

Natália Mathias Soares

**Determinação da atividade antimicrobiana dos
extrativos das folhas/galhos, pericarpo e
sementes da *Crotalaria pallida* (Leguminosae)**



Araraquara

2012

Natália Mathias Soares

**Determinação da atividade antimicrobiana dos
extrativos das folhas/galhos, pericarpo e
sementes da *Crotalaria pallida* (Leguminosae)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau
de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Taís Maria Bauab

Co-Orientador: Leonardo Gorla Nogueira

Araraquara - SP

2012

**Este Trabalho foi desenvolvido no Laboratório de
Fisiologia dos Micro-organismos no Departamento
de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”-UNESP Araraquara-SP.**

Dedicatória

*Aos meus familiares, amigos, professores da FCFAR
e funcionários da FCFAR, por fazerem parte da
minha vida pessoal e profissional e por sempre me
motivarem a seguir meu caminho, somando
escorregões para obter resultados.*

Obrigada!!!

“ Nunca se deve engatinhar, quando o impulso é voar! ”

Hellen Keller

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à minha família que além de serem meu exemplo são as pessoas propulsoras de todas as minhas vitórias, por sempre estarem ao meu lado independente de estarem perto ou longe. Amo vocês!!

À Prof^a. Dr^a Taís Maria Bauab por sua dedicação, carinho e atenção comigo, que ao longo destes anos me ensinou um pouco da grandiosidade do mundo científico e a importância em priorizar valores muito maiores que os profissionais, como família, religião e amizades. Obrigada pelo incentivo de sempre!!!

Ao Leonardo Gorla Nogueira por me ensinar a “pescar” no mundo científico, por sempre me apoiar e estar presente nas minhas decisões profissionais e por sempre, de bom humor, corrigir meus muitos erros. Sem você meu TCC não teria acontecido!!Obrigada.

À Maria do Socorro, por sem me conhecer, confiar em mim os extrativos vegetais deste trabalho, onde trabalhou com tanta dedicação e por me oferecer uma gama de literaturas importantes para a conclusão desta pesquisa. Obrigada!!

À Michelli Carvalho e Mariana Rozatto, que em muitos momentos, me ofereceram palavras de carinho, amizade e “muitaaaaaa” ajuda nos experimentos!!Serão grande professoras e amigas, para sempre!!Obrigada!

Às técnicas dos Laboratórios de Microbiologia e Imunologia, Marisa, Néia e Val, por sempre me receberem com uma palavra amiga e muito conhecimento prático. Vocês fizeram toda a diferença no meu aprendizado. Obrigada!!!

Agradeço aos funcionários da Biblioteca da FCFAR por me ajudarem com a parte de “Referências Bibliográficas” deste trabalho.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, por me oferecer uma graduação de excelência que além de me ensinar diversos valores profissionais e pessoais, abriu diversas portas no mercado de trabalho, por conta de seu elevado conceito.

Agradeço ao Mateus Scontri, pela amizade e por toda a ajuda com a finalização deste trabalho. Obrigada amigo querido!!

Agradeço por fim e não menos importante, meu grande e querido amigo, João Pedro Fachin, por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me oferecendo a amizade mais pura e verdadeira. Agradeço também, por me ajudar com este trabalho e por sempre estar presente na minha vida. OBRIGADA “LOLINHO”!!!

"E sem saber que era impossível foi lá e fez"

Jean Cocteau

Dedico esta frase a todos os pesquisadores, principalmente aos da área da saúde, pelo empenho em acharem as respostas que apenas alguns entendem e dão credibilidade e fazer disto a cura para muitas doenças.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1. Extrativos Vegetais.....	16
3.1.1 Espectro de absorção dos extrativos vegetais.....	17
3.1.2 Preparo das soluções dos extrativos	17
3.2 Cepas Microbianas	17
3.2.1 Cepas Bacterianas	17
3.2.2 Cepa Fúngica	17
3.2.3 Estocagem e Manutenção das Cepas	17
3.2.4 Preparo das Suspensões Microbianas	18
3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	18
3.3.1 Realização do Teste	18
3.3.2 Leitura Espectrofotométrica	19
3.3.3 Leitura com Revelador	19
3.4 Esquema representativo do teste em microplaca	20
3.4.1 Teste de Microdiluição com Bactérias.....	20
3.4.2. Teste de Microdiluição com Levedura.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	22
4.2 Leitura com Resazurina e TTC.....	23
4.3 Leitura Espectrofotométrica da atividade antimicrobiana.....	24

5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

RESUMO

O estudo de novas alternativas terapêuticas no tratamento de infecções microbianas tornou-se crescente no cenário científico devido à grande variação genética desses micro-organismos, que resultou na resistência aos antimicrobianos existentes. A grande diversidade na flora brasileira e a ampla utilização das plantas como medicamentos pela população justificam os estudos e o crescente interesse pela descoberta de novos compostos bioativos isolados dos vegetais. Plantas usualmente utilizadas na agricultura, apenas como adubação verde, por exemplo, são atualmente alvo de estudos científicos com potenciais promissores de atuação como de produtos terapêuticos. Plantas da família Leguminosae, amplamente conhecidas e utilizadas como fornecedoras de nitrogênio ao solo, vem sendo estudadas por diversas áreas da saúde para comprovarem a ação de compostos isolados entre estes os alcalóides pirrolidizínicos como antiinflamatórios, antibióticos e até como veneno para pragas. O objetivo do presente estudo foi determinar, a partir de extrativos de *Crotalaria pallida*, a atividade antimicrobiana *in vitro* utilizando cepas padrões de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e da levedura *Candida albicans*. Para determinação dessa atividade foi utilizada a técnica de diluição em microplaca que possibilitou o estudo da atividade do extrativo vegetal e da concentração inibitória mínima, isto é, concentração bactericida e/ou bacteriostática mínima e concentração fungistática e/ou fungicida mínima. A *Crotalaria pallida*, não apresentou atividade frente aos micro-organismos testados nas condições padronizadas neste estudo.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento de infecções é tão antiga quanto a civilização humana e por longo período de tempo minerais, produtos animais e vegetais foram as principais fontes de substâncias bioativas (RATES, 2001).

As plantas medicinais são utilizadas como fonte medicamentosa mesmo em países industrializados, onde grande parte dos produtos farmacêuticos sintetizados e comercializados provém de produtos naturais (ELIZABETSKY, 1991).

Da mesma forma os medicamentos fitoterápicos são amplamente utilizados (ANVISA, 2004) e caracterizados pela eficiência comprovada bem como pelos riscos que envolvem seu uso (WHO, 2009).

A vantagem no uso de plantas na medicina popular está no fato destas serem uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo homem (SIMÕES et al, 2004).

A grande diversidade encontrada no Brasil justifica a utilização e o crescimento significativo na utilização de produtos de origem vegetal como potenciais fitoterápicos (YUNES e VALDIR, 1998; CALIXTO, 2003) ainda que essa utilização venha resultar em efeitos indesejados relacionados principalmente à automedicação (ANVISA, 2004; WHO, 2009).

Decorrente da significativa utilização de plantas e/ou seus produtos no Brasil, é crescente o interesse e o avanço científico em estudos com estas como opções terapêuticas para diferentes patologias (ELLOF, 2000; FLORES e MIOTTO, 2005).

Inegavelmente as plantas são fonte com a mais ampla diversidade em moléculas com diferentes estruturas e propriedades fisiológicas e físico-químicas, produtos de biotransformação de macromoléculas como os ácidos nucleicos,

proteínas, lipídeos e carboidratos os quais resultam em vantagens para a sobrevivência e manutenção da espécie (SIMÕES et al, 2004).

A ocorrência ou mesmo a concentração de metabólitos secundários em uma planta é influenciada por vários fatores ambientais como sazonalidade, umidade, temperatura, altitude entre outros (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Tornou-se, portanto, imprescindível conhecer a constituição química das plantas de uso popular bem como subsequentemente o conhecimento do potencial biológico desses constituintes.

Em atendimento a essa necessidade, o Ministério da Saúde divulgou uma extensa lista de plantas medicinais que poderão ser utilizadas como medicamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Foram selecionadas plantas com potencial ação contra diabetes, hipertensão, úlceras, artrites, inflamações entre outras doenças crônicas.

Essa é uma lista que serve para orientar estudos e pesquisas, com objetivo de gerar produtos que possam ser agregados no âmbito do Sistema de Saúde (LISTA DE PLANTAS MEDICINAIS DO SUS).

Neste sentido, um grupo de pesquisadores constituídos por botânicos, químicos, farmacêuticos e biólogos propuseram o projeto temático intitulado “Fitoterápicos padronizados para o tratamento de doenças crônicas”, coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas.

Esse projeto envolve o estudo de plantas incluídas na lista proposta pelo SUS com atividade em doenças crônicas com enfoque especial às utilizadas no combate a doenças no trato gastrointestinal.

No que se refere a determinação e elucidação do potencial biológico dos constituintes da planta é importante ressaltar o conhecimento científico da atividade antimicrobiana das mesmas.

A atividade antimicrobiana é uma etapa importante nos estudos da atividade biológica de produtos naturais face ao surgimento crescente de micro-organismos resistentes.

Várias técnicas são utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*. Dentre estas a microdiluição que possibilita a utilização de volumes reduzidos na determinação da concentração inibitória mínima são de grande valia quando se trata de produtos naturais que normalmente são isolados em pequenas quantidades (COWAN, 1999; GIBBONS e DURR, 2004; LANGFIELD et al, 2004; OSTROSKY et al, 2008; ALVES et al, 2008). Essas técnicas permitem ainda avaliar diferentes extrativos e de mais de uma substância teste, em diversas concentrações, bem como diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio.

O gênero *Crotalaria* sp, pertence à Família Fabaceae ou Leguminosae.

São plantas herbáceas com cerca de 50 cm de altura ou com arbustos até 3 m, possuem folhas digitado-triofoliadas, unifolioladas ou simples, flores predominantemente amarelas, androceu formando um tubo monadelfo aberto na base com anteras dimorfas e legumes inflados (FLORES e MIOTTO, 2005).

As principais aplicações agrícolas de espécies do gênero *Crotalaria* são como fontes de nitrogênio pela fixação biológica através da adubação verde, agente biológico no controle de nematóides, cobertura do solo para controle da erosão, produção de celulose, fibras têxteis, ornamentação e alimentação animal (URATANI et al, 2004; BIONDO et al, 2005).

Possuem como substância majoritária a monocrotalina (alcalóide-um nitrogênio em um anel heterocíclico), que contém características como: caráter básico, sabor amargo, fisiologicamente e farmacologicamente ativo, pois funcionam como uma defesa química das plantas contra herbívoros (HONÓRIO JÚNIOR, et al, 2010).

A espécie *Crotalaria pallida* é encontrada comumente em zonas tropicais e subtropicais sendo numerosas na África, Índia, México e Brasil (HONÓRIO JUNIOR, et al, 2010).

Com facilidade encontramos esta espécie em plantações de grãos e em pastagens, bem como em áreas próximas de rios, morros litorâneos, restingas, orla de matas, campos e cerrados (FLORES, 2004).

No Brasil, são conhecidas como: “xique-xique”, “guizo de cascavél”, “chocalho de cascavél” e possuem vagens secas que quando tocadas se assemelham ao som emitido pela cauda da cascavél (BOGHOSSIAN et al, 2007) .

Dados da literatura sobre atividades farmacológicas do *Crotalaria pallida* são bastante restritos, mas extensa revisão bibliográfica sobre seu uso popular, mostra que no Camboja, as flores são usadas como um vegetal. Na Indo-China, uma espécie de café é preparado a partir de sementes torradas. No Vietnã, as raízes são às vezes mastigadas com nozes de betel. Na medicina tradicional, *Crotalaria pallida* é utilizada para tratar problemas urinários. A cataplasma das raízes é aplicada a um inchaço doloroso das articulações, e um extrato das folhas é tido como vermífugo. No Laos a planta é usada para reduzir a febre (PROTA4U, 2010).

As plantas da *C. pallida* são ricas em alcalóides pirrolizidínicos (principais toxinas que frequentemente acometem humanos e outros animais), possuem

atividade tóxica em diversas escalas como: atividade depressora do SNC (na dose de 50 mg e 100 mg) em camundongos, hepatotoxicidade, efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, teratogênicos e carcinogênicos (NOBRE et al, 2004; HONÓRIO JÚNIOR., et al, 2010). Também existem relatos de atividades antiinflamatórias exercida exatamente pela casca da *Crotalaria pallida* (AHMED, et al, 2006).

Estudos revelam que as espécies do gênero possuem conexão com mitocôndrias celulares que frequentemente estão sendo consideradas um importante alvo de xenobióticos, que podem causar injúria celular, via depleção do ATP (WALLACE e STARKOV, 2000). Em decorrência de sua múltipla ação e possível potencial terapêutico, a *Crotalaria pallida* tem, atualmente, despertado o interesse de pesquisadores ligados à rede da saúde. Deste modo, o potencial biológico do vegetal devem ser muito bem caracterizado e descrito (ARAUJO, 2011).

Isto demonstra a relevância deste estudo na caracterização de extrativos desta espécie vegetal bem como o extenso número de doenças infecciosas que acometem o homem, podendo ser utilizadas no controle destes males.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo determinar o potencial antimicrobiano de extrativos etanólicos de folhas/galhos, sementes e pericarpo da *Crotalaria pallida* com a determinação da atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e da levedura *Candida albicans*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Extrativos Vegetais:

Foram utilizados os extrativos etanólicos (70%) de folhas/galhos, sementes e pericarpo da *Crotalaria pallida* obtidos pela doutoranda Maria do Socorro Fernandes Melo, da equipe do Prof. Dr. Wagner Vilegas do Instituto de Química-UNESP, Araraquara.

Os extrativos vegetais foram obtidos por meio da separação das partes da planta, secagem e moagem de acordo com padrões farmacopêicos e extração por percolação (Farmacopéia, 2010). As partes do vegetal foram secas em estufa a 40°C por 48 horas e reduzidos ao estado de pó, por meio de moagem, em moinho de faca.

As folhas (1000g), pericarpo (200g) e sementes (100g) foram extraídos em separado, umedecidos com etanol 70% e deixados em repouso por 2 horas, em recipientes fechados, ao abrigo da luz. Esse material terminou acomodado em percolador e submetido ao processo de lixiviação com etanol 70%, até o esgotamento total da droga. Removeu-se o etanol com auxílio de evaporador rotativo.

Os extrativos do pericarpo e folhas foram liofilizados obtendo-se um rendimento de 10 % para cada extrato. O extrativo de sementes não foi liofilizado por apresentar substâncias lipídicas apresentando assim um rendimento aparente de 20%.

O estudo fitoquímico e de atividade biológica dessa planta é parte do projeto BIOTA/FAPESP instituído “Fitoterápicos padronizados para tratamento de doenças crônicas” (Proc. nº 09/52237-9).

3.1.1 Espectro de absorção dos extrativos vegetais

Os extrativos vegetais foram adequadamente dissolvidos e submetidos à leitura em espectrofotômetro (abs), num intervalo de 400 a 655nm, para a determinação do comprimento de onda de absorção dos mesmos.

As análises permitiram avaliar o melhor comprimento de onda para ser utilizado nos ensaios de atividade antimicrobiana, fora da faixa de absorção do extrato ou fazendo as correções dessas leituras.

3.1.2 Preparo das soluções dos extrativos

Os extrativos foram dissolvidos à concentração de 2000µg/mL em solventes adequados como solução-estoque para o início dos experimentos. No caso dos extrativos de Folhas/Galhos e Pericarpo os solventes e suas porções utilizadas para diluição foram de 20% de DMSO e 80% de água. Já no caso do extrativo de Sementes, o solvente utilizado foi 100% de água.

3.2 Cepas microbianas

3.2.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas as cepas padrões: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Echerichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella setubal* ATCC 19196.

3.2.2 Cepa fúngica

Foi utilizada a cepa padrão de *Candida albicans* ATCC 64548.

3.2.3 Estocagem e manutenção das cepas

As cepas bacterianas foram mantidas em caldo Muller-Hinton acrescido de 20% de glicerol e mantido a – 20°C. Para uso, as cepas foram repicadas em caldo Muller-Hinton (2 mL), incubados, por 24h a 37°C.

A levedura foi mantida em caldo Sabouraud acrescido de 20% de glicerol e mantido a - 20°C. Para o uso, foi replicada em 2 mL de caldo Sabouraud e incubado a 37°C por 48h.

3.2.4 Preparo das suspensões microbianas

As suspensões bacterianas foram padronizadas adicionando-se uma cultura de 24 horas, em tampão fosfato (PBS) estéril até atingir uma turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL).

Sequencialmente essa suspensão foi lida em espectrofotômetro com valor de absorbância de 0,10 a 0,15 a 620nm para confirmação da concentração.

Desta suspensão foi efetuada uma diluição 1/10 em tampão PBS estéril, que correspondeu a 10^7 UFC/mL.

As culturas de 48h de levedura foram transferidas para PBS estéril e ajustadas até escala 0,5 de McFarland (10^6 UFC/mL). Foi confirmada a concentração por leitura espectrofotométrica a 620nm com leitura de abs entre 0,8 a 0,10. Desta suspensão foi efetuada uma diluição 1/100 em tampão PBS estéril, que correspondeu a 10^3 UFC/mL.

3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

3.3.1 Realização do teste

A concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica de diluição em microplacas com 96 poços de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do CLSI (2006), para as bactérias aeróbicas e a norma M27-A3 CLSI (2008) para as leveduras, com modificações. Os orifícios das microplacas foram

preenchidos com 100 μ L de caldo de Mueller-Hinton ou RPMI-1640 (tamponado com MOPs + glicose) para as bactérias e a levedura, respectivamente.

Em seguida foram acrescentados 100 μ L das soluções dos extrativos vegetais e foi realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 μ g/mL, em coluna. Adicionalmente foram distribuídos 100 μ L das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas.

Como controle positivo foram utilizados a ampicilina (concentração de 1250 μ g/mL) para as bactérias e anfotericina B (concentração de 32 μ g/mL) para a levedura.

Também foram realizados controle do meio de cultura, controle de crescimento bacteriano, controle dos extrativos vegetais e controle negativo (solventes).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24h para as bactérias e 37°C por 48h para a levedura.

Em cada microplaca foram testados 2 extrativos vegetais e o teste realizado em triplicata.

3.3.2 Leitura espectrofotométrica

Após incubação, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm (leitor de microplacas) a partir dos quais foram confeccionados os gráficos expressando as leituras de absorção.

3.3.3 Leitura com revelador

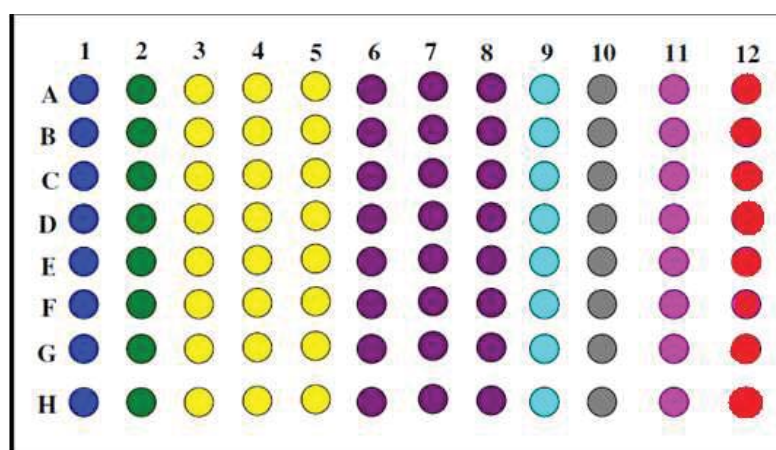
Foram realizadas leituras das microplacas de bactérias com o revelador resazurina (0,0001g/mL) do qual 15 μ L foi adicionada em cada orifício das microplacas. Com incubação de até 2 horas a presença de cor azul representou

ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (GABRIELSON et al, 2002)

Às microplacas contendo levedura foram adicionadas 20µL de solução aquosa de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC). Após incubação a 35°C por 3 horas, a coloração vermelha representou crescimento do micro-organismo e não alteração de cor, a ausência de crescimento (DUARTE et al., 2005)

3.4 Esquema representativo do teste em microplaca

3.4.1. Teste de microdiluição com bactérias



Coluna 1: meio de cultura (Müller Hinton – 80 µL) + bactéria (Sa., Ec., ou Sal. -20 µL)- teste de saturação ou não do meio de cultura com a porção de bactérias.

Coluna 2: meio de cultura (Müller Hinton – 80 µL) + bactéria (Sa., Ec., ou Sal. -20 µL) + ampicilina (100µL)- Controle Positivo (Concentração da ampicilina = 1250 µg/mL)

Coluna 3, 4 e 5: meio de cultura (Müller Hinton – 80 µL) + substância teste A (Folhas/Galhos, Pericarpo ou Sementes - 100µL) + bactéria (Sa., Ec., ou Sal. -20 µL).

Colunas 6,7 e 8: meio de cultura (Müller Hinton – 80 µL) + substância teste B (Folhas/Galhos, Pericarpo ou Sementes - 100µL) + bactéria (Sa., Ec., ou Sal. -20 µL).

Coluna 9: meio de cultura (Müller Hinton – 80 µL) + bactéria (Sa., Ec., ou Sal. -20 µL) + sistema de solventes (Controle Negativo- 20%DMSO + 80% água OU 100% água)

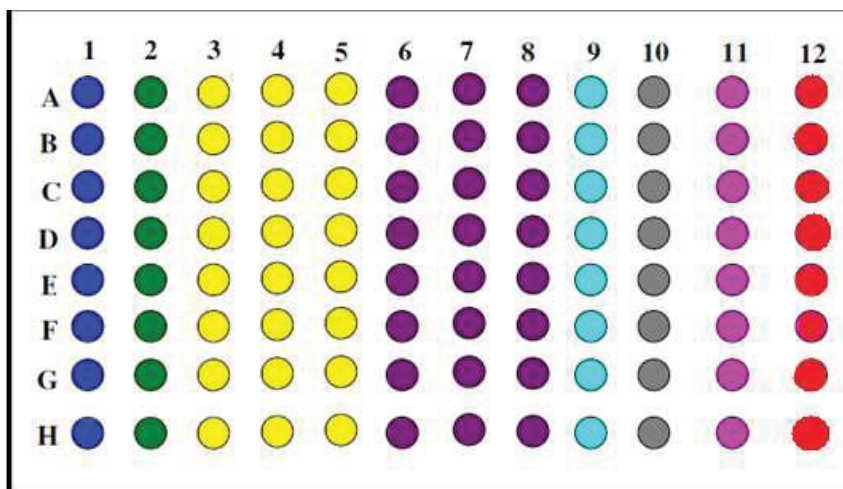
Coluna 10: meio de cultura (Müller Hinton – 80 µL) + substância teste A (Folhas/Galhos, Pericarpo ou Sementes - 100µL).- teste de esterilidade da substância A.

Coluna 11: meio de cultura (Müller Hinton – 80 µL) + substância teste B (Folhas/Galhos, Pericarpo ou Sementes - 100µL). – teste de esterilidade da substância B.

Coluna 12: meio de cultura (Müller Hinton- 80µL) – teste de esterilidade do meio.

Figura1- Esquema do Teste de Diluição em Microplacas para Bactérias

3.4.2 Testes de Microdiluição com Levedura



Coluna 1: meio de cultura (RPMI - 100µL) + levedura (100 µL) - teste de saturação ou não do meio de cultura com a porção de *Candida*.

Coluna 2: meio de cultura (RPMI - 100µL) + levedura (100 µL) + anfotericina B (100 µL)

Coluna 3, 4 e 5: meio de cultura (RPMI - 100µL) + levedura (100 µL) + folhas e galhos (100 µl) ou sementes (100 µl).

Colunas 6: meio de cultura (RPMI - 100µL) + levedura (100 µL) + pericarpo (100 µL) OU Para sementes: meio de cultura (RPMI - 100µL) + levedura (100 µL) + Sistema Solventes (100% de água – Controle Negativo)

Coluna 7: meio de cultura (RPMI - 100µL) + levedura (100 µL) + pericarpo (100 µL) OU Para sementes: meio de cultura (RPMI - 100 µL) + sementes (100 µL)- teste de esterilidade da substância.

Coluna 8: meio de cultura (RPMI - 100µL) + levedura (100 µL) + pericarpo (100 µL) OU Para sementes: meio de cultura (RPMI - 100 µL).

Coluna 9: meio de cultura (RPMI - 100µL) + levedura (100 µL) + Sistema Solventes (20% DMSO + 80% de água – Controle Negativo)

Coluna 10: meio de cultura (RPMI - 100 µL) + folhas e galhos (100 µL)- teste de esterilidade da substância.

Coluna 11: meio de cultura (RPMI - 100 µL) + pericarpo (100 µL) – teste de esterilidade da substância.

Coluna 12: meio de cultura (RPMI - 100 µL) – teste de esterilidade do meio.

Figura 2- Esquema do Teste de Diluição em Microplacas para *Candida albicans*

4. RESULTADOS

4.1 Concentração Inibitória Mínima(CIM)

Amostra Vegetal (µg/ mL)	Bactérias			Fungo
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>Candida albicans</i>
Folhas/Galhos	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000
Pericarpo	>1000	> 1000	> 1000	> 1000
Sementes	>1000	> 1000	> 1000	>1000

Tabela 1- Determinação da CIM das amostras de *C. pallida* frente aos diferentes micro-organismos.

Os extrativos etanólicos de folhas/galhos, pericarpo e sementes de *C. pallida* não apresentaram atividade frente aos micro-organismos testados, nas concentrações utilizadas nos ensaios.

As figuras 3 e 4, a seguir, representam os resultados obtidos no teste de microdiluição revelados com resazurina e TTC respectivamente.

4.2 Leitura com resazurina e TTC

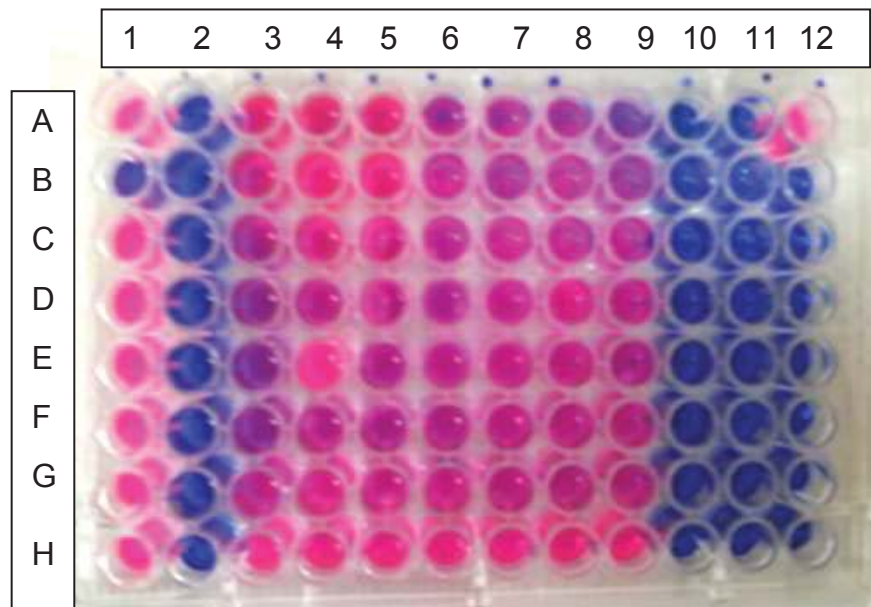


Figura 3- Teste da atividade de extrativos de folhas/galhos, pericarpo e sementes frente a *E. coli*, *S. setubal* e *S. aureus* revelados com resazurina .

Fonte: Fotografado por Natália Mathias Soares em 2010.

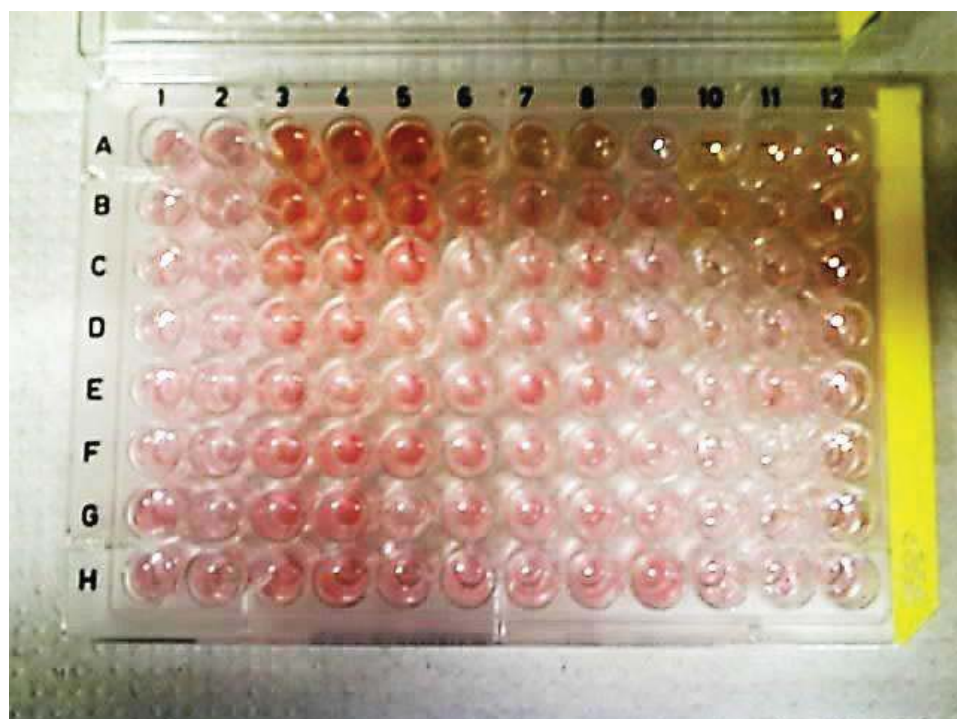
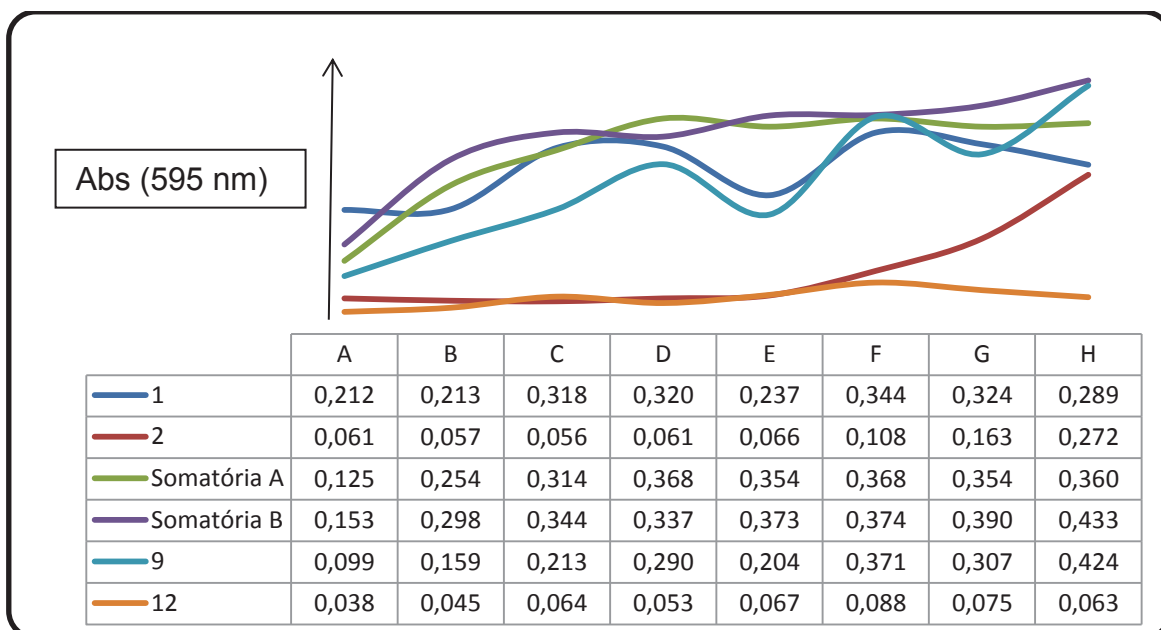


Figura 4- Teste da atividade de extrativos de folhas/galhos, pericarpo e sementes frente a *Candida albicans* revelado com TTC.

Fonte: Fotografado por Natália Mathias Soares em 2010.

4.3 Leitura espectrofotométrica da atividade antimicrobiana



De acordo com a figura 1 deste trabalho:

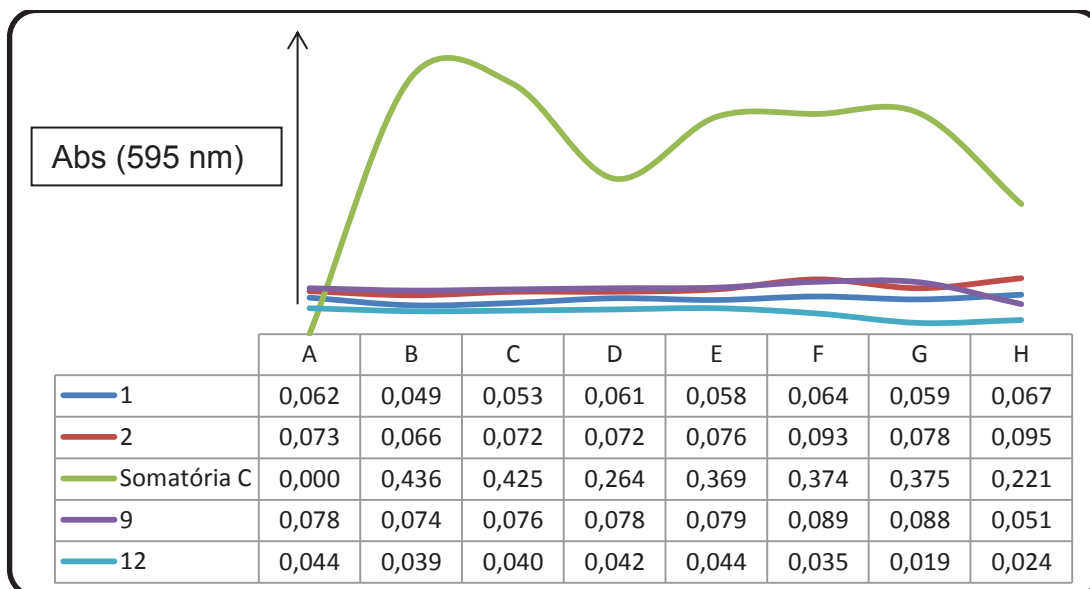
1,2,9 e 12= Colunas da microplaca

A até H= Linhas da microplaca

Somatória A = Média aritmética da triplicata dos 3 testes de Folhas /Galhos nas colunas 3, 4 e 5.

Somatória B = Média aritmética da triplicata dos 3 testes de Pericarpo, nas colunas 6,7 e 8.

Figura 5- Atividade dos extrativos de Folhas/ Galhos e Pericarpo frente a *E. coli*, *Salmonela sp* e *S. aureus* demonstrada com leitura espectrofotométrica.



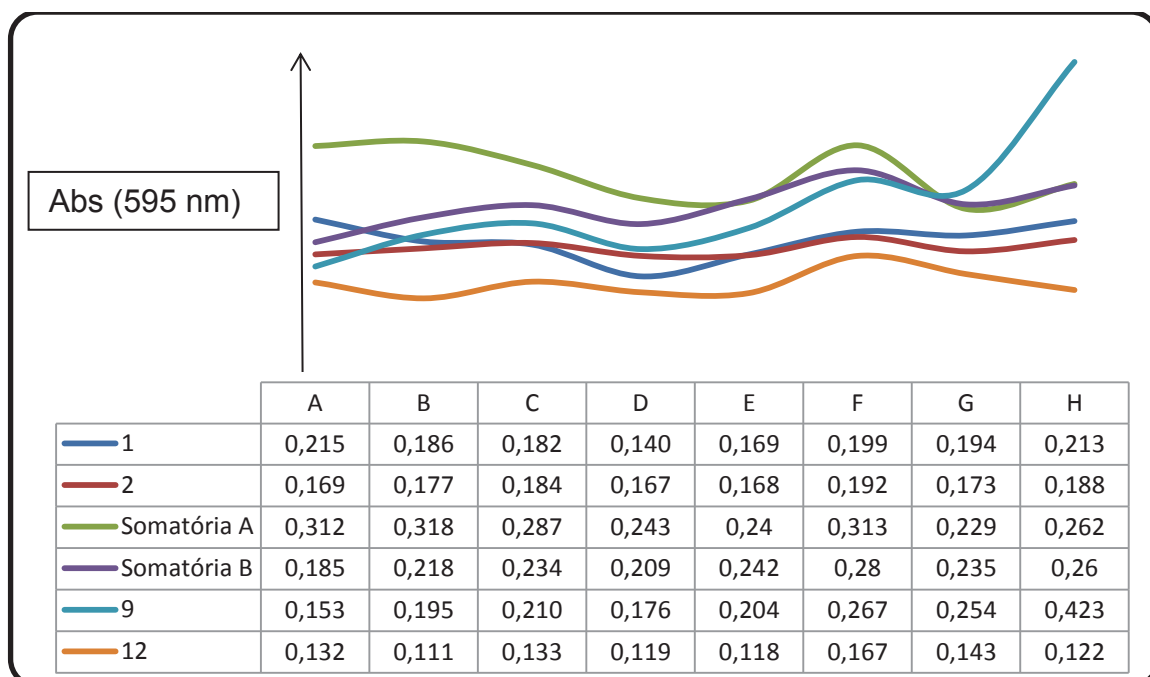
De acordo com a figura 1 deste trabalho:

1,2,9 e 12= Colunas da microplaca

A até H= Linhas da microplaca

Somatória C = Média aritmética da triplicata dos 3 testes de Sementes nas colunas 3,4 e 5.

Figura 6- Atividade do extrativo de Sementes frente a *E. coli*, *Salmonela sp* e *S. aureus* demonstrada com leitura espectrofotométrica.



De acordo com a figura 2 deste trabalho:

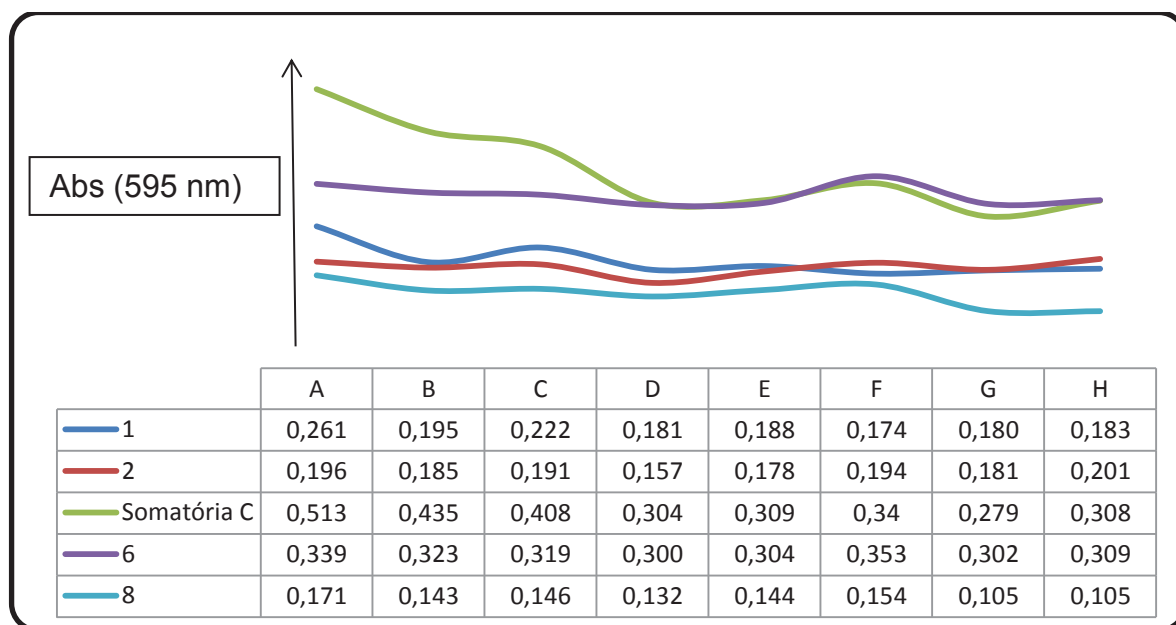
1,2,9 e 12= Colunas da microplaca

A até H= Linhas da microplaca

Somatória A = Média aritmética da triplicata dos 3 testes de Folhas /Galhos nas colunas 3, 4 e 5.

Somatória B = Média aritmética da triplicata dos 3 testes de Pericarpo, nas colunas 6,7 e 8.

Figura 7- Atividade dos extrativos de Folhas/ Galhos e Pericarpo frente a *Candida albicans* demonstrada com leitura espectrofotométrica.



De acordo com a figura 2 deste trabalho:

1,2,9 e 12= Colunas da microplaca

A até H= Linhas da microplaca

Somatória C = Média aritmética da triplicata dos 3 testes de Sementes nas colunas 3,4 e 5.

Figura 8- Atividade do extrativo de Sementes frente a *Candida albicans* demonstrada com leitura espectrofotométrica

5. DISCUSSÃO

No último século, a pesquisa pelo descobrimento de substâncias potencialmente antimicrobianas e seguras, para lidar com infecções bacterianas severas, revolucionou o tratamento de diversas doenças. Entretanto, este aumento das pesquisas foi acompanhado pelo crescimento da diversidade dos micro-organismos e, com auxílio do uso indiscriminado dos antibióticos que culminou na auto-seletividade desses micro-organismos, apresentando resistência aos antibióticos amplamente utilizados. Como uma tentativa de contornar tal situação e ampliar o arsenal de compostos ativos o estudo de plantas tornou-se crescente no cenário científico. (MICHELIN et al., 2005; LEITÃO et al., 2006; LIMA et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2007; SAÚDE-GUIMARÃES e FARIA, 2007; ARAÚJO, 2011).

Ainda assim, poucos são os estudos embasados e que comprovam cientificamente o emprego de novas drogas extraídas de plantas, pois, apenas cerca de 17 % foram efetivamente testadas e estudadas quanto ao seu potencial farmacológico.(LORENZI e MATOS, 2002; MONTOURO et al, 2005; VEIGA JUNIOR et al, 2005; MORAES, 2006).

É comum o pensamento de que as plantas medicinais de uso tradicional já foram testadas, levando assim, ao uso inadequado e abusivo para a cura de males, principalmente pela população de baixa renda que acredita na auto-sugestão e na esperança de cura, crenças estas que podem aliviar sintomas e induzir o paciente a desconsiderar sinais importantes, retardando o atendimento médico, levando as patologias graves, com consequências às vezes irremediáveis. O estudo destas plantas e sua aplicabilidade para fins terapêuticos é de fundamental importância,

principalmente para que se estabeleçam diferenças entre os benefícios e que não passam simplesmente de crenças.(SILVA et al., 2010)

É de extrema importância, portanto, o conhecimento das estruturas e das propriedades físico-químicas e biológicas destas fontes naturais (BRESOLIN e CECHINEL, 2010) e a demonstração de propriedades biológicas de extrativos, frações e compostos isolados destas fontes, dentre estas a atividade antimicrobiana (DUARTE et al, 2005; MARTINI et al, 2009; ALBERNAZ et al, 2010; HOLFLING et al, 2010; CUSHINE e LAMB, 2011; ROZZA et al, 2011; ARAÚJO et al, 2012; LORENZON et al, 2012)

As bactérias utilizadas no estudo estão presentes no nosso dia-a-dia e são causadoras de muitas patologias, se em crescimento exacerbado, desta maneira, se faz necessário um estudo de novas alternativas para o combate microbiológico de patologias frequentes que acometem a população.

Diversos fatores são considerados para que haja uma infecção por *Candida albicans* , alguns definidos e outros não, mas entre eles, podemos citar secreção de proteases, fosfolipases, e a possibilidade de alteração da morfologia de células leveduriformes de brotamento, hifas ou filamentos (LOW et al., 2008). A *C. albicans*, quando encontrada na pele e mucosas é leveduriforme, não invasiva, porém, ao se transformar em hifas, torna-se invasiva (OSAWARA et al., 2007). Atualmente, muitos são os fármacos antifúngicos disponíveis, como polienos (anfotericina B e nistatina) e azólicos (fluconazol e itraconazol). Estudos recentes indicaram que a *C. albicans* se tornou mais resistente aos azóis nos últimos anos e estes medicamentos vêm trazendo altos riscos de hepatotoxicidade. (KAUFFMAN e CARVER, 1997; FANOS e CATALDI, 2000; SANGULARD e ODDS, 2002). A fim de solucionar este problema,

estudos que envolvam potencial de novas substâncias antifúngicas, se tornam interessantes.

O gênero *Crotalaria sp* pertence a família Leguminosae, com cerca de 650 gêneros e mais de 18000 espécies, representando uma das maiores famílias de Angiospermas e também uma das principais do ponto de vista econômico. No Brasil ocorrem cerca de 175 gêneros e 1500 espécies (SOUZA e LORENZI, 2008). Além disso há um grande interesse na composição química de espécies do gênero *Crotalaria sp*, pois este gênero produz alcalóides pirrolizidínicos e alguns flavonóides (FLORES, 2004). Estes alcalóides podem atuar como antimicrobianos e em alguns insetos estimulam a ovo posição (CAMPO et al, 2005).

Dados da literatura sobre atividades farmacológicas de *Crotalaria pallida* são bastante restritos, mas encontra-se como uso na medicina popular atividade contra infecções urinárias ou como “emplasto” para articulações com ação antiinflamatória. No Laos a planta é usada para reduzir a febre (PROTA4U, 2010). Brito e colaboradores (2012), demonstraram o potencial anti-ulcerativo da *C. pallida*.

Muitos são os métodos que podem ser usados para avaliar a atividade antimicrobiana de uma substância, como por exemplo: método de difusão em Agar, de macrodiluição e de microdiluição. O método de microdiluição apresenta vantagens como: economia de substâncias em teste e de materiais, que para produtos naturais, esta economia é especialmente interessante, pois as substâncias extraídas de vegetais são em pequena quantidade (ELLOF, 1998; COWAN, 1999). Outra vantagem é que para determinar a CIM (Concentração Inibitória Mínima) de extrativos ativos de plantas, tem-se utilizado este método por ser mais sensível, quando comparado com os outros dois. A sensibilidade e quantidade mínima dos

reagentes, possibilitam um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados (SILVA et al; 2010).

Desta forma, o método de diluição em microplacas é barato, reprodutível, e é trinta vezes mais sensível que outros métodos utilizados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra, pode ser usado para grande número de amostras (OSTROSKY et al., 2008).

Os resultados obtidos neste estudo não demonstraram atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *C. pallida* testados.

É sabido que vários fatores ambientais, como tipo de solo, sazonalidade, clima entre outros, podem interferir no tipo e quantidade de metabólitos produzidos pela planta (BRECHO et al, 2009; SILVA JR. et al, 2009) os quais consequentemente irão influenciar a composição dos extrativos vegetais.

Adicionalmente, os resultados de atividade antimicrobiana podem ser alterados dependendo do método de extração utilizado para a obtenção dos extratos e/ou substâncias isoladas (HORNER et al, 2008; HOLFING et al, 2010). DAS e colaboradores (2010) demonstraram a importância do solvente utilizado no processo extrativo como, a polaridade, baixa toxicidade, ação conservante entre outros.

Nossos resultados podem ainda ser justificados pela possibilidade de , em função do processo de extração, ter havido atividade antagônica entre as substâncias extraídas bem como no extrato a(s) possível(eis) substância(s) bioativa(s) estarem em pequenas quantidades (diluídas).

Neste sentido é interessante a continuidade de estudos com esta espécie vegetal, isolando compostos ou fração para comprovarem ou não nossos resultados uma vez que são contraditórios aos dados da literatura (PROTA4U, 2010) que

mostram a utilização da *C. pallida* na medicação popular, no controle de algumas infecções e inflamações apresentando assim potencial antimicrobiano e antifúngico.

6. CONCLUSÃO

Os resultados dos testes revelaram que os extrativos etanólicos de folhas/galhos, pericarpo e sementes de *Crotalaria pallida* não foram eficazes como bactericidas ou bacteriostáticos, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella setubal* e também não foram eficazes como fungicida ou fungistático frente a *Candida albicans*, nas concentrações de 1000 a 7,8µg/mL.

O presente estudo se fez importante, pois impulsiona às pesquisas com outras cepas microbianas, outros métodos de extração e/ou novas formas de aplicação, para determinar a possibilidade ou não de utilização desta espécie vegetal como antimicrobiano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, B; ALHOWIRINY, TA; MOSSA, JS. Crotalic and emarginellic acids: Two triterpenes from *Crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid. **Phytochemistry**, v. 67, p. 956-64, 2006.

ALBERNAZ, LC; DE PAULA, JE; ROMERO, GAS; SILVA, MRR; GRELLIER, P; MAMBU, L; ESPINDOLA, LS. Investigation of plants extracts in tradicional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts, **Journal of Ethnopharmacology**., v.131, n.1, p. 116-21, 2010.

ANVISA-AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resoluções nº 48, 2004. Dispõe sobre registro de medicamentos fitoterápicos conforme anexo I. Diário Oficial da União.

ALVES, EG; VINHOLIS, HC; CASEMIRO, LA; FURTADO, NAJC; SILVA, MLA; CUNHA, WB; MARTINS, CHG. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, p. 1224-29, 2008.

ARAUJO, MGF; HILARIO, F; NOGUEIRA LG; VILEGAS W; SANTOS LC; BAUAB TM. Chemical Constituents of the Methanolic Extract of Leaves of *Leiothrix spiralis*. *Ruhland and Their Antimicrobial Activity*. **Molecules**.v. 16, p. 10479-90, 2011.

ARAUJO, MGF; HILÁRIO,F; VILEGAS,W; SANTOS,LC; BRUNETTI,IL; SOTOMAYOR,CE; BAUAB,TM. Correlation smong antioxidant, antimicrobial, hemalytec, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. **Int. J. Mol. Sci**, v.13, p.9260-77, 2012.

BARBOSA-FILHO JM; NASCIMENTO-JÚNIOR FA; TOMAZ ACA; ATHAYDE-FILHO PF; SILVA MS; CUNHA EVL; SOUZA MFV; BATISTA LM; DINIZ MFFM. Natural products with antileprotic activity. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 141 - 48, 2007.

BIONDO, E; MIOTTO, STS; SCHIFINO-WITTMANN, MT. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae - Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal** v.15, p.241-48, n.3, 2005.

BOGHOSSIAN, MR; PEIXOTO, PV; BRITO, MF; TOKARNIA, CH. Aspectos clínico-patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de *Crotalaria mucronata* (Fabaceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.27, n.4, p.149-156, 2007.

BRECHO, JRM; MACHADO, H; GUERRA, MO. Rutina-estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.1, n.1, p. 21-5, 2009.

BRESOLIN, TMB; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar, São Paulo: Santos, p. 416, 2010.

BRITO, ARMS. Determinação da Atividade Antiulcerogênica da *Crotalaria pallida* Aiden (Fabaceae). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)-Instituto de Biologia/Fapesp. 2012. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/136517/determinacao-atividade-antiulcerogenica-crotalaria-pallida/>. Acessado em: 7 de Agosto de 2012.

CAMPO, ML del; SMEDLEY, SR; EISNER, T. Reproductive benefits derives from defensive plant alkaloid possession in the arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*). **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of América, Nova Iorque**, v. 102, p. 13508-12, 2005.

CALIXTO, JB. Artigo: Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, vol. 55, 2003.

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

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

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

CUSHNIE, TPT; LAMB, AJ. Recent advanced in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **Intern. J. Antimic. Agents**, v.238, p.99-107, 2011.

DAS, K; TIWARI, RKS; SHRIVASTAVA, DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **J. Med. Plants Res.**, v.4, n.2, p.104-11, 2010.

DUARTE, MCT; FIGUEIRA, GM; SATORATTO, A; REHDER, VLG; DELARMELINA, G. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**,v. 97, p. 305-11, 2005.

ELIZABETSKY, E. Sociopolitical economical and ethical issues in medical plant research. **J. Ethnopharmacol.**,v.32, p.235-9, 1991.

ELLOF, JA. A Sensitive an quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. *Planta Medica*, v.64, n.8, p.711-13, 1998.

ELLOF, JNA. Proposal on expressing the bacterial activity of plants extracts – asmall first step in applying scientific knowledge to rural primary health care. **S. Afr. J. Sci.**, p.116 -18, 2000.

FANOS, V; CATALDI, L. Amphotericin B-Induced nephrotoxicity: a review. **J of Chemotherapy**, v.12, p463-70, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ed. Brasília: Fiocruz, v.1, p. 236-53, 2010.

FLORES, AS; MIOTTO, STS. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.19, n.245-249, São Paulo, 2005. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062005000200006 - back1#back1](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062005000200006-back1#back1)

FLORES, AS. Taxonomia, números cromossômicos e química de espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae–Papilionoideae) no Brasil. DPhil thesis, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

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

GIBBONS, WJ; DURR, EH. COX as 1953.An outbreak of cirrhosis of the liver in horses. **N Am Vet** 34: 556-58, 2004.

GOBBO-NETO, L; LOPES, NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**,v.30, p.374-81, 2007.

HÖFLING, JF; ANIBAL, PC; OBANDO-PEREDA, GA; PEIXOTO, IAT; FURLETTI, VF; FOGLIO, MA; GONÇALVES RB. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Braz. J. Biol.**, v.70, n.4, 2010.

HÖRNER, M; GIGLIO, VF; SANTOS, AJRWA; WESTPHALEN, AB; INGLESIAS, BA; MARTINS, PR; AMARAL, CH; MICHELOT, TM; REETZ, LGB; BERTONCHELI, CM; PARAGINSKI, GL; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana **Rev.Bras.Farmac.**v. 44, p. 441-9 n.3, 2008.

HONÓRIO JÚNIOR, JER; SOARES. PM; MELO, CL; ARRUDA FILHO, ACV; SENA FILHO, JG; BARBOSAFILHO, JM; SOUSA, FCF; FONTELES, MGRQF; LEAL, LKA; QUEIROZ, MGR; VASCONCÊLOS, SMM. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia, Brazilian**. V. 20(3): p. 453-58, 2010.

KAUFFMAN, CA; CARVER, PL. Antifungal agents in the 1990s: Current status and future developments. **Drugs**, v.53, p. 539-49, 1997.

LANGFIELD, RD; SCARANO, FJ; HEITZMAN, ME; KONDO M; HMMAND, GB; NETO CC. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruviam medicinal plant *P. Galioides*, **J. Ethnopharmacol.**,v. 94, 279-81, 2004.

LEITÃO, SG; CASTRO, O; FONSECA, EM; JULIÃO, LS; TAVARES, ES; LEO, RRT; VIEIRA, RC; OLIVEIRA, DR; LEITÃO, GG; MARTINO, V; SULSEN, V; BARBOSA, YAG; PINHEIRO, DPG; SILVA, PEA; TEIXEIRA, DF; LOURENÇO, MCS. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 16, p. 6 - 11, 2006.

LIMA, IO; OLIVEIRA, RAG; LIMA, EO; FARIAS, NMP; SOUZA, EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 197 - 201, 2006.

LISTA DE PLANTAS MEDICINAIS DO SUS. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS_2010.pdf>. Acessado em 12/08/2012.

LOW, CF; CHONG, PP; YONG, PVC; LIM, CSY; AHMAD, ZOF. Inibition of hyphae formation and SIR2 expression in *Candida albicans* treated with fresh *Allium sativum* (garlic) extract. **J. App. Microbiol.**, v.105, p.2169-177, 2008.

LORENZI, H; MATOS, FJA. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**, 1.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002., 512p.

LORENZON, EM; CESPEDES, GF; VICENTE, GF; NOGUEIRA, LG; BAUAB, TM; CASTRO, MS; CILLI, EM. Effects of dimerization in the structure and biological activity of the antimicrobial peptide Ctx-Há. **Antimicrob. Agents Chemother.** Published online, 2012.

MARTINI, S; ADDARIO, C; COLACEVICH, A; FOCARDI, S; BORGHINI, F; SANTUCCI, A; FIGURA, N; ROSSI, C. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **Int .J. Antim. Agents**, v.34, n.1, p.50-59, 2009.

MICHELIN, DC; MORESCHI, PE; LIMA, AC; NASCIMENTO, GGF; PAGANELLI, MO; CHAUD, MV. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 316–20, 2005.

MONTOURO, P; SANNOMIYA, M; PIACENTE S; PIZZA, C; BRITO, ARMS; VILEGAS, W. Application of liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Comm. Mass Spectrometry**, v19, n.16, p.2244-250, 2005.

MORAES, HP. **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonima* spp e *Alchornea* spp**: estudo comparativo entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas. 2006. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

NOBRE, VMT; RIET-CORREA,F; DANTAS, AFM; TABOSA, IM; MEDEIROS, RMT; BARBOSA FILHO, JM. Intoxication by *Crotalaria retusa* in ruminants and equidae

in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. Cap. 41. In: **Poisonous plants and related toxins**. Edited by: Acamovic T., Stewart C. S. and Pennycott T. W. Ed. Glasgow: CABInternational. p. 275-279., 2004.

OSAWARA, A; KOMAKI, N; AKAI, H; WATANABE, H; WATANABE, T; MIKAMI, T; MATSUMOTO, T. Hyphal formation of *Candida albicans* is inhibited by salivary mucin. **Biol and Pharmac. Bulletin**, v.30, p.284-86,2007.

OSTROSKY, EA; MIZUMOTO, MK; LIMA, MEL; KANEKO, TM; SUZANA, O; NISHIKAWA, SO; FREITAS, BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Braz. J. Pharmacog.**, v.18, p.301-7, 2008.

PACIFIC ISLAND ECOSYSTEMS AT RISK (PIER). *Crotalaria pallida* Aiton. Disponível em:<http://www.hear.org/pier/species/crotalaria_pallida.htm>. Acesso em: 05 de Maio de 2011.

PROTA4U: Plant Resources of Tropical Africa. [Database on the Internet]. Kenya (Africa): PROTA, 2010. Disponível em: <<http://www.prota4u.org/>>. Acesso em: 9 Maio 2011.

RATES, SMK. Plants as source of drugs. **Toxicon**,v. 39, p.603-13, 2001.

ROZZA, AL; MORAES, TM; KUSHIMA, H; TANIMOTO, A; MARQUES, MOM; BAUAB, TM; HIRUMA-LIMA, CA; PELLIZZON, CH. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limone and β -

pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E₂. **Chemical Biol. Int.**, v.189, p. 82-9, 2011.

SAÚDE-GUIMARÃES DA; FARIA AR. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 455 - 65, 2007.

SANGLARD, D; ODDS, FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agent: molecular mechanisms and clinical consequences. **Inf. Disease**, v2, p 73-85, 2002.

SILVA, NLA; MIRANDA, FAA; CONCEIÇÃO, GM. Triagem Fitoquímica de Plantas do Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, Vol. 6, N.º2., 2010.

SILVA JUNIOR, IE; CECHINEL FILHO, V; ZACCHINO, AS; LIMA, JCS; MARTINS, DTO. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Braz J Pharmacog**, v.19, n.1b, p. 242-48, 2009.

SIMÕES, CMO; SCKENKEL, EP; GOSMANN, G; MELLO, JCP; MENTZ, LA; PETROVICK, PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Florianópolis; Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed UFSC, 2004.

SOUZA, VC; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. Ed. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008.

URATANI, A; HIROYUKI, D.; MASAMICHI, O; JIRO, H; YUICHIRO, N; HIDEKI, O. Ecophysiological Traits of Field-Grown *Crotalaria incana* and *C. pallida* as Green Manure". **Plant Prod. Science**, v. 7, p.449-55, 2004.

WALLACE, KB, STARKOV, AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** . v. 40, p. 353-88,2000.

WHO.**World Health Organization** 2009. Health topics: Infections diseases.

VEIGA JUNIOR, VF; PINTO, AC; MACIEL, MAM. Plantas medicinais: cura segura?.**Química Nova**, v.28,n.3,p519-28, 2005.

YUNES, RA; VALDIR FILHO, C. Estratégias para obtenção de de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21(1), p.98-105, 1998.