm. Para a linhagem de *E. coli* verificou-se uma

maior eficiência no extrato de barbatimão (folha) que apresentou halo de inibição de 8,6 mm, seguido da lixinha (folha) com 7,33 mm e por fim barbatimão (casca) com 7,0 mm. Os demais extratos não apresentaram formação de halos de inibição. Para *P.aeruginosa*, o extrato com a maior halo de inibição foi o da negramina (13 mm) seguindo, em ordem decrescente : lixinha (fruto) e quaresma-branca (10,6 mm), barbatimão (folha) (9,6 mm), barbatimão (casca) (8,6 mm) e lixinha (folha) (8 mm). Ainda sobre esta linhagem, os extratos de lobeira e macela não formaram halo de inibição, e portanto, teoricamente não ativa sobre tal bactéria.

Na segunda etapa do estudo, ou seja, fase onde foi utilizada a metodologia da diluição dos extratos em BHI, o aspecto geral do estudo pode ser visualizado na Figura 3, após a adição da resazurina, indicando atividade microbiana quando na cor vermelha. Neste ensaio foram verificados alguns resultados bem interessantes quando se comparado ao ensaio anterior e os valores estabelecidos foram utilizados para verificação de faixa de valores de CIM, que posteriormente seriam utilizadas para a determinação de CIM, mostrados na Tabela 3.

Para a espécie *S. aureus* houve uma variação considerável para os valores de CIM frente aos extratos testados, sendo, porém verificado uma maior eficiência para o extrato de lixinha (folha) com um valor de CIM inferior a 1,75 mg/ml, portanto a menor concentração testada. O extrato menos eficiente foi da negramina, com o valor de 16,2 mg/ml.

Em relação a *E. coli*, para a maioria dos extratos não foi possível a definição de um valor exato para CIM já que o valor obtido ultrapassou ao máximo testado, dessa forma pode-se afirmar que os extratos que mostraram eficiência foi o barbatimão (folha) com valor de CIM de 9,9 mg/ml seguido da lobeira cujo valor de CIM é 14,1 mg/ml, já o menos eficiente foi da quaresma-branca que apresentou o valor de CIM maior que 31,2. Neste caso, o valor de CIM ultrapassou a maior concentração testada nos ensaios.

Para a linhagem de *P. aeruginosa* verificou-se que a maioria dos extratos mostrou eficiência, com exceção da lixinha (fruto), que não foi possível verificar o valor exato uma vez que o valor de CIM ultrapassou o testado no experimento, apesar de possuir um valor de CIM inferior aos outros extratos. O extrato de barbatimão (folha) mostrou-se mais eficiente com valor de valor de 9,9 mg/ml e o extrato menos eficiente foi o da quaresma-branca com CIM de 31,2 mg/ml. Até este

ponto do estudo, todos foram resultados preliminares que serviram para direcionar os ensaios principais utilizando a metodologia da diluição em meio de MHA e testes de sensibilidade para um número significativo de linhagens, sendo todas elas isoladas de casos clínicos humanos.

A partir dos ensaios preliminares foi possível verificar alguns resultados discrepantes comparando os dois métodos utilizados. Assim, consideramos importante destacar que a metodologia dos discos pode ser utilizada visando testar números elevados de plantas, servindo desta forma como um indicativo de ação antimicrobiana e necessitando desta forma que seja obtida a CIM, que normalmente é verificada através da metodologia da diluição. A título de exemplo, destacamos o caso do extrato de lobeira para *E. coli* que no teste do disco não houve formação de halo de inibição enquanto no teste da diluição em BHI, esta planta apresentou a segunda melhor eficiência para esta bactéria com valor de CIM de 14,1 mg/ml frente a *E. coli*.

Quanto a terceira etapa do estudo, foram realizados ensaios para obtenção dos valores de CIM pela diluição dos extratos em ágar (Tabelas 4, 5 e 6). Neste caso, a maior eficiência foi verificada para o extrato de lixinha (folha), apresentando um valor de CIM menor para todas as linhagens testadas, enquanto o extrato de negramina foi o que apresentou pior eficácia, ou seja, altos valores de CIM. De acordo com a análise estatística dos resultados é possível apresentar em ordem crescente de eficiência para *E. coli* temos: Lixinha (folha) > Barbatimão (folha) > Lixinha (fruto) = Barbatimão (casca) > Quaresma-branca > Macela = Lobeira > Negramina. Para *S. aureus*: Lixinha (folha) > Barbatimão (folha) > Quaresma-Branca > Macela > Lixinha (fruto) > Barbatimão (casca) > Lobeira > Negramina, e para *P. aeruginosa*: Lixinha (folha) > Barbatimão (casca) > Barbatimão (folha) > Lixinha (fruto) > Macela > Lobeira > Quaresma-Branca = Siparuna. Nestas comparações foram determinadas eficiências de acordo com análise estatística, porém consideramos necessária a comparação utilizando os valores absolutos e cálculos de CIM para 90% das linhagens, ou seja, obtendo assim a CIM90%. Estes valores são apresentados na Tabela 7. Segundo os valores absolutos, verifica-se uma maior sensibilidade das duas linhagens Gram negativas. Desta forma, consideramos importantes os resultados deste estudo, uma vez que em estudos relatados por muitos autores, a tendência é de uma sensibilidade maior para as bactérias Gram

positivas aos produtos naturais que as Gram negativas. Novamente percebe-se a melhor eficiência do extrato de lixinha folha frente às linhagens bacterianas testadas.

Assim, estabelecemos neste estudo que os testes de sensibilidade microbiana dos extratos vegetais requerem uma atenção maior quanto à padronização dos mesmos, porém percebe-se também que a obtenção dos valores de CIM representa talvez a forma mais confiável de testar produtos vegetais e que no caso dos testes utilizando discos impregnados com extratos ou outros derivados vegetais, devem ser utilizados com certa restrição e apenas na realização de ensaios bastante iniciais quando o pesquisador está iniciando estudos de ação antimicrobiana com alguma planta, ou plantas, em particular.

Como mencionado anteriormente, foi realizada a análise fitoquímica dos extratos das plantas testadas sendo possível verificar a variação considerável entre os extratos hidro-alcoólicos estudados, porém, os flavonóides foram estabelecidos em todos os extratos testados (Tabela 8). A literatura menciona que a composição química dos derivados vegetais pode variar devido aos vários aspectos edáficos climáticos como fatores desencadeantes para tais variações. Assim, os resultados obtidos têm a sua importância, inclusive como forma de justificar a ação antimicrobiana dos extratos testados, porém novos estudos deverão ser realizados com finalidade de também caracterizar quantitativamente tais produtos antimicrobianos. É importante ressaltar que a eficiência antimicrobiana de algumas plantas medicinais está relacionada a presença de alguns compostos químicos. No caso dos extratos analisados observamos a presença de alguns desses compostos que estão associados a inúmeras atividades biológicas como: os flavonóides possuem funções antioxidante, antiinflamatória e anticancerígena (Verdi *et. al.*,2005); as saponinas às atividades hemolítica, antiviral, antiinflamatória (Simões *et al.*,2004) e muitas delas são capazes de romper a membrana celular de microrganismos, o que pode justificar sua atividade contra fungos e bactérias (Taiz & Zeiger, 1991), os taninos aceleram o processo de cicatrização (Panizza, *et. al*, 1988); os compostos fenólicos tem propriedades anti-oxidantes, bactericida e cicatrizante em feridas cutâneas (Lopes *et. al.*, 2005), as cumarinas podem ser antioxidantes como os flavonóides, pois são capazes de quelar íons de ferro e evitar peroxidação lipídica (Martin-Arargon *et. al.*, 1996); já os alcalóides apresentam atividades antiinflamatória, antiviral e antimalárica (Barbosa *et. al.* 2006); estudos

mostram que as quinonas possuem propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores (Milton *et. al.*, 2003).

Tabela 1. Valores de peso seco de partes vegetais e do extrato bruto obtidos.

Plantas	PESO SECO – PLANTA (g)	PESO SECO – EXTRATO (mg/ml)
Barbatimão (casca)	3,68	179,5
Barbatimão (folha)	5,17	99,7
Lixinha (folha)	3,22	35,0
Lixinha (fruto)	3,47	43,0
Lobeira (folha)	2,61	47,32
Macela (flor)	3,25	40,0
Negramina (folha)	4,25	81,0
Quaresma-Branca (folha)	5,38	104,0

Tabela 2. Valores obtidos nos testes de sensibilidade utilizando metodologia da difusão a partir dos discos impregnados com extratos das plantas (halos de inibição em mm)

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Lixinha (folha)	14,6	7,3	8,0
Lixinha (fruto)	13,0	0,0	10,6
Barbatimão (casca)	16,6	7,0	8,6
Barbatimão (folha)	18,6	8,6	9,6
Lobeira	14,0	0,0	0,0
Macela (flor)	9,3	0,0	0,0
Quaresma-Branca (folha)	11,0	0,0	10,6
Negramina (folha)	10,3	0,0	13,0
Tetracilina (droga controle)	26,6	21,3	11,3



Figura 2. Aspecto geral dos ensaios para a verificação da ação antibacteriana, segundo metodologia da difusão com discos de papel, para uma linhagem de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 3. Valores obtidos nos testes de sensibilidade utilizando a metodologia da diluição dos extratos em BHI e determinação dos valores da CIM (mg/ml).

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Lixinha (folha)	<1,7	>10,5	10,5
Lixinha (fruto)	4,3	>12,9	>12,9
Barbatimão (casca)	<8,9	>53,7	17,9
Barbatimão (folha)	<4,9	9,9	9,9
Lobeira	9,4	14,1	11,8
Macela (flor)	4,0	>12,0	10,0
Quaresma-Branca (folha)	<5,2	>31,2	31,2
Negramina (folha)	16,2	>24,3	20,3



Figura 3. Aspecto geral para ensaios de sensibilidade utilizando metodologia da diluição em BHI com aplicação de resazurina como revelador para três linhagens bacterianas e frente a quatro extratos testados. Poços em vermelho com crescimento, e escura sem crescimento

Tabela 4. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/ml, obtidos pela diluição em agar em ensaio para cada uma das linhagens de *Escherichia coli* (Ec) testadas

Linhagens dos Microorganismos	Barbatimão (casca)	Barbatimão (folha)	Lixinha (folha)	Lixinha (fruto)	Lobeira (folha)	Macela (flor)	Quaresma-Branca (folha)	Negramina (folha)
Ec 1	14,32	3,96	2,8	5,16	16,45	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 2	3,58	3,96	2,8	6,45	16,45	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 3	5,37	1,98	2,1	3,44	14,1	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 4	7,16	3,96	2,8	8,6	16,45	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 5	7,16	3,96	2,8	8,6	16,45	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 6	3,58	3,96	2,8	5,16	16,45	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 7	7,16	3,96	2,8	5,16	18,8	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 8	7,16	3,96	2,8	5,16	18,8	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 9	3,58	3,96	2,1	5,16	18,8	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 10	3,58	3,96	2,8	5,16	18,8	> 16	> 12,48	> 32,4
Ec 11	7,16	3,96	2,8	8,6	7,05	> 16	> 12,48	> 32,4

* o símbolo ">" mostra que não foi possível a verificação do real valor, já que esse ultrapassou a concentração máxima testada.

Tabela 5. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/ml, obtidos pela diluição em ágar em ensaio para cada uma das linhagens *Staphylococcus aureus* (Sa) testadas

Linhagens dos Microorganismos	Barbatimão (casca)	Barbatimão (folha)	Lixinha (folha)	Lixinha (fruto)	Lobeira (folha)	Macela (folha)	Quaresma-Branca (folha)	Negramina (folha)
Sa 1	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 2	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 3	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 4	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 5	1,79	0,99	0,35	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 6	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 7	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 8	1,79	0,99	0,35	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 9	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15
Sa 10	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	1,6	1,04	12,15

* o símbolo ">" mostra que não foi possível a verificação do real valor, já que esse ultrapassou a concentração máxima testada.

Tabela 6. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/ml, obtidos pela diluição em agar em ensaio para cada uma das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) testada.

Linhagens dos Microrganismo	Barbatimão (casca)	Barbatimão (folha)	Lixinha (folha)	Lixinha (fruto)	Lobeira (folha)	Macela (folha)	Quaresma-Branca (folha)	Negramina
Pa 1	1,79	1,96	1,4	3,44	7,05	6	> 12,48	6,2
Pa 2	1,79	1,96	1,4	3,44	7,05	4,8	> 12,48	12,15
Pa 3	1,79	1,96	1,4	3,44	7,05	10	> 12,48	24,3
Pa 4	1,79	1,96	2,1	3,44	7,05	10	> 12,48	24,3
Pa 5	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	2,4	> 12,48	12,15
Pa 6	1,79	0,99	0,7	1,72	7,05	2,4	> 12,48	12,15
Pa 7	1,79	0,99	1,4	2,58	7,05	2,8	> 12,48	16,2
Pa 8	3,58	1,96	1,4	3,44	7,05	4,8	> 12,48	12,15
Pa 9	1,79	0,99	1,4	2,58	7,05	4,8	> 12,48	12,15
Pa 10	1,79	1,96	1,4	3,44	7,05	10	> 12,48	32,4
Pa 11	14,32	3,96	4,2	10,75	9,4	10	> 12,48	> 32,4

* o símbolo “>” mostra que não foi possível a verificação do real valor, já que esse ultrapassou a concentração máxima testada.

Tabela 7. Valores de CIM 90% frente aos ensaios sobre as linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Lixinha (folha)	2,71	0,65	2,03
Lixinha (fruto)	7,81	1,72	3,42
Barbatimão (casca)	7,12	1,79	3,4
Barbatimão (folha)	3,06	0,99	1,94
Lobeira (folha)	18,15	7,05	7,05
Macela (flor)	> 16,0	1,6	8,9
Quaresma-branca (folha)	> 12,48	1,04	> 12,48
Negramina (folha)	>32,4	12.15	27,95

* o símbolo “>” mostra que não foi possível a verificação do real valor, já que esse ultrapassou a concentração máxima testada.

Tabela 8. Aspectos gerais sobre a caracterização fitoquímica dos extratos vegetais estudados.

	Compostos Fenólicos	Flavonóides	Saponinas	Triterpenos e Esteróides livres	Taninos	Quinonas	Cumarinas	Alcalóides
Barbatimão (casca)	+	+	+	-	+	-	-	-
Barbatimão (folha)	-	+	+	Triterpeno	+	+	+	-
Lixinha (fruto)	+	+	+	-	+	-	-	-
Lixinha (folha)	+	+	+	Esteróides	+	+	-	-
Macela	+	+	-	Triterpeno	-	-	-	-
Quaresma-branca	-	+	+	Esteróide	+	-	+	-
Lobeira	+	+	-	Triterpeno	-	-	+	-
Negramina	+	+	-	Esteróide	-	-	-	+

* os símbolos representam presença (+) e ausência (-) do composto químico.

4. Conclusões

De acordo com os ensaios realizados verificaram-se alguns resultados discrepantes comparando os dois métodos utilizados. Desta maneira consideramos importante destacar que a metodologia dos discos é utilizada visando testar números elevados de plantas, servindo desta forma como estudo preliminar. É preciso destacar a importância da determinação dos valores de peso seco dos extratos vegetais usados para determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

A partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) verificou-se que o extrato que apresentou maior eficiência frente às linhagens bacterianas estudadas é a lixinha (folha).

Com relação a análise fitoquímica dos extratos, embora seja uma análise qualitativa, foi possível verificar uma ampla variação nos resultados obtidos frente as plantas testadas, o que vem reforçar o já estabelecido na literatura que as propriedades biológicas das plantas, e neste caso a ação antimicrobiana, deve-se a variação na composição química do derivado vegetal, tornando assim fundamentais os ensaios que avaliam a composição química das plantas estudadas.

Portanto, a variação da ação antimicrobiana entre os diferentes extratos deve-se a quantidade/concentração de metabólito existente na planta e não somente a presença do mesmo.

5. Referências Bibliográficas

- Almeida, E. R. Plantas medicinais Brasileiras: conhecimentos populares e científicos. ed. Hemus Ltda, São Paulo, p.341, 1993.
- Almeida , S.P.; Proença, C.E.B.; Sano, S.M.; Ribeiro, J.F. *Cerrado: espécies vegetais úteis*. EMBRAPA: Planatina, 1998.
- Antoun, M.K.; Gerena, L.; Milhous, W.K. Screening of the flora of Porto Rico for potential antimalarial bioactives. *Intern. J. Pharmacog.*, 4:255-258, 1993.
- Arantes, V. P.; Sato, D. N.; Vilegas, W.; Santos, L. C. Plantas do cerrado brasileiro *Mycobacterium fortuitum*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 26, n.3, p. 125-128, 2005.
- Asolini, F. C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T.; Ferraz, C.; Alencar, S. M. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Brazilian Journal o Food Technology*, v.9, n.3, p. 209-215, jul./set. 2006.
- Barbosa-Filho, J.M., Piuvezam, M.R., Moura, M.D., Silva, M.S., Lima, K.V.B., Cunha, E.V.L., Fachine, I.M., Takemura, O.S . Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. *Rev Bras Farmacogn* 16: 109-139, 2006.
- 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, n.4, p.387-390, 2006.
- Castro, L.O.; Chemale, V.M. Manual de identificação e cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Porto Alegre, Instituto de Pesquisas Agronômicas, p.78, 1995.

- Carmona, P.F.; Guarim Neto, G. As plantas medicinais, suas formas de uso e aplicabilidade fitoterápica: o saber tradicional. In *Uso da biodiversidade: Flora medicinal de cerrado do leste mato-grossense; uma abordagem etnobotânica. Relatório técnico*. UFMT, 2001.
- Castelani, D.C; Casali, V.W.D; Souza, A.L.; Cecon, P.R.; Cardoso, C.A; Marques, V.B. Produção de óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 8, n. 4, p. 62-65, Botucatu, 2006.
- Celotto, A. C.; Nazario, D. Z.; Spessoto, M. A.; Martins, C. H. G.; Cunha, W. R. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 4, p. 339-3340, São Paulo, Oct./Dec. 2003.
- De Souza, K.C.B.; Schapoval, E. E. S.; Bassani, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, p. 771–777, 2002.
- Di Stasi, L.C. Conceitos básicos na pesquisa de plantas medicinais. In: Di Stasi, L.C. *Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: UNESP, p. 23-27, 1996.
- Duarte, M.C.T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. *MultiCiência: construindo a História dos produtos naturais*, v.7, 2006.
- Felfili, J. M.; Silva Junior, M. C.; Dias, B. J.; Rezende, A. V. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, vol.22, n.1, São Paulo, 1999.
- Felfili, J.M.; Silva-Jr, M.C.; Rezende, A.V.; Machado, J.W.B.; Walter, B.M.T.; Silva P. & Hay, J.D.. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação

- arbórea do cerrado *sensu stricto* na Chapada Pratinha, DF, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 6: 27-46, 1992.
- Falkenberg, M. B; Santos, R. I; Simões, C. M. Introdução à Análise Fitoquímica. In: Simões, C. et al. *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*, 3ª ed.: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, p. 165, 2001.
- Fontenelle, M.G.L.C. Plantas medicinais utilizadas por raizeiros: uma abordagem etnobotânica no conteúdo da saúde e da doença. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. p, 141, 1997.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P.. Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites. *Química Nova*. 30, 374-381, 2007.
- Guarim Neto, G.; Morais, G.R. Recursos Medicinais de Espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um Estudo Bibliográfico. *Acta Botânica Brasilica* v.17(4), p. 561-584, 2003.
- Güntner, C.; Gonzales, A.; Reis, R.; Gonzalez, G.; Vazquez, A.; Ferreira, A.; Moyna, P.. Effect of *Solanum* glycoalkaloids on potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Journal of Chemical Ecology*, 23: 1651-1659, 1997.
- Hasrat, J.A.; De Backer, J.P.; Valquelin, G.; Vlietinck, A.J. Medicinal plants in suriname: screening of plants extracts for receptobinding activity. *Phytomedicine*, 4:56-65, 1997.
- Herzog-Soares, J. D.; Alves R. K.; Isac, E.; Bezerra, J. C. B.; Gomes, M.H.; Santos, S. C. ; Ferri, P. H.. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p. 1-2., 2002.
- Konemam, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, W.C. *Diagnostico microbiológico: Texto e atlas colorido*. Medsi, 5ª Ed., 2001, 1461 p.
- Li, X. C.; Jacob, M.R.; Pasco, D.S.; Elsohly, H.N.; Ninrod, A.C.; Walker, L.A.; Clark, A.M. *Phenolic compounds from Miconia myriantha inhibiting Candida Aspartic proteases*. *Journal Natural Products*, 64:1282-1285, 2001.

- Loguercio, A. P., Battistin A., Vargas A. C., Henzel A., Witt N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.2, mar-abr, 2005.
- Lombardi, J.A. & Motta Jr., J.C. Seed dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) by the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* Illiger (Mammalia, Canidae). *Ciência e Cultura*, 45: 126-127. 1993
- Lopes, C.M.L.; Placeres, M.C.P; Jordão Junior, C.M.; Higuchi, C.T.; Rinaldo, D.; Vilegas, W.; Leite, C.Q.F.; Carlos, I.Z. Immunological and microbiological activity of *Davvila elliptica* St. Hill (Dilleniaceae) against *Mycobacterium tuberculosis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 6, 2007.
- Lopes, G.C.; Sanches, A.C.C.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Hernandez, L. & Mello, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. And *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 99:265–272, 2005.
- Lorenzi H., Matos F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p.512, 2002.
- Macedo, M.; Ferreira, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.14, p. 40-44, 2004.
- Machado, R.B.; Ramos Neto; M.B, Pereira; P., Caldas; E., Gonçalves; D., Santos; N., Tabor, K., Steininger, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Conservation International do Brasil, Brasília. 2004;
- Maroni, B.C.; Di Stasi, L.C.; Machado, S.R. *Plantas Medicinais em remanescente de Cerrado da região de Botucatu*, São Paulo. 2004.
- Martín-Aragón, S.; BENEDÍ, J. & VILLAR, A. Oxygen active species-scavenger properties of coumarins. *Phytotherapy Research* 10: S75-S78, 1996.

- Matos, F.J.A., Introdução à fitoquímica experimental, 1 ed., Edições UFC, 126p., 1988.
- Mendonça, R.C.; Felfili, J.M.; Walter, B.M.T.; Silva Júnior, M.C. da; Rezende, A.V.; Filgueiras, T.S. & Nogueira, P.E. Flora Vascular do Cerrado In: Sano, S.M. & Almeida. *Cerrado: ambiente e flora*. EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p. 289 – 556, SP, 1998.
- Michelin, D. C.; Iha, S. M.; Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; Santos L.C.; W. Vilegas W.; Salgado, H. R. N. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(3), p. 209-211, Jul/Set, 2005.
- Silva, M. N., Ferreira, V. F., Souza, M.C.B.V. *Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na b-lapachona e derivados*. Química Nova, vol.26, no.3, São Paulo, 2003.
- Motidome, M.; Leekning, M.E. & Gottlieb, O.R.. A química das Solanaceas brasileiras I. A presença de solamargina e de solasodina no juá e na lobeira. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 42: 375-376, 1970.
- Mota, F.M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. - Asteraceae - ("macela", "marcela") como fator de proteção em zoonoses. *Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008*.
- Nunes, G. P.; Silva, M. F.; Resende, U. M.; Siqueira, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 13: 83-92, 2003.
- Oliveira, A. L. S; Figueiredo, A. D. L. Prospecção Fitoquímica das Folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, supl. 2, p. 384-386, Porto Alegre, jul. 2007.

- Orlando, S.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão) [dissertação]. Franca (SP): Universidade de Franca; 2005.
- Panizza, S.; Rocha, A.B.; Gecchi, R.; Souza, E. & Silva, R.A.P. *Stryphnodendron barbadetiman* (vellozo) martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, p. 10:101-106, 1988.
- Polydoro, M.; K. de Souza, C. B.; Andrades, M. E.; Da Silva, E. G.; Bonatto, F.; Heydrich, J.; Dal-Pizzol, F.; Schapoval, E. E. S.; Bassani, V. L.; Moreira, J. C. F.. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences*, v.74, p.2815–2826, 2004.
- Renner, S.S; Hausner, G. Monograph of Siparunaceae. *Flora Neotropica*, v. 95, p. 1-256, 2005.
- Ribeiro, J. F.; Walter, B. M. T.. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: S. M. Sano & S. P. Almeida (eds.). *Cerrado: ambiente e flora*. Embrapa Cerrados, Planaltina, p. 87-166, 1998.
- Rodrigues V.E.G., Carvalho D.A. *Plantas medicinais no domínio dos cerrados*. Lavras/MG: UFLA. 2001.
- Santos, S.C.; Costa, W.F.; Batista, F.; Santos, L.R.; Ferri, P.H.; Ferreira, H.D.; Seraphin J.C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 552-556, 2006.
- Schelz, Z.; Molnar, J.; Hohmann, J. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, v. 77, p. 279-285, 2006.
- Simões, C. M.; Schenkel, E. P.; Bauer, L.; Langeloh, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC. Compositae. *Journal of Ethnopharmacology* 22(3): 281-293, 1988.

- SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia da planta ao medicamento. Editora da Universidade-UFRGS. 5 ed., p. 1102, 2004.
- Soares M.L.; Rezende M.H.; Ferreira H.D.; Figueiredo A.D.L.; Bustamante K.G.L.; Bara M.T.F.; Paula J.R. Caracterização farmacognóstica de folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15(4), p. 352-360 Out/Dez, 2005.
- Souza, L.F. de. Levantamento etnobotânico na localidade de São Gonçalo, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. Monografia de Graduação. Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, p. 41, 2001.
- Taiz, L. & Zeiger, E. *Surface protection and secondary metabolites defense compounds*. In: Taiz, L. & E. Zeiger (eds.). *Plant Physiology*. Califórnia: Cummins company, p.318-345, 1991.
- Vargas, A.C.; Loguercio, A.P.; Witt, N.M.; Costa, M.M.; Silva, M.S; Viana, L.R. Atividades microbiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural*, Sta. Maria, v.34, n.1, p. 159-163, jan-fev 2004.
- Verdi, L.G.; Brighente, I.M.C. & Pizzolatti, M.G. Gênero *Baccharis* (asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, 28(1): 85-94, 2005
- Ushimaru, P.I., Silva, M.T.N., Di Stasi, L. C., Barbosa, L., Fernandes Junior, A. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.38, p.717-719, 2007.
- Zoghbi, M. das G.B; Andrade, E.H.A; Santos, A.S.; Silva, M.H. Essential oils of *Siparuna guianensis* Aubl. *Journal of Essential Oil Reserach* ,n. 10, p. 543-546, 1998.

6. Anexos

Ilustração das plantas testadas no estudo



Davilla elliptica (lixinha)



Solanum lycocarpum (lobeira)



Siparuna guianensis (negramina)



Achyrocline satureioides (macela)



Miconia rubiginosa (quaresma-branca)

Preparo dos extratos



Preparo do filtrado da planta



Processo de evaporação do solvente em rota vapor