



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Câmpus de Araraquara

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*
DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE
*Arrabidaea brachypoda***

MARIANA RODRIGUES ROZATTO

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara – SP

2012



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Câmpus de Araraquara

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*
DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS DE
*Arrabidaea brachypoda***

MARIANA RODRIGUES ROZATTO

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

Orientadora: Profa. Dra. Taís Maria Bauab

Araraquara – SP

2012

Ficha Catalográfica

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

Rozatto, Mariana Rodrigues

R893d Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda* / Mariana Rodrigues Rozatto. – Araraquara, 2012
100 f.

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

Orientador: Taís Maria Bauab

1. *Arrabidaea brachypoda*. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Checkerboard. 4. Microdiluição. 5. Time-Kill. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

"A possibilidade de realizarmos um sonho é o
que torna a vida interessante."

Paulo Coelho

Dedico esse trabalho aos meus pais, Valter e Ieda Rozatto e ao meu namorado Carlos A. Marques Jr.. Vocês são a razão da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por tudo que tem me concedido.

Aos meus pais, Valter e Ieda, por sempre estarem ao meu lado, me encorajando e me dando força acima de tudo.

Em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Taís M. Bauab, por acreditar na minha capacidade, pela paciência e dedicação constante, principalmente nos momentos difíceis e por todo o conhecimento transmitido.

Aos meus companheiros de laboratório, Michele Carvalho, Leonardo Nogueira, Bruna Bonifácio e Kamila Negri, agradeço pela amizade, companheirismo e pela ajuda de todos vocês tanto nas práticas laboratoriais como na execução da minha dissertação.

Aos meus amigos que conheci ao longo da minha caminhada na UNESP, Natália Mathias, Elaine Andrigo, Josyane Claudino, Mariana Santoro, Leandro Leo, Flávia Resende, Lívia Espanha, Mariana Galeane, Débora Trevisan, Marília Frangiotti, Andrea Monte, Victor Legramandi (Super), Juhan Scardelato, Marcella Gabrielle, Fátima Rodrigues, Juliana Assumpção, Vânia Ortega, Tahisa Pedroso, Silvio Pereira, Jaqueline Perez e Marcelo Gonzaga, agradeço pelos momentos divertidos que passamos juntos sejam eles em disciplinas, congressos, laboratórios ou mesmo em barzinhos.

Às técnicas Marisa, Néia, Nathália, Sílvia e à Margarete, secretária do Departamento de Ciências Biológicas, por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos meus amigos Andressa Figueiredo, Lucas Chierentin, Isabely Vaz e Lígia Casula, pela amizade que se iniciou durante a graduação e se estende até agora.

Agradeço em especial à Lígia que esteve presente em todos os momentos, sempre me ouvindo e com palavras de conforto.

Aos meus amigos e professores do UNIFEB, que lembro com muita saudade os momentos especiais que passamos durante a graduação, em especial à Profa. Patrícia Rodella, pela amizade, por sempre me incentivar e acreditar no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas e à sua aluna Cláudia Q. Rocha por fornecer os extratos de *A. brachypoda* e todas as informações necessárias para compor minha dissertação. Agradeço também, por fazer parte de um projeto tão grandioso como o Projeto-BIOTA.

Aos professores Dr. Luis Vitor S. Sacramento e Dra. Rosemeire C. L. R. Pietro pela disposição e contribuições na qualificação desta dissertação.

Às professoras Dra. Hérica R. N. Salgado e Dra. Elfriede M. Bacchi por terem aceitado compor minha banca de defesa de dissertação.

Aos funcionários da Biblioteca, da seção de pós-graduação e todos os outros, agradeço pela ajuda e disposição.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Araraquara UNESP.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

E por último, agradeço enfaticamente ao meu namorado, Carlos (Kaká), pelo amor, carinho, respeito e principalmente, paciência pelos momentos que estive ausente.

Muito obrigado a todos!

RESUMO

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais derivam diversos fármacos. A grande diversidade encontrada no Brasil justifica o crescimento significativo na utilização de produtos de origem vegetal como potenciais fitoterápicos. O gênero *Arrabidaea* pertence à família Bignoniaceae, a qual é encontrada principalmente em regiões tropicais. No Brasil, são encontrados 56 gêneros e cerca de 338 espécies. As plantas desta família são aplicadas como adstringentes, antitérmicas e no tratamento de reumatismos, diarreias, câncer e infecções microbianas; suas propriedades são atribuídas aos componentes químicos dentre estes as lignanas, flavonoides, triterpenos, xantonas entre outros. *Arrabidaea brachypoda* é popularmente conhecida como “cervejinha do campo”, “cipó-una” ou “tintureiro”. Com o objetivo de contribuir com a avaliação do potencial farmacobiológico do Bioma Cerrado e proposição de novos fitoterápicos para uso popular, este estudo visou determinar a atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos, frações e substâncias isoladas da planta *A. brachypoda*, utilizando a técnica de microdiluição, frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *S. setubal*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Helicobacter pylori*. Os extratos hidroalcoólicos de raiz, caule e folha apresentaram moderada atividade para *P. aeruginosa* e o extrato de raiz mostrou acentuada atividade contra *S. aureus*, dados estes que justificaram a determinação das atividades Checkerboard e Time-Kill para esse micro-organismo. O composto G5 (rutina), isolado de raiz, apresentou moderada atividade frente ambas as bactérias. Os extratos e frações de *A. brachypoda* não demonstraram atividade anti-*H. pylori*. O extrato de raiz combinado com a amoxicilina apresentou um efeito sinérgico para *S. aureus* e sua atividade anti-*S. aureus* foi confirmada pelo ensaio Time-Kill com tempo de 6 a 12 horas. O presente trabalho comprova a atividade antimicrobiana de *A. brachypoda* e sugere a continuidade nos estudos para elucidação do(s) mecanismo(s) de ação desta espécie vegetal bem como a proposta de desenvolvimento de um fitoterápico.

Palavras-chave: *Arrabidaea brachypoda*; Atividade Antimicrobiana; Checkerboard; Microdiluição; Time-kill.

ABSTRACT

Plants are an important source of biologically active natural products, many of which derive from different drugs. The great diversity found in Brazil justifies the significant growth in the use of plant products as potentially herbal. The genus *Arrabidaea* belongs to the family Bignoniaceae, which is mainly found in tropical regions. There are found 56 genera and about 338 species in the Brazil. Plants of this family are applied as astringents, antipyretic and treatment of rheumatism, diarrhea, cancer and bacterial infections; its properties are attributed to the chemical components among these lignans, flavonoids, triterpenes, xanthenes among others. *Arrabidaea brachypoda* is popularly known as "cervejinha do campo", "cipó-una" or "tintureiro". In order to contribute to the evaluation of the pharmacological potential of the Cerrado Biome and propose new herbal medicine for popular use, this study aimed to determine the antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts, fractions and compounds isolated from the plant *A. brachypoda*, using the microdilution technique, opposed to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *S. setubal*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Helicobacter pylori*. The hydroalcoholic extracts of root, stem and leaf showed moderate activity for *P. aeruginosa* and the root extract showed strong activity against *S. aureus*, these data justify the determination of activities Checkerboard and Time-Kill for this micro-organism. The compound G5 (rutin), isolated from root showed moderate activity against both bacteria. The extracts and fractions of *A. brachypoda* didn't show activity anti-*H. pylori*. The root extract combined with amoxicillin showed a synergistic effect against *S. aureus* and its anti-*S. aureus* was confirmed by Time-Kill test with time of 6 to 12 hours. The present work proves the antimicrobial activity of *A. brachypoda* and suggests the continuity of studies for the elucidation the mechanism(s) of action of this specie and the proposed development of an herbal medicine.

Key-words: *Arrabidaea brachypoda*; Antimicrobial Activity; Checkerboard; Microdilution; Time-kill.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorbância

AMH – agar Müeller-Hinton

AS – agar Sangue

ASD – agar Sabouraud dextrose

ATCC – *American Type Culture Colection*

CBM – concentração bactericida mínima

CFM – concentração fungicida mínima

CIM – concentração inibitória mínima

CMH – caldo Müeller-Hinton

CSD – caldo Sabouraud dextrose

DCM – diclorometano

DMSO – dimetilsulfóxido

G4 – ácido ursólico

G5 – rutina

MOPS – ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico

PBS – tampão fosfato de sódio

RAB-3 – 3 β -esteariloxi-olean-12-eno

SBF – soro bovino fetal

TTC – cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografia de <i>Arrabidaea brachypoda</i>	24
Figura 2. Obtenção dos extrativos, frações e compostos isolados de <i>A. brachypoda</i> e suas estruturas químicas	34
Figura 3. Fluxograma para determinação da CIM pelo método de microdiluição	39
Figura 4. Reação de oxirredução da resazurina	41
Figura 5. Reação de oxirredução do TTC	44
Figura 6. Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico do ERAb com amoxicilina frente a <i>S. aureus</i>	46
Figura 7. Representação de um ensaio revelado com resazurina a 0,01%	51
Figura 8. Representação de um ensaio revelado com TTC a 2%	52
Figura 9. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o extrato de raiz de <i>A. brachypoda</i> nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL	53
Figura 10. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o extrato de caule de <i>A. brachypoda</i> nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL	53
Figura 11. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o extrato de folha de <i>A. brachypoda</i> nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL	54
Figura 12. Inibição do crescimento dos micro-organismos com a fração Aquosa de raiz de <i>A. brachypoda</i> nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL	54
Figura 13. Inibição do crescimento dos micro-organismos com a fração DCM de raiz de <i>A. brachypoda</i> nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL	55
Figura 14. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o composto G4 de raiz de <i>A. brachypoda</i> nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL	55

Figura 15. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o composto G5 de raiz de <i>A. brachypoda</i> nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL	56
Figura 16. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o composto RAB-3 de raiz de <i>A. brachypoda</i> nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL	56
Figura 17. Representação do plaqueamento realizado para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM)	58
Figura 18. Atividade antibacteriana do extrato de raiz de <i>A. brachypoda</i> (15,6µg/mL) frente <i>S. aureus</i> pelo ensaio Time-Kill	59
Figura 19. Inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de <i>A. brachypoda</i> e o seu respectivo controle	91
Figura 20. Inibição do crescimento de <i>E. coli</i> para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de <i>A. brachypoda</i> e o seu respectivo controle	93
Figura 21. Inibição do crescimento de <i>S. setubal</i> para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de <i>A. brachypoda</i> e o seu respectivo controle	94
Figura 22. Inibição do crescimento de <i>P. aeruginosa</i> para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de <i>A. brachypoda</i> e o seu respectivo controle	95
Figura 23. Inibição do crescimento de <i>H. pylori</i> para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de <i>A. brachypoda</i> e o seu respectivo controle	97
Figura 24. Inibição do crescimento de <i>C. albicans</i> para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de <i>A. brachypoda</i> e o seu respectivo controle	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação da porcentagem dos solventes, para cada extrativo, fração e composto isolado	35
Tabela 2. Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações	47
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de <i>A. brachypoda</i>	50
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) das frações do extrato da raiz de <i>A. brachypoda</i>	50
Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas de raiz de <i>A. brachypoda</i>	51
Tabela 6. Efeito sinérgico do extrato de raiz com amoxicilina contra <i>S. aureus</i>	59

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	30
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
	3.1 Obtenção dos extrativos vegetais	33
	3.2 Frações e compostos isolados	33
	3.3 Preparo das soluções dos extrativos	35
	3.4 Espectro de absorção dos extrativos vegetais	35
	3.5 Micro-organismos	36
	3.6 Estocagem e manutenção das cepas microbianas	36
	3.7 Avaliação da atividade antibacteriana	37
	3.7.1 Padronização da suspensão bacteriana	37
	3.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	37
	3.7.2.1 Realização do teste	37
	3.7.2.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	39
	3.7.2.3 Leitura espectrofotométrica	40
	3.7.2.4 Leitura com revelador	40
	3.8 Avaliação da atividade antifúngica	41
	3.8.1 Padronização da suspensão fúngica	41
	3.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	41
	3.8.2.1 Realização do teste	41

3.8.2.2	Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	42
3.8.2.3	Leitura espectrofotométrica	43
3.8.2.4	Leitura com revelador	43
3.9	Cálculo da viabilidade microbiana	44
3.10	Ensaio Checkerboard	45
3.11	Ensaio Time-Kill	47
4.	RESULTADOS	49
4.1	Método de microdiluição	50
4.2	Ensaio Checkerboard	58
4.3	Ensaio Time-Kill	59
5.	DISCUSSÃO	60
6.	CONCLUSÕES	69
7.	REFERÊNCIAS	71
8.	ANEXOS	87
	ANEXO 1	88
	ANEXO 2	91

1. INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos, as plantas têm sido usadas como um importante recurso ao alcance do ser humano. O homem descobriu nas plantas medicinais, muitos benefícios os quais foram transmitidos de geração a geração. Essas plantas significam um marco histórico na evolução de muitas nações, trouxeram melhorias nas condições de alimentação e a cura para muitas enfermidades. O uso de vegetais *in natura* pelas populações vem se intensificando (RATES, 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais derivam diversos fármacos comercializados no mundo inteiro. Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pela enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas desses produtos encontrados na natureza. Apesar disso, os dados disponíveis indicam que somente uma pequena porcentagem das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal.

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse no aproveitamento de fontes naturais, principalmente no que se refere às plantas para o uso farmacêutico, sendo que, na última década houve um significativo crescimento no uso de medicamentos fitoterápicos (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2010). Segundo estes autores, estes medicamentos chegam ao mercado em menor tempo e com menor custo de produção, pois eles não necessitam de um rigoroso controle de qualidade, quanto à segurança e à eficácia, para serem liberados para o mercado. Em contrapartida, a Anvisa (2004) define como fitoterápico: “todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos

etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais”.

O grande interesse nos produtos naturais é explicado em parte pelo uso indiscriminado de antibióticos que tem selecionado micro-organismos multirresistentes e em decorrência, a necessidade de se buscar novas substâncias antimicrobianas.

Desde a origem dos antibióticos na década de 1950, o número de agentes antimicrobianos derivados de plantas tem sido insuficiente. A utilização de extratos vegetais, bem como outras formas alternativas de tratamento médico, vem demonstrando grande popularidade desde a década de 1990. As razões para esse renascimento incluem diminuição de novas substâncias antimicrobianas sintéticas, além de muitas serem potencialmente tóxicas e apresentarem efeitos colaterais no paciente (MAREGESI et al., 2008; SILVA Jr. et al., 2009).

O uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde, e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (DUARTE et al., 2007). Inicialmente, estes medicamentos à base de plantas eram utilizados na forma de infusão (chá), pó ou decocto, ou ainda, através da via tópica, na forma de preparações à base de água ou óleo para unguentos e cataplasmas (VIEIRA et al., 2010).

O aumento do consumo de plantas medicinais nas últimas décadas foi devido a muitas pessoas acreditarem que esses produtos seriam “naturais”, ou seja, não

apresentariam “produtos químicos” passando a ser sinônimos de produtos saudáveis, seguros e benéficos à saúde (VIEIRA et al., 2010).

O avanço ocorrido na área científica permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e seguros, embora ainda faltem estudos científicos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas (VIEIRA et al., 2010). Os principais passos para a utilização de um composto bioativo a partir de recursos vegetais são: a extração, a triagem farmacológica, o isolamento e caracterização de compostos bioativos, a avaliação toxicológica e a avaliação clínica. Esta última é essencial para garantir a eficácia de um composto bioativo, podendo fornecer também, sua farmacocinética, biodisponibilidade, segurança e interações medicamentosas (SASIDHARAN et al., 2011).

Com o uso de plantas na manipulação de fitoterápicos, o país teria muitas vantagens, como a redução da importação de medicamentos, fomentando assim, a autossuficiência e fornecendo à população um maior número de medicamentos e uma maior valorização das tradições populares. Contudo, isso na prática não ocorre em farmácias magistrais como se verificou em um estudo de VIEIRA et al. (2010), os quais realizaram um levantamento de fórmulas manipuladas, onde apenas 4,1% correspondem aos fitoterápicos, o que permitiu aos autores concluir, que a credibilidade dos agentes prescritores ainda é muito baixa.

Em toda a sua extensão, o Brasil apresenta uma flora bastante diversificada, com vegetações de diferentes características e muitos princípios ativos ainda desconhecidos, isso justifica o crescimento significativo de estudos com produtos de origem vegetal objetivando a obtenção de novos potenciais fitoterápicos (CALIXTO, 2003; NAPOLITANO et al., 2005).

O interesse em se investigar novas moléculas eficazes no tratamento de infecções inclui o potencial microbicida de compostos extraídos de plantas. O Brasil oferece diversas possibilidades, pois possui a maior diversidade vegetal do planeta, contando com aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores, distribuídas nos diferentes tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010).

O Cerrado (savana neotropical) é o bioma com uma das maiores floras vegetais, com mais de 7.000 espécies nativas de plantas vasculares, e uma área de 2 milhões de km², compondo um cenário de exuberante diversidade biológica e influente arcabouço cultural das populações que nele vivem (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010; ROCHA et al., 2011). Hoje, é um ecossistema ameaçado devido à introdução de monoculturas e criações de gado nessa área durante as últimas três décadas. Constitui o segundo maior bioma da América do Sul depois da Floresta Amazônica e inicialmente cobria um quarto do território brasileiro (GARCIA, 2008).

Ainda que as plantas representem a maior diversidade em moléculas com diferentes estruturas, propriedades fisiológicas e físico-químicas que justificam o uso popular, é imprescindível conhecer a constituição química das espécies uma vez que a ocorrência ou mesmo as concentrações dos produtos metabólicos, como metabólitos secundários, são influenciadas por vários fatores ambientais como sazonalidade, umidade, temperatura entre outros (SIMÕES et al., 2004; GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Estes são derivados de processos de biotransformação de macromoléculas, como carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos; os seus produtos garantem vantagens para a sobrevivência das plantas e a perpetuação das espécies (SIMÕES et al., 2004).

O Ministério da Saúde divulgou uma lista contendo 71 plantas medicinais que poderão ser usadas como medicamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Entre elas foram selecionadas plantas com potencial para serem usadas contra diabetes, artrites, úlceras, hipertensão, inflamações e outras doenças crônicas. Desde 2007 o SUS financia medicamentos fitoterápicos feitos à base de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*) – para gastrite e úlceras – e guaco (*Mikania glomerata*) – para tosses e gripes – em apresentações na forma de cápsulas, comprimidos e xaropes, entre outras. Estes integram as listas de distribuição de medicamentos em 13 estados brasileiros. Em 2010 foram inclusos seis novos fitoterápicos, a fim de ampliar as opções terapêuticas para a população, a saber: alcachofra (*Cynara scolymus* L.), aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi), cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.), garra do diabo (*Harpagophytum procumbens*), isoflavona da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e unha de gato (*Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.)). Estas são ações do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos cujos objetivos são inserir com segurança, eficácia e qualidade plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS. Estes medicamentos também são extraídos de espécies cultivadas no Brasil não ameaçadas de extinção seguindo a recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de que os países devem usar os recursos naturais disponíveis no próprio território para promover a atenção primária à saúde e contribuir para o uso sustentável da biodiversidade nacional (BRASIL, 2011).

Dentre as plantas propostas pelo SUS destaca-se o gênero *Arrabidaea* que pertence à família Bignoniaceae a qual é encontrada principalmente em regiões tropicais, com cerca de 120 gêneros e 800 espécies de plantas arbustivas, arbóreas e trepadeiras (JABOUR et al., 2006).

No Brasil, esta família apresenta 56 gêneros e cerca de 338 espécies, que são aplicadas como adstringentes, antitérmicos, antivirais, citotóxicos, anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antimaláricos, antirreumático e anticarcinogênico (GARCIA, 2008; BRANDÃO et al., 2010).

Tais propriedades biológicas são devidas à grande diversidade de classes de metabólitos como: lignanas, flavonoides, iridoides, triterpenos, xantonas, naftoquinonas, ácidos cinâmicos e benzoicos e seus derivados. Os alcaloides são raramente encontrados, por isso não são considerados marcadores quimiotaxonômicos deste táxon. Os compostos químicos mais comuns são as naftoquinonas e iridoides, utilizados como antisséptico e no tratamento de tumores; além de sesquiterpenos com potencial antifúngico. Terpenoides e flavonoides isolados de Bignoniaceae do Cerrado apresentaram atividade protetora sobre patógenos e radiação ultravioleta (ALCERITO et al., 2002; LIMA et al., 2003; GARCIA, 2008; ALBERNAZ, 2010).

Alguns exemplos desta família são jacarandá (*Jacaranda brasiliana*) e ipês amarelo e roxo (*Tabebuia alba* e *T. avellanadaea*). Além de serem utilizados como ornamentais devido à beleza de suas florações, são empregados na construção civil, carpintaria e confecções de instrumentos musicais. Na América do Sul e do Norte, o ipê roxo é explorado na medicina popular como fitoterápico com ação anticancerígena, antifúngica, antibacteriana e anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 1990; PAULETTI et al., 2003; GARCIA, 2008). Tem-se ainda o ipê-do-cerrado (*Tabebuia serratifolia*), de folhas amarelas, e a bolsa-de-pastor (*Zehyera tuberculosa*). A primeira é dotada de forte atividade antimicrobiana, antialérgica, cicatrizante e antitumoral (OLIVEIRA et al., 1990).

Estudos relataram que as folhas de *Tabebuia obtusifolia* apresentam atividade específica contra *C. sphaerospermum*. Espécies de *Tabebuia* são conhecidas

por acumularem naftoquinonas bioativas (AGRIPINO et al., 2004). Adicionalmente, espécies como *Sparattosperma vernicosa* (caroba-branca, cinco-folhas ou ipê-batata), *Tabebuia alba* (ipê-amarelo ou pau-d'arco-amarelo), *Tabebuia impetiginosa* (ipê roxo), *Jacaranda brasiliana* (jacarandá) e *Jacaranda procera* (camboté) são indicadas como tratamento alternativo de afecções odontológicas (OLIVEIRA et al., 2007).

O gênero *Arrabidaea*, também pertencente à família Bignoniaceae, é frequentemente encontrado na América tropical, do México à Argentina (LIMA et al., 2003), e é o maior gênero da tribo Bignonieae com aproximadamente 100 espécies. Sua taxonomia é complexa, pois muitas características diagnosticadas neste gênero são compartilhadas com espécies de outros gêneros. O gênero mais próximo morfologicamente é o *Cuspidaria*, o qual se diferencia de *Arrabidaea* pelos lacínios do cálice mais alongados (GARCIA, 2008).

Arrabidaea é caracterizado pela inflorescência em panícula ou tirso multifloro, embora possam ser diagnosticadas espécies com racemos paucifloros. Suas flores têm corola rósea a roxa, raramente alva, mas nunca amarela (GARCIA, 2008).

No Brasil a maioria das espécies de *Arrabidaea* como *A. triplinervia* e *A. pulchera* são encontrados na região de cerrado. Outras espécies, como *A. agnuscatus* foram encontradas nas regiões semi-desérticas do Nordeste do Brasil, enquanto *A. bilabiata* e *A. chica* têm sido encontrados no Amazonas (LIMA et al., 2003).

Arrabidaea harleyi, também conhecida como "cipó-do-mato", é uma trepadeira lenhosa, usada na medicina tradicional como fungicida, especialmente no tratamento da caspa. É encontrada nas margens da Mata Atlântica, do estado do Piauí a Minas Gerais (LIMA et al., 2003).

Há poucos relatos de estudos químicos do gênero *Arrabidaea*. Dentre estes já foram isolados uma variedade de substâncias como componentes majoritários

das folhas ou caules como: trans-hidroxi-prolinobetaína, verbascosídeo, carajurina, alpinetina, carajuflavona, mangiferina, ácido pomólico, eritrodiol, uvaol, entre outros (GARCIA, 2008).

A. chica é a principal espécie estudada, da qual foram isolados taninos, 7,4-dihidroxi-5-metoxiflavona, fitosteróis, flavonoides e pigmentos utilizados em cosméticos (a carajurona e a carajurina), compostos derivados das 3-deoxiantocianidinas (a antocianidina, o pigmento 1, o pigmento 2 e a luteolina) e a carajuruflavona (PAULETTI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009). Esta espécie é conhecida como cajuru, carajiru, crajiru, cipó-pau, pariri ou cipó-cruz. O uso popular da *A. chica* é feito com base no decocto utilizado como anti-inflamatório, cicatrizante, em anemias, cólicas intestinais, hemorragia, diarreia, leucorreia e leucemia; a tintura é usada para tratar infecções cutâneas (OLIVEIRA et al., 2009).

Há também a investigação fitoquímica de *Arrabidaea samydoides*, a qual resultou no isolamento do lupeol, sitosterol, estigmasterol, crisina, 3 β ,16 α -dihidroxi-olean-12-eno, eritrodiol, uvaol, ácido ursólico e triterpenos (PAULETTI et al., 2003).

Arrabidaea brachypoda (DC) Bur. (Figura 1) é um arbusto nativo do Cerrado brasileiro, possui entre 1,0 e 2,0m de altura, abundantemente ramificado, com folhas simples e flores róseo-roxas em inflorescências terminais (ALCERITO et al., 2002; GARCIA, 2008). É popularmente conhecida como “cipó-una”, “tintureiro” ou “cervejinha do campo” (ALCERITO et al., 2002).



FONTE: Garcia, 2008.

Figura 1. Fotografia de *Arrabidaea brachypoda*.

De acordo com o grande número de espécies de plantas disponíveis para a análise, é primordial ter sistemas eficientes com métodos que avaliem a eficácia de plantas medicinais como agente antimicrobiano. O estudo de agentes antimicrobianos de origem vegetal inicia com uma avaliação biológica completa dos extratos para garantir a eficácia e segurança, seguido pela identificação de princípios ativos, formulações de dosagem e perfil farmacocinético da nova droga (DAS et al., 2010).

O potencial antimicrobiano das plantas está associado à composição química de tais espécies. Usualmente é determinado por ensaios *in vitro* utilizando técnicas de difusão em ágar e diluição (macro e microdiluição) (ELOFF et al., 1998; AGRIPINO et al., 2004; LANGFIELD et al., 2004). Existem outros métodos como a autobiografia, que é uma técnica útil para determinar compostos bioativos com atividade antimicrobiana de extratos de plantas a partir da inibição do crescimento de micro-organismos através da detecção de anticorpos antimicrobianos (ALCERITO et al., 2002; AGRIPINO et al., 2004; SASIDHARAN et al., 2011) e a técnica *Poison food*,

utilizada para determinar a atividade antifúngica a partir da inibição do crescimento micelial (DAS et al., 2010).

A técnica de difusão em ágar é bastante utilizada, sendo considerada de fácil execução, reprodutível e permite a experimentação de diversas concentrações das substâncias-teste em uma mesma placa (COWAN, 1999; NETO et al., 2002; CLSI, 2005; MORAIS, 2006). Contudo, ela se limita a micro-organismos de crescimento rápido e sua avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) (OSTROSKY et al., 2008; COGO et al., 2010).

O método de diluição em tubos foi uma das primeiras a serem desenvolvidas, servindo até hoje como método de referência (LANGFIELD, 2004; CLSI, 2006). Este método fornece resultados qualitativos e quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Suas desvantagens são: a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste com materiais clínicos, o consumo de muito tempo de preparo e execução, a geração de grande quantidade de resíduos e seu resultado é por proporção de densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (OSTROSKY et al., 2008).

Tanto a técnica de difusão em ágar, quanto a diluição em tubos, requerem grande quantidade da substância-teste, isso restringe o seu uso em bioensaios para compostos antimicrobianos de origem vegetal, pois na grande maioria são extraídos em pequenas quantidades, limitando assim o número de réplicas do ensaio (OSTROSKY et al., 2008).

Outra técnica amplamente utilizada é a microdiluição. Esta é extremamente vantajosa quando se refere a produtos naturais, uma vez que são obtidos em quantidades mínimas. Além disso, é uma técnica de baixo custo, simples, rápida, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, de alto rendimento e o

mais importante, permite determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos em estudo (ELOFF et al., 1998; COWAN, 1999; GABRIELSON et al., 2002; LANGFIELD et al., 2004; CUSHNIE & LAMB, 2005; ALVES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008; SALAZAR-ARANDA et al., 2009; PALOMBO, 2011). Mesmo que existam alguns inconvenientes, tais como células de alguns microorganismos que se aderem à base do poço, precipitação de compostos presentes em alguns extratos e a coloração do extrato em concentração alta que poderão interferir na análise, essa técnica é a mais adequada (OSTROSKY et al., 2008).

O Checkerboard e o Time-kill são outras metodologias antimicrobianas válidas. Estas têm sido desenvolvidas para quantificar o efeito de combinações de agentes antimicrobianos no crescimento bacteriano *in vitro* (JACKSON et al., 2009). As terapias de combinações antimicrobianas além de melhorar a eficácia, proporcionam uma terapia de amplo espectro e previne o aparecimento de microorganismos resistentes (DRAGO et al., 2007).

O método de Checkerboard avalia o efeito da substância-teste em combinação com um antimicrobiano em diferentes concentrações. É um método de microdiluição em caldo semelhante ao utilizado para as determinações de CIM padrão. Os métodos de diluição em ágar ou em tubos ou ainda de difusão em ágar utilizando discos, também podem ser usados. As interações são calculadas a partir de uma equação e então definidas como sinérgica, indiferente ou antagonista e comparada com os valores de CIM da substância-teste e do antimicrobiano isoladamente para saber se essa terapia é viável ou não (BERENBAUM, 1978; RAHAL, 1978; ELIOPOULOS & ELIOPOULOS, 1988; ELIOPOULOS & MOELLERING Jr, 1996; PILLAI & MOELLERING, 2005; MITCHELL et al., 2012).

O método Time-Kill comprova o tempo em que a substância-teste leva para matar as células microbianas. É um ensaio dependente da concentração ou do tempo. Uma das vantagens do Time-Kill em relação ao Checkerboard é que ele fornece a dinâmica da ação da substância-teste e sua interação com o tempo (ELIOPOULOS & ELIOPOULOS, 1988; ELIOPOULOS & MOELLERING Jr, 1996; NCCLS-M26-A, 1999; MITCHELL et al., 2012).

A determinação do composto biologicamente ativo a partir de um material vegetal é dependente do tipo de solvente usado no processo de extração (DAS et al., 2010). Na extração de compostos hidrofílicos, por exemplo, são usados solventes polares tais como metanol, etanol ou acetato de etila. Já para compostos mais lipofílicos, são usados diclorometano ou uma mistura de diclorometano / metanol na proporção de 1:1 (SASIDHARAN et al., 2011).

Um bom solvente em extrações de plantas possui propriedades como: baixa toxicidade, facilidade de evaporação a baixa temperatura, absorção fisiológica rápida do extrato, ação conservante e incapacidade de fazer com que o extrato se dissocie ou torne um complexo. Além disso, o solvente não deve interferir no bioensaio (DAS et al., 2010).

Alcerito e colaboradores (2002) isolaram quatro flavonoides ativos: cirsimaritina, cirsilinol, hispidulina e 3',4'-di-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona de folhas de *Arrabidaea brachypoda* os quais apresentaram atividade anti-*Cladosporium sphaerospermum*. Estudos *in vivo* com o extrato etanólico da raiz de *A. brachypoda* demonstraram ação anti-inflamatória em ratos e atividade antinociceptiva em camundongos, justificando o uso na medicina popular brasileira no alívio de dores em geral e nas articulações e cálculos nos rins (ROCHA et al., 2011).

Segundo Alves & Pereira (2011), os extratos etanólicos de raiz, caule e folhas de *A. brachypoda* apresentam atividade leishmanicida para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Do mesmo modo, o extrato de caule e frutas desta mesma espécie revelou atividade antiviral (BRANDÃO et al., 2010). Além disso, Blatt e colaboradores comprovaram a presença de apigenina e luteolina em suas formas agliconas (BLATT et al., 1998).

O perfil antibacteriano de *A. brachypoda* não é mencionado na literatura, fato que estimula a estudar essa espécie frente a bactérias de interesse para a Saúde Pública como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella setubal*, *Pseudomonas aeruginosa* e especialmente o *Helicobacter pylori*, que é um patógeno associado a distúrbios gastrintestinais como gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico, muito comum hoje na população (SUERBAUM & MICHETTI, 2002; SIQUEIRA et al., 2007; ROZZA et al., 2011).

Embora aproximadamente 50% da população mundial estejam infectados com *H. pylori*, apenas cerca de 3% dos indivíduos desenvolvem a neoplasia. As principais vias de transmissão são oral-oral e oral-fecal (SUERBAUM & MICHETTI, 2002; LADEIRA et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2007).

Os principais mecanismos patogênicos são os fatores de virulência do micro-organismo, a resposta inflamatória da mucosa e a alteração da secreção ácida gástrica (SUERBAUM & MICHETTI, 2002; SIQUEIRA et al., 2007).

Em muitos casos, a atividade anti-*H. pylori* de diversos extratos vegetais tem sido associada à presença de compostos fenólicos como flavonoides e/ou taninos hidrolisáveis (SUERBAUM & MICHETTI, 2002; FUNATOGAWA et al., 2004; KIM et al., 2006; ROMERO et al., 2007; RAMADAN & SAFWAT, 2009), que por diferentes mecanismos interferem na atividade da urease (LIN et al., 2005),

aderência à mucosa gástrica (BURGER et al., 2000), à superfície da membrana hospedeira (NOHYNEK et al., 2006), inibições da atividade tóxica do micro-organismo (RUGGIERO et al., 2006) e da atividade de proteases extracelulares (WINDLE & KELLEHER, 1997).

O tratamento convencional para terapia de infecções com *H. pylori* baseia-se na utilização de múltiplas drogas, tais como a claritromicina, amoxicilina, furazolidona, tetraciclina e metronidazol com bismuto ou um inibidor da bomba de prótons (LIMA et al., 2008; BONACORSI et al., 2009; COGO et al., 2010). No entanto, estudos relataram as taxas de resistência de cepas de *H. pylori* frente ao metronidazol (42%), amoxicilina (29%), claritromicina (7%), furazolidona (4%) e tetraciclina (7%) (MENDONÇA et al., 2000). Adicionalmente, muitos desses antimicrobianos ocasionam efeitos colaterais, como náusea, dor epigástrica, desconforto abdominal e diarreia (MAZZOLIN et al., 2010).

Objetivando a padronização de fitoterápicos acessíveis à população em atendimento à iniciativa do Ministério da Saúde, este estudo visou determinar a atividade antimicrobiana de *Arrabidaea brachypoda*.

2. OBJETIVOS

Geral:

- Determinar o potencial antimicrobiano de raiz, caule e folha da *Arrabidaea brachypoda*.

Específico:

- Determinar a atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos, frações e compostos isolados de *A. brachypoda*;
- Determinar a atividade antifúngica de extratos hidroalcoólicos, frações e compostos isolados de *A. brachypoda*;
- Determinar a eficiência da combinação das amostras vegetais com atividade antimicrobiana frente aos antimicrobianos utilizados comercialmente pelo ensaio Checkerboard;
- Determinar o tempo de morte dos micro-organismos pelo ensaio Time-Kill.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos extrativos vegetais

Os extratos hidroalcoólicos, frações e substâncias isoladas utilizados neste estudo são oriundos do projeto BIOTA-FAPESP e foram cedidos pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, coordenador do Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química – Unesp - Araraquara.

As folhas, caules e raízes foram coletados em abril de 2010, nas áreas de cerrado da fazenda Sant'Ana da Serra, situada no município de João Pinheiro (MG) pela pós-graduanda Cláudia Quintino da Rocha.

A exsicata foi depositada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto (Instituto de Botânica), sendo identificada pela Profa. Dra. Maria Cristina Teixeira Braga Messias, obtendo o número de registro 17.935.

As partes das plantas, previamente divididas e separadas, foram submetidas à secagem em estufa a 45°C até peso constante. A temperatura da estufa foi controlada por um termostato e um termômetro, os quais garantiram uma homogeneidade na temperatura utilizada durante a secagem. Em seguida, ocorreu a moagem, para padronizar o tamanho de partículas do pó da planta. Os extrativos foram obtidos pelo método de extração exaustivo de percolação de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), isolados e identificados utilizando as técnicas cromatográficas (HPLC, CG, MS) e métodos espectroscópicos (Cláudia Q. Rocha).

3.2 Frações e compostos isolados

Foram preparados extratos hidroalcoólicos de raiz, caule e folha de *A. brachypoda*, como mostra a Figura 2 juntamente com a estrutura química dos

compostos isolados, os quais foram obtidos e cedidos pela doutoranda Cláudia Q. Rocha.

A partir do extrativo hidroalcoólico 70% de raiz de *A. brachypoda*, foram obtidas as frações aquosa e diclorometânica, e três compostos puros. O G4 (ácido ursólico) e G5 (rutina) foram originários da fração aquosa, e o RAB-3 (3 β -esteariloxi-olean-12-eno) foi oriundo da fração diclorometânica (fração DCM). O RAB-3 é um triterpeno da classe β -amirina.

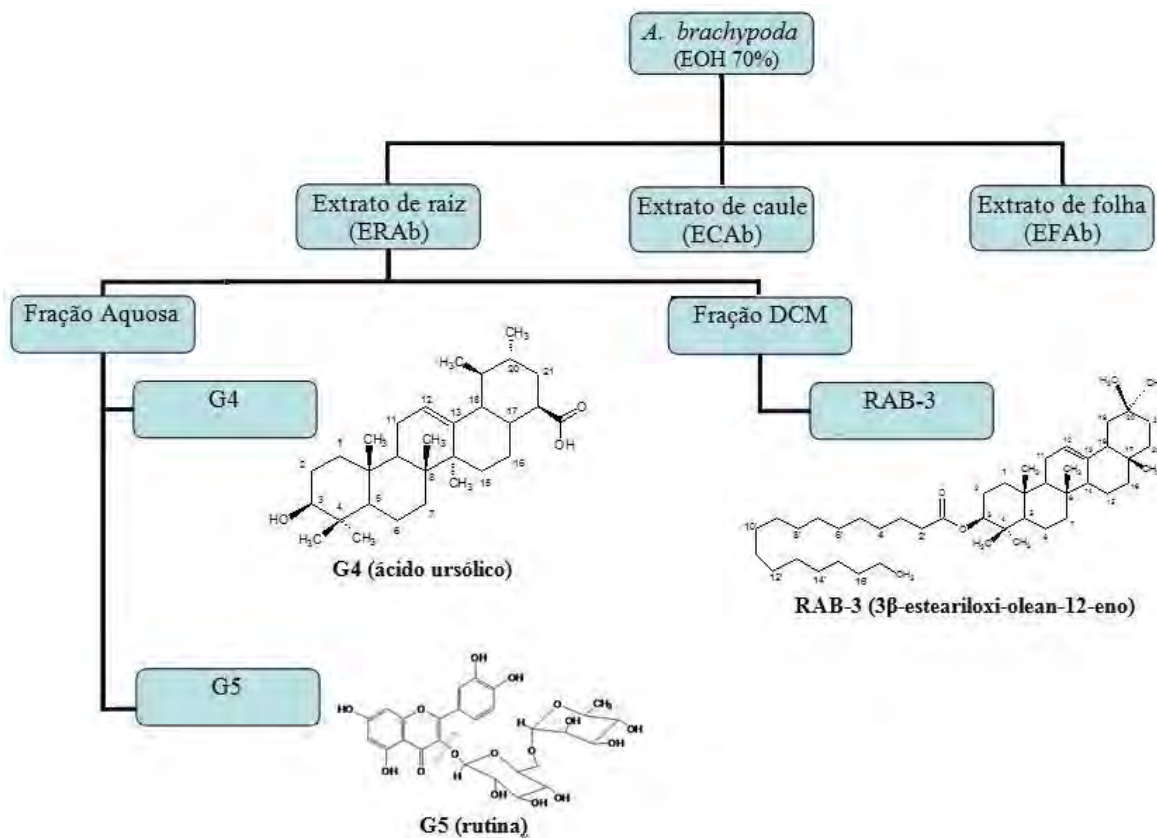


Figura 2. Obtenção dos extrativos, frações e compostos isolados de *A. brachypoda* e suas estruturas químicas.

3.3 Preparo das soluções dos extrativos

Os extrativos foram diluídos na concentração de 2000µg/mL em solventes adequados, de acordo com a Tabela 1, como solução-estoque até o início dos experimentos.

Tabela 1. Determinação da porcentagem dos solventes, para cada extrativo, fração e composto isolado de *A. brachypoda*.

Solventes	ERAb*	ECAb*	EFAb	Fração Aquosa	Fração DCM	G4	G5	RAB-3
Água	–	–	–	100%	–	–	–	–
Dimetilsulfóxido (DMSO)	20%	–	–	–	5%	5%	5%	5%
Etanol 96%	–	20%	–	–	–	–	–	–
Etanol 96% + Tween80(10%)	25%	25%	25%	–	–	–	–	–

*Foram preparadas duas soluções independentes, com solventes distintos, para estes extrativos.

3.4 Espectro de absorção dos extrativos vegetais

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

Estas análises permitiram avaliar o melhor comprimento de onda utilizado nas leituras de absorbância para a determinação da CIM dos extratos, sem a interferência da cor dos extratos vegetais e do meio de cultura.

3.5 Micro-organismos

Foram utilizadas as seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella setubal* ATCC 19196, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 e *Candida albicans* ATCC 64548.

3.6 Estocagem e manutenção das cepas microbianas

As cepas bacterianas, com exceção do *H. pylori*, foram mantidas em CMH acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20°C. Para uso, as cepas foram repicadas em CMH (2mL), incubados por 24h a 37°C.

A cepa de *H. pylori* foi mantida em CMH contendo 50% de SFB acrescido de 50% de glicerol e mantido a -20°C. Para o uso, o *H. pylori* foi repicado em CMH acrescido de 50% de SFB e incubado a 37°C, por 72h em 10% de CO₂ e umidade.

A levedura foi mantida em CSD acrescido de 50% de glicerol e mantida a -20°C. Para o uso, foi replicada em 2mL de CSD e incubado a 37°C por 48h.

3.7 Avaliação da atividade antibacteriana

3.7.1 Padronização da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, para as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *S. setubal* e *P. aeruginosa*, adicionando-se PBS pH 7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

Para *H. pylori*, a suspensão foi padronizada a partir de uma cultura em AS de 72 horas com 10% de CO₂, adicionando-se CMH acrescido de 50% de SFB até atingir uma turvação igual à suspensão do tubo 2 da escala McFarland (aproximadamente 6×10^8 UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 570nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH acrescido de 50% de SFB, obtendo-se uma suspensão de 6×10^7 UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

3.7.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

3.7.2.1 Realização do teste

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) para as bactérias aeróbicas e o suplemento M100-S16 (CLSI, 2006a), para as bactérias fastidiosas, com modificações.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80µL de CMH para *S. aureus*, *E. coli*, *S. setubal* e *P. aeruginosa*, e 80µL de CMH acrescido de 50% de SFB para *H. pylori*. Em seguida foram acrescentados 100µL das soluções dos extrativos vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8µg/mL. Adicionalmente foram distribuídos 20µL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi utilizado a amoxicilina e o omeprazol para *H. pylori* e a ampicilina para as demais bactérias. Estes foram usados em concentrações adequadas para cada micro-organismo, visando alcançar a CIM, sendo considerada como a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER et al., 2008). Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extrativos vegetais e o controle negativo (solventes).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para *S. aureus*, *E. coli*, *S. setubal* e *P. aeruginosa* e a 37°C por 72 horas sob condição de microaerofilia para *H. pylori*. Em cada microplaca foram testados dois extrativos vegetais em duplicata. Os testes foram realizados em triplicata. A Figura 3 mostra esquematicamente o teste nas microplacas.

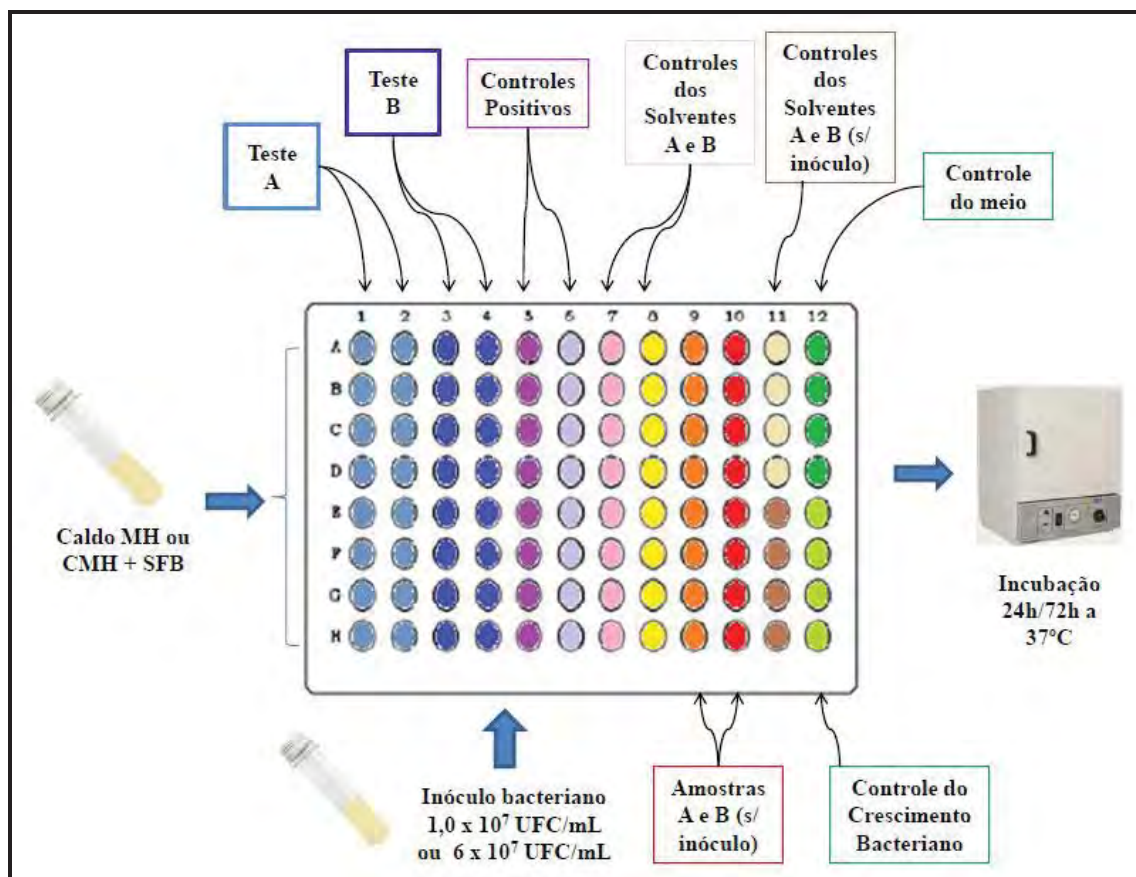


Figura 3. Fluxograma para determinação da CIM pelo método de microdiluição.

3.7.2.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Após a incubação das microplacas foram realizadas as determinações da CBM.

Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de AS para *H. pylori* e AMH para as demais bactérias. As placas foram incubadas a 37°C por 24h para *S. aureus*, *E. coli*, *S. setubal* e *P. aeruginosa* e a 37°C por 72h sob condição de microaerofilia para *H. pylori*.

3.7.2.3 Leitura espectrofotométrica

Após a realização da CBM, as microplacas foram submetidas a leitura de absorvância a 595nm, em espectrofotômetro de microplacas (Model 550 – Bio Rad). Os valores obtidos foram considerados para a confecção de gráficos que expressam a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos de acordo com GUDIÑA et al. (2010).

3.7.2.4 Leitura com revelador

Foram realizadas leituras com o revelador resazurina (100µg/mL) do qual 30µL foi adicionada em cada orifício das microplacas nos testes com bactérias. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), mostrado na Figura 4. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

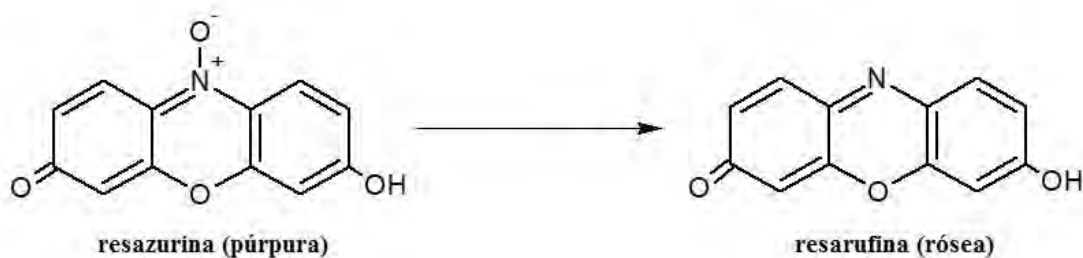


Figura 4. Reação de oxirredução da resazurina.

3.8 Avaliação da atividade antifúngica

3.8.1 Padronização da suspensão fúngica

A suspensão fúngica foi padronizada a partir de uma cultura de 48 horas, em CSD, adicionando-se PBS pH 7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 5×10^6 UFC/mL). Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica a 530nm para confirmação da concentração das leveduras. Posteriormente, a suspensão fúngica foi diluída 1:100, seguida de outra diluição 1:20, em PBS, obtendo-se uma suspensão de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, para utilização nos ensaios.

3.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

3.8.2.1 Realização do teste

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com as metodologias descritas segundo a norma M27-A3 do CLSI (2008) e Duarte et al. (2005), com modificações.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100µL de RPMI-1640 (tamponado com MOP's) para *C. albicans*. Em seguida foram acrescentados 100µL das soluções dos extrativos vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8µg/mL. Adicionalmente, foram distribuídos 100µL da suspensão de levedura em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados a anfotericina B e o fluconazol. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle dos extrativos vegetais e o controle negativo (solventes).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas. Em cada microplaca foram testados dois extrativos vegetais em duplicata. Os testes foram realizados em triplicatas.

A inibição do crescimento microbiano foi evidenciada pela ausência de crescimento no meio, sendo considerada determinada a CIM a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HAWSER & ISLAM, 1999; HÖRNER et al., 2008).

3.8.2.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após a incubação das microplacas, foram realizadas as determinações da CFM.

Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de ASD. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

3.8.2.3 Leitura espectrofotométrica

Após a realização da CBM, as microplacas foram submetidas a leitura de absorbância a 595nm, em espectrofotômetro de microplacas (Model 550 – Bio Rad). Os valores foram considerados para a confecção de gráficos que expressam a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos de acordo com GUDIÑA et al. (2010).

3.8.2.4 Leitura com revelador

Foram realizadas leituras com o revelador TTC a 2%, do qual 20µL foi adicionado em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 horas os poços que apresentaram atividade permanecem incolores, enquanto os poços nos quais houve crescimento microbiano coram de vermelho (DUARTE et al., 2005).

O TTC é um indicador de oxirredução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles não ativos, principalmente viabilidade celular. O mecanismo baseia-se na redução enzimática do 2,3,5 – trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5 – trifenilformazan (cor avermelhada), mostrado na Figura 5, em tecidos vivos devido à atividade de várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e portanto no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002).

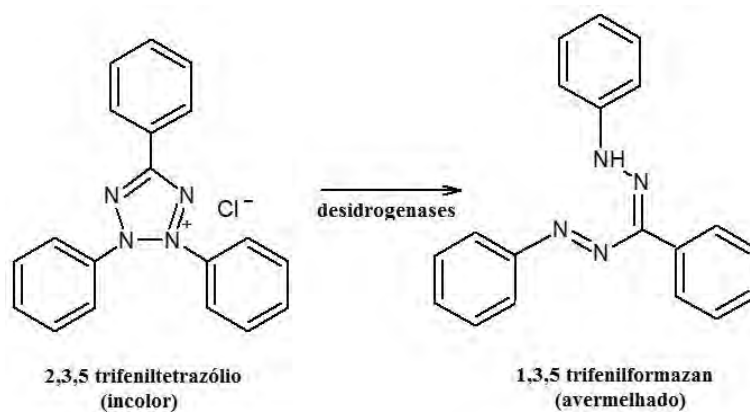


Figura 5. Reação de oxirredução do TTC.

3.9 Cálculo da viabilidade microbiana

A partir da leitura espectrofotométrica foi determinada a viabilidade microbiana para cada micro-organismo, que foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações das substâncias testadas (extratos, frações e substâncias isoladas), para cada micro-organismo de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição do crescimento microbiano} = [1 - (A_c/A_0)] \times 100$$

em que: A_c representa a média das absorbâncias por concentração de substância testada e já subtraída do valor da absorbância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo e A_0 a média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (GUDIÑA et al., 2010). Este resultado, portanto, representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir.

3.10 Ensaio Checkerboard

Para avaliar o efeito sinérgico do extrato da raiz de *A. brachypoda* com a amoxicilina frente ao *S. aureus* foi realizada a técnica de microdiluição modificado para o ensaio Checkerboard de acordo com a metodologia descrita segundo Pillai & Moellering (2005). Foi escolhido o extrato de raiz para esse ensaio, pois foi a amostra que apresentou o melhor resultado nos ensaios de atividade antimicrobiana (microdiluição).

A suspensão de *S. aureus* foi padronizada a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, adicionando-se PBS pH 7,2 estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620nm para confirmação da concentração deste micro-organismo. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada no ensaio.

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80µL de CMH. Na última coluna (nº 12) adicionaram-se 100µL de amoxicilina a 0,1µg/mL para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100µL do poço anterior para o próximo até a coluna 2. Da mesma maneira, na primeira linha (A) adicionou-se 100µL da solução de extrato de raiz a 125µg/mL para posterior realização da diluição seriada até a linha G. Portanto, a coluna 1 contém apenas o extrato de raiz e a linha H apenas a amoxicilina. No poço H1 foi feito o controle de crescimento bacteriano. Adicionalmente, foram distribuídos 20µL da suspensão de *S. aureus* em cada poço.

As microplacas foram incubadas por 24 horas à 37°C e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano e a leitura com o

revelador resazurina (100µg/mL), utilizado como indicador de crescimento bacteriano.

Os experimentos foram realizados em triplicata.

A Figura 6 esquematiza a realização do teste em microplacas.

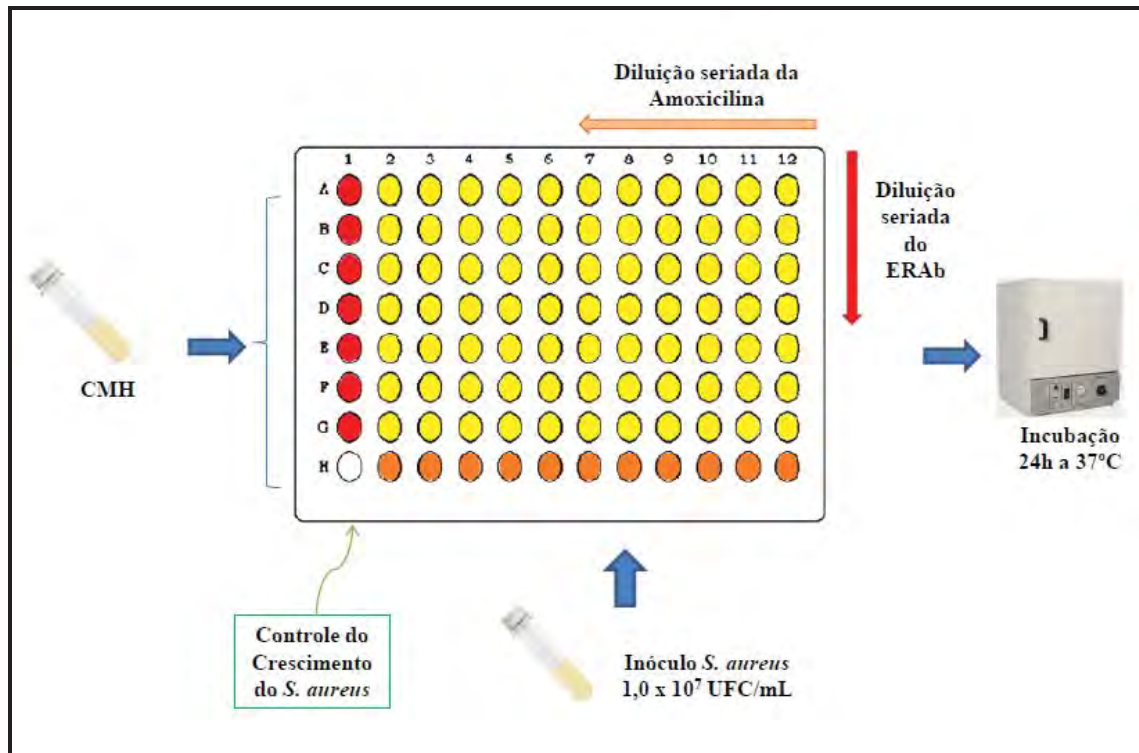


Figura 6. Fluxograma para avaliação do efeito sinérgico do ERAb com amoxicilina frente a *S. aureus*.

Para a avaliação da interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte fórmula (Eq2):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{(\text{ERAb})} + \text{CIF}_{(\text{Amoxicilina})} \quad (\text{Eq1})$$

$$\text{ICIF} = \frac{(\text{CIM}_{\text{ERAb na combinação}})}{(\text{CIM}_{\text{ERAb}})} + \frac{(\text{CIM}_{\text{Amoxicilina na combinação}})}{(\text{CIM}_{\text{da Amoxicilina}})} \quad (\text{Eq2})$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Kumar et al. (2012), na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações.

Interação	ICIF
Sinergismo	$CIF \leq 0,5$
Aditivo	$0,5 < CIF \leq 1$
Indiferente	$1 < CIF \leq 2$
Antagonismo	$CIF > 2$

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; CIF: concentração inibitória fracionada.

3.11 Ensaio Time-Kill

O ensaio Time-Kill *in vitro* foi realizado de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M26-A do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999) e avaliado a partir da CIM determinada nos testes de microdiluição e duas vezes a CIM. Adicionalmente, foram feitos o controle de crescimento, controle de esterilidade e controle positivo com amoxicilina a 20 μ g/mL para *S. aureus*. Para realização dos experimentos, o inóculo foi padronizado com a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL), seguida de leitura espectrofotométrica a 620nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada diluição 1:10, em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

O ensaio é realizado em tubos de ensaio adicionando-se 800 μ L de CMH, acrescidos de 100 μ L do extrato da raiz de *A. brachypoda*, e em seguida

homogeneizados. Após este procedimento 100µL desta solução (CMH + substância-teste) são desprezados, e então é adicionado o inóculo padronizado (200µL em cada tubo). Posteriormente, 10µL desse homogeneizado é adicionado em 990µL de PBS pH 7,2 estéril e então incubados em tempos pré-determinados, a fim de preparar a solução usada nos ensaios, nomeada dessa maneira como solução-teste.

Para a realização dos experimentos uma alíquota de 100µL da solução-teste foi plaqueada em meio de AMH para as demais bactérias, com o auxílio de alça de Drigalski. O plaqueamento ocorreu nos tempos de 0, 1, 2, 3, 6, 12 e 24 horas para o *S. aureus*. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após a incubação as colônias foram contadas manualmente, e o resultado obtido foi multiplicado por 1000, obtendo-se assim a concentração de UFC/mL. Foi realizado o ensaio somente para o extrato de raiz, pois foi a amostra que apresentou o melhor resultado obtido nos ensaios de atividade antimicrobiana (microdiluição).

4. RESULTADOS

4.1 Método de microdiluição

A atividade antimicrobiana dos extratos (raiz, caule e folha), frações (DCM e aquosa) e compostos isolados (G4, G5 e RAB-3) de *Arrabidaea brachypoda* foi avaliada como mostram as Tabelas 3, 4 e 5 e as Figuras 7 e 8. Com esses resultados, foi assim determinada, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cada micro-organismo.

Em todos os experimentos os controles positivos, do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem o inóculo foram adequados.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos de *A. brachypoda*.

Amostras testadas	CIM (µg/mL)					
	Micro-organismos					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>
Raiz	15,6	-	-	1000	-	-
Caule	-	-	-	1000	-	-
Folha	-	-	-	1000	-	-

* (-) CIM > 1000 µg/mL

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) das frações do extrato da raiz de *A. brachypoda*.

Amostras testadas	CIM (µg/mL)					
	Micro-organismos					
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>H. pylori</i>	<i>C. albicans</i>
Fração Aquosa	-	-	-	-	-	-
Fração DCM	-	-	-	-	-	-

* (-) CIM > 1000 µg/mL

Tabela 5. Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas de raiz de *A. brachypoda*.

Amostras testadas	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
	Micro-organismos	
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
G4	-	-
G5	1000	1000
RAB-3	-	-

* (-) CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$

Os compostos isolados da raiz de *A. brachypoda* foram testados somente para *S. aureus* e *P. aeruginosa* devido à pequena quantidade da amostra obtida e a presença de atividade do extrato de raiz verificado nos testes para esses micro-organismos.

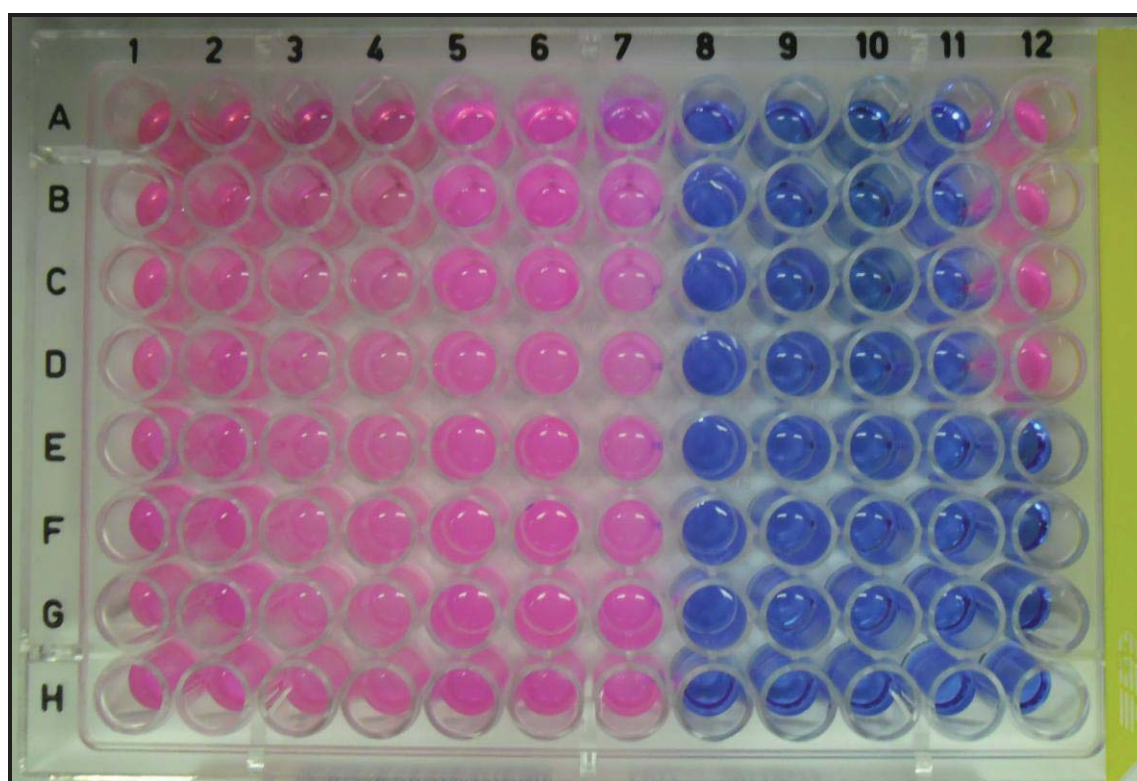


Figura 7. Representação de ensaio revelado com resazurina a 0,01%.

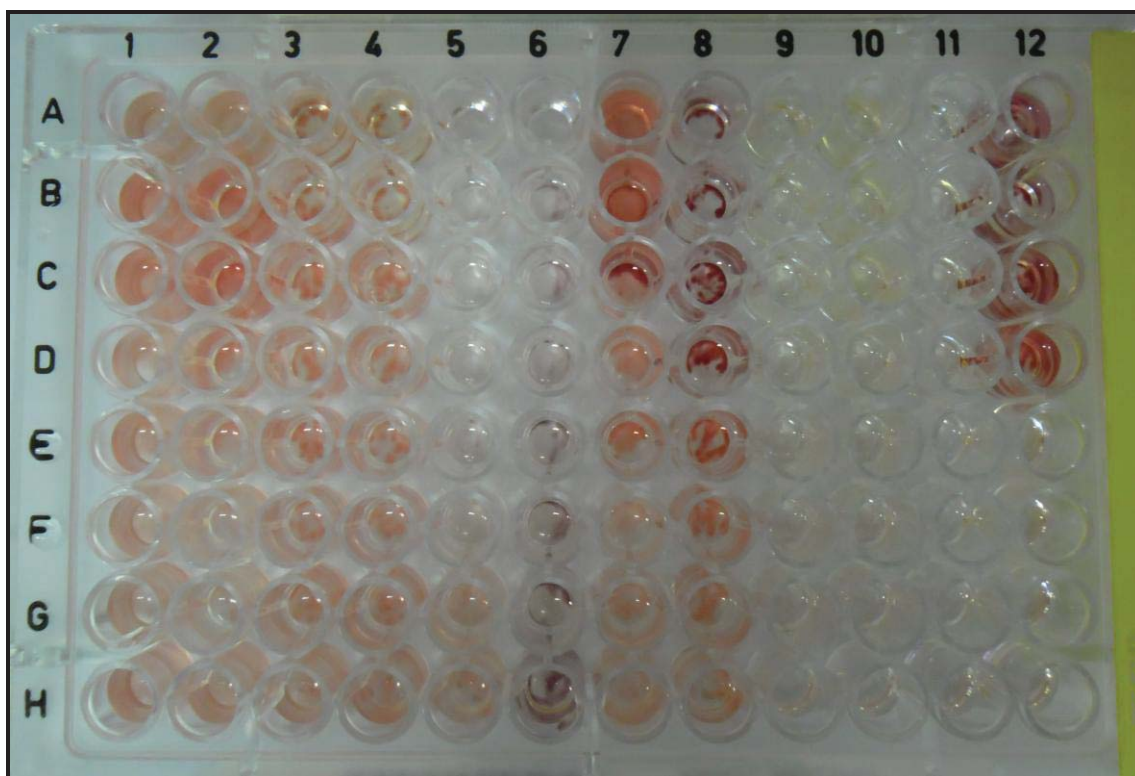


Figura 8. Representação de ensaio revelado com TTC a 2%.

Pela leitura espectrofotométrica foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento de cada micro-organismo. As Figuras de 9 a 16 apresentam os resultados de inibição de crescimento microbiano nas concentrações de 1000, 500 e 250 μ g/mL. No Anexo 2 estão apresentados os gráficos de inibição de crescimento contemplando todas as concentrações utilizadas bem como os dos controles (Figuras 19 a 24).

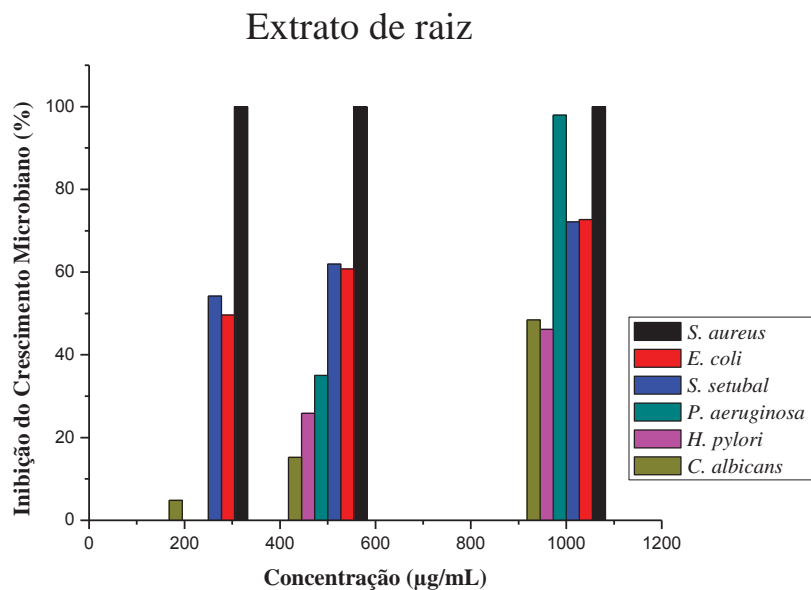


Figura 9. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o extrato de raiz de *A. brachypoda* nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL.

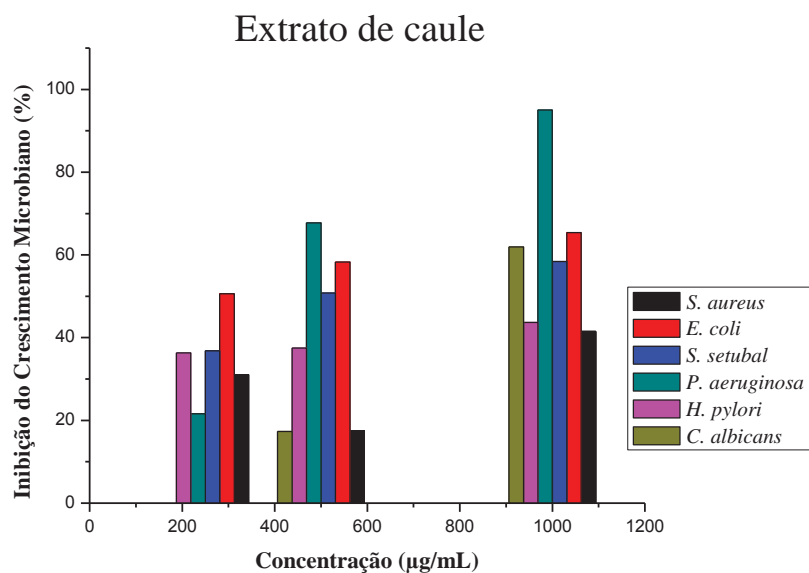


Figura 10. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o extrato de caule de *A. brachypoda* nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL.

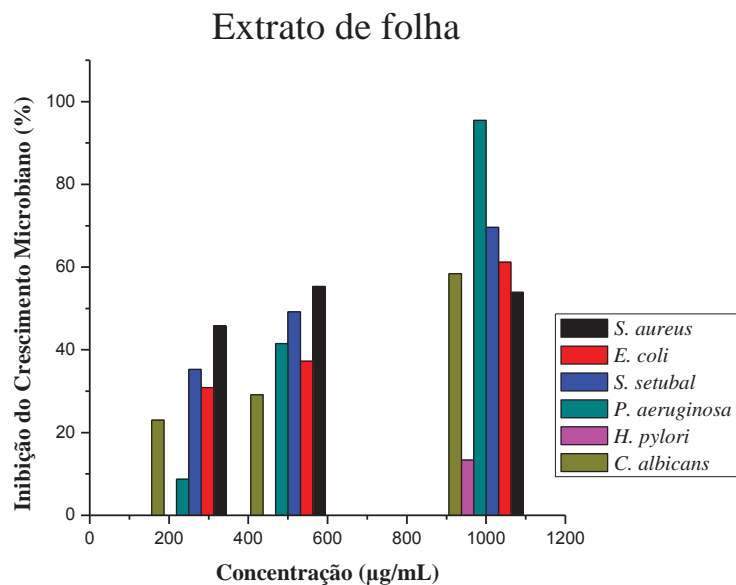


Figura 11. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o extrato de folha de *A. brachypoda* nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL.

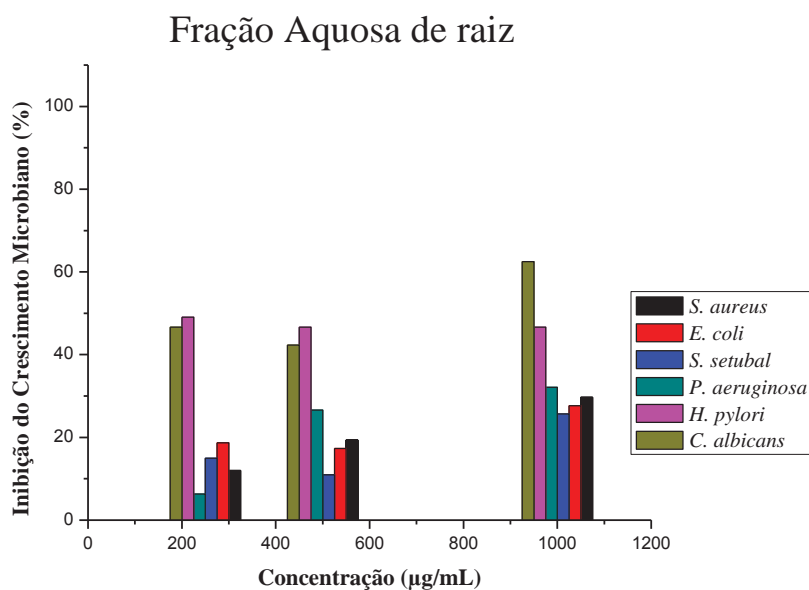


Figura 12. Inibição do crescimento dos micro-organismos com a fração Aquosa de raiz de *A. brachypoda* nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL.

Fração DCM de raiz

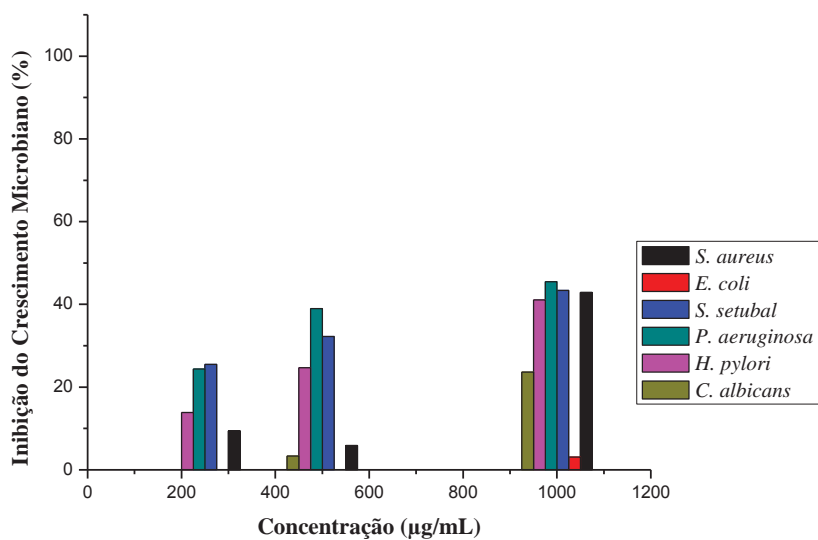


Figura 13. Inibição do crescimento dos micro-organismos com a fração DCM de raiz de *A. brachypoda* nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL.

Composto G4

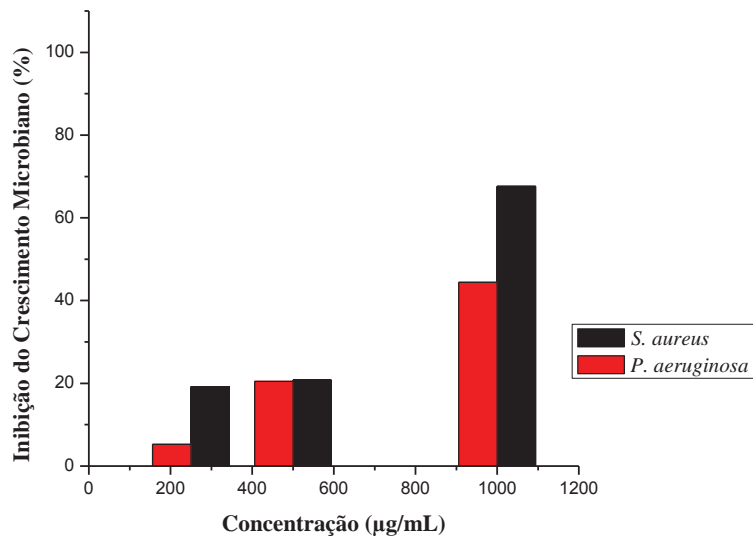


Figura 14. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o composto G4 de raiz de *A. brachypoda* nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL.

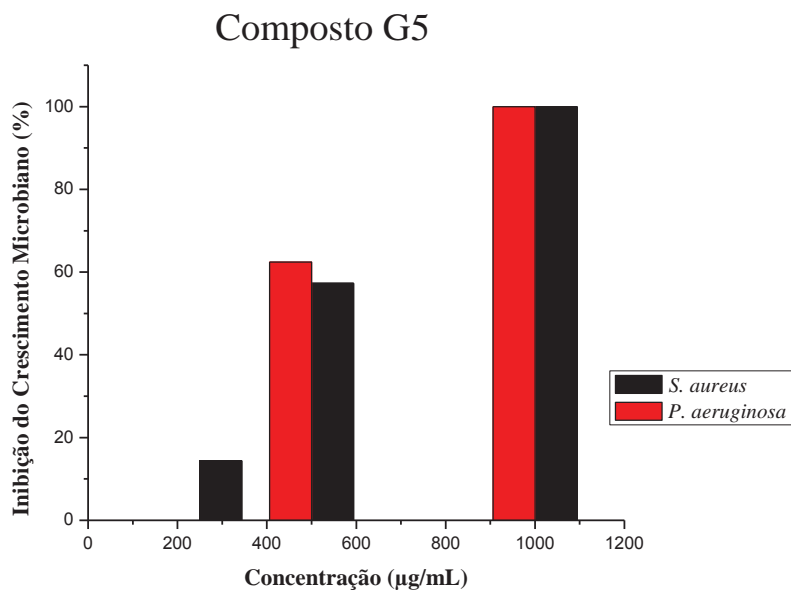


Figura 15. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o composto G5 de raiz de *A. brachypoda* nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL.

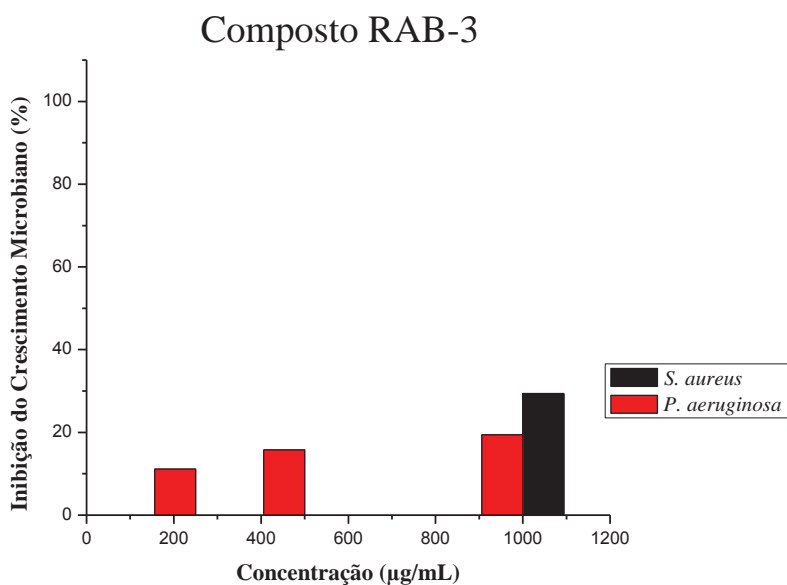


Figura 16. Inibição do crescimento dos micro-organismos com o composto RAB-3 de raiz de *A. brachypoda* nas concentrações de 1000, 500 e 250µg/mL.

Os resultados de CIM das atividades antibacteriana e antifúngica mostram que todos os extratos de *A. brachypoda* apresentaram capacidade de inibir o crescimento de pelo menos um micro-organismo, sendo que o extrato de raiz que apresentou o melhor resultado para *S. aureus* com CIM de 15,6µg/mL.

Referente aos resultados obtidos para os compostos isolados, o único que foi detectado a CIM, foi a substância isolada G5 para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com CIM de 1000µg/mL para ambas as bactérias. Os demais extratos, frações e compostos não apresentaram atividade inibitória para os micro-organismos testados (Tabelas 3, 4 e 5).

As Concentrações Bactericidas Mínimas foram realizadas para os extratos que apresentaram atividade a pelo menos um dos micro-organismos.

O extrato de raiz para *S. aureus* apresentou CIM de 15,6µg/mL tanto para a leitura com resazurina quanto para a leitura espectrofotométrica, com 100% de inibição de crescimento, entretanto a CBM foi de 62,5µg/mL. Estes dados demonstram que o extrato de raiz nas suas maiores concentrações (1000-62,5µg/mL) apresentam atividade bactericida e nas concentrações de 31,3-15,6µg/mL atividade bacteriostática.

Os extratos de raiz, caule e folha para *P. aeruginosa* apresentaram CIM de 1000µg/mL com a leitura da resazurina. Adicionalmente, a leitura espectrofotométrica revelou 97,9% de inibição de crescimento para a raiz, 95% para o caule e 95,5% para a folha. Estes dados demonstram a atividade bacteriostática destes extratos para *P. aeruginosa* nesta concentração.

A Figura 17 representa o plaqueamento realizado para determinar a CBM.

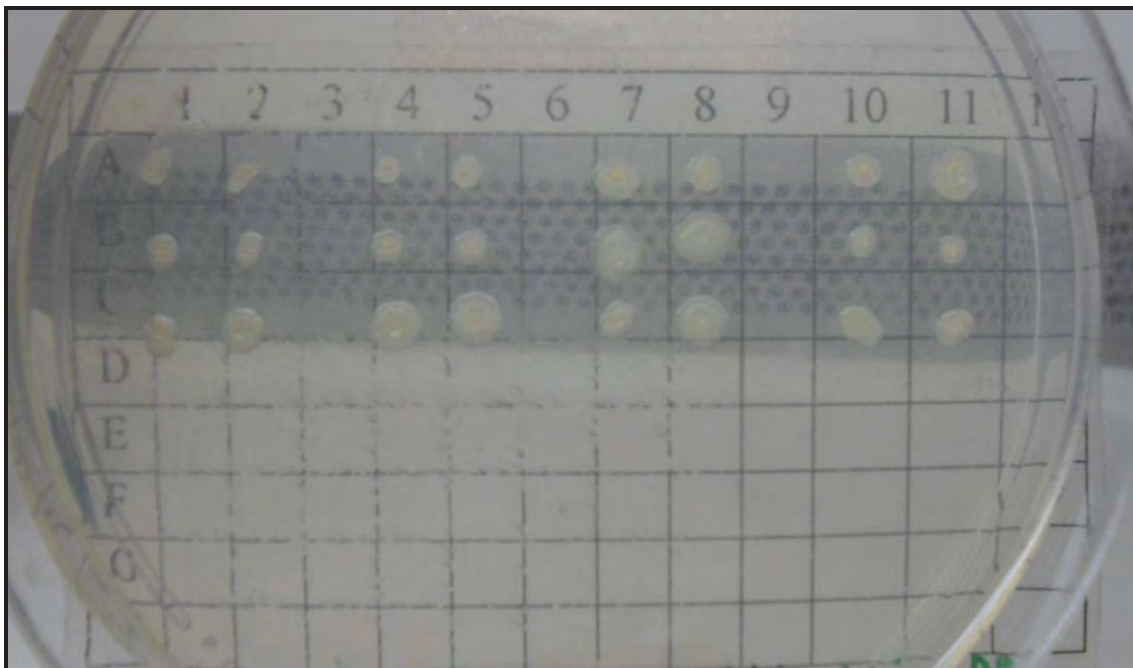


Figura 17. Representação do plaqueamento realizado para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

4.2 Ensaio Checkerboard

Os melhores resultados dos ensaios de microdiluição foram obtidos com o extrato de raiz de *A. brachypoda* para *S. aureus*. A partir disso foi testado este extrato em combinação com a amoxicilina, antimicrobiano de primeira escolha no tratamento de infecções causadas pelo *S. aureus*, para analisar seu efeito sinérgico pelo método Checkerboard.

O extrato testado isoladamente apresentou CIM de 15,6µg/mL e a amoxicilina de 0,015µg/mL. Quando testadas em combinação o extrato apresentou CIM de 3,9µg/mL e a amoxicilina de 0,0005µg/mL, comprovando assim seu efeito sinérgico ($ICIF \leq 0,5$) mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Efeito sinérgico do extrato de raiz com amoxicilina contra *S. aureus*

Micro-organismo	Substância-teste	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		CIF	ICIF	Resultado
		Sozinho	Combinado			
<i>S. aureus</i>	ERAb	15,6	3,9	0,25	0,28	Sinérgico
	AMOX	0,015	0,0005	0,033		

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionada; ERAb: Extrato de raiz de *A. brachypoda*; AMOX: amoxicilina.

4.3 Ensaio Time-Kill

O ensaio Time-Kill foi realizado com o extrato de raiz de *A. brachypoda* para determinar em quanto tempo o extrato age inibindo o crescimento de *S. aureus*. Estes resultados estão apresentados na Figura 18.

Como resultado deste teste foi observado que entre 6 e 12 horas, o extrato de raiz inibiu completamente o crescimento de *S. aureus*. O controle positivo (amoxicilina) também apresentou redução máxima de crescimento entre 6 e 12 horas.

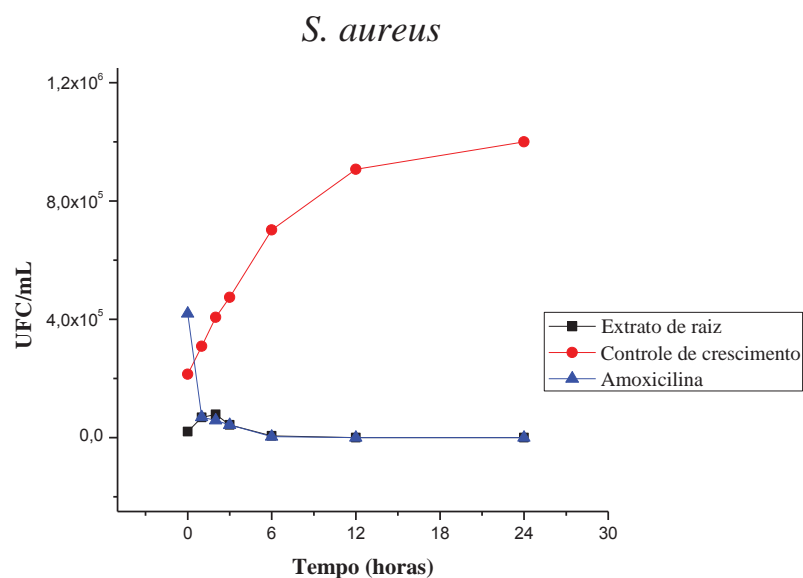


Figura 18. Atividade antibacteriana do extrato de raiz de *A. brachypoda* (15,6 $\mu\text{g/mL}$) frente *S. aureus* pelo ensaio Time-Kill. [Controle de crescimento: CMH + *S. aureus*; Controle positivo: amoxicilina (20 $\mu\text{g/mL}$)]

5. DISCUSSÃO

As plantas apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas, o que justifica o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir destas fontes naturais (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2003; BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2010). Extratos, frações e compostos isolados extraídos destas fontes têm sido estudados por pesquisadores por mostrarem significativas propriedades, entre estas a antimicrobiana (DUARTE et al., 2005; MARTINI et al., 2009; SILVA Jr. et al., 2009; ALBERNAZ et al., 2010; COGO et al., 2010; HÖFLING et al., 2010).

A família Bignoniaceae é dotada de plantas com atividades como antitérmicos, antivirais, citotóxicos, anti-inflamatórios, antibacterianos, antifúngicos, antiparasitários, antimaláricos, antirreumáticos, antidiarreicos e anticancerígenos (GARCIA, 2008; BRANDÃO et al., 2010). Dentre estas, ressalta-se a ação antimicrobiana de *T. avellanedaea* (ipê roxo) e *Tabebuia serratifolia* (ipê-do-cerrado) (OLIVEIRA et al., 1990). Estudos relataram ainda que as folhas de *Tabebuia obtusifolia* apresentam atividade específica contra *C. sphaerospermum* (AGRIPINO et al., 2004).

Este é um estudo pioneiro na determinação do perfil antibacteriano de *Arrabidaea brachypoda*. Os resultados mostraram que todos os extratos apresentaram atividade para *P. aeruginosa* e somente o extrato de raiz para *S. aureus*. Dentre as frações e compostos isolados, o composto G5 (rutina) apresentou atividade tanto para *P. aeruginosa* quanto para *S. aureus*.

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis e colaboradores (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6mg/mL são inibidores fracos. Enquanto Webster e colaboradores (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1000µg/mL ou

menos. Seguindo a primeira classificação, os extratos de raiz, caule e folha de *A. brachypoda* são inibidores moderados com CIM = 1000µg/mL para *P. aeruginosa* e o extrato de raiz é um inibidor potente para *S. aureus* com CIM = 15,6µg/mL. Adicionalmente, todos estes resultados são satisfatórios (com CIM ≤ 1000µg/mL) segundo Webster e colaboradores.

Esta atividade demonstrada com os extratos de raiz de *A. brachypoda* estimulou o estudo com as frações (DCM e aquosa) e compostos isolados (G4, G5 e RAB-3). Os compostos isolados foram testados somente para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, enquanto as frações foram para todos os micro-organismos utilizados nesta pesquisa. Destes, o único que apresentou atividade antimicrobiana foi o composto G5 (rutina), para ambos os micro-organismos testados, com CIM = 1000µg/mL, sendo considerado um inibidor moderado. A atividade apresentada pelo extrato de raiz para *P. aeruginosa* pode estar associada a rutina, pois quando testada isoladamente apresentou o mesmo valor de CIM (1000µg/mL). A ausência de atividade apresentada pelas frações pode ser explicada pela presença de outros compostos os quais inibiram a atividade da rutina.

A Rutina ou vitamina P, como antigamente era denominada, é um flavonol glicosídico pertencente a uma importante classe de flavonoides, sendo encontrada na natureza, em frutas, vegetais, sementes, ervas, especiarias, caules, folhas e bebidas como chá e vinho. Também apresenta grande importância terapêutica por melhorar a resistência e permeabilidade dos vasos capilares, atividades antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica dentre outras (BECHO et al., 2009). Han (2009) comprovou a eficiência no tratamento da artrite causada por *C. albicans* e atividade anti-*Candida*. Segundo Martini e colaboradores (2009) a rutina possui atividade para algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que nos leva a supor que esta

possa ser a substância bioativa do extrato de raiz que apresentou atividade frente a *P. aeruginosa* e quando testada isoladamente reafirma esta atividade.

A atividade antibacteriana de flavonoides é comprovada por muitos autores (COWAN, 1999; CUSHNIE et al., 2005; CUSHNIE & LAMB, 2011). Cushnie e Lamb (2011) propõem que esta atividade dos flavonoides está relacionada a danos na membrana citoplasmática (causada por perfuração e/ ou redução da fluidez da membrana), inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase) e inibição do metabolismo energético (causada pela inibição da NADHcitocromo C redutase). O efeito inibitório dos flavonoides contra microorganismos pode ser também, da interação deste com a membrana celular dos microorganismos alvo, provavelmente devido à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares e com a parede celular (COWAN, 1999).

Os resultados obtidos com o composto G5 (rutina) são portanto coerentes com os dados da literatura, uma vez que a rutina é um flavonoide.

A microdiluição é uma técnica muito utilizada na determinação da atividade antimicrobiana. É sensível, de alto rendimento, na qual possibilita a análise de pequenas amostras sendo esta uma das principais vantagens da sua utilização quando se refere a amostras vegetais. Permite utilizar mais de uma amostra e diferentes microorganismos em um mesmo ensaio. Adicionalmente, possibilita resultados quantitativos e a concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos em estudo (ELOFF et al., 1998; COWAN, 1999; GABRIELSON et al., 2002; LANGFIELD et al., 2004; CUSHNIE & LAMB, 2005; ALVES et al., 2008; OSTROSKY et al., 2008; SALAZAR-ARANDA et al., 2009; PALOMBO, 2011).

Há muitos fatores naturais, como radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, temperatura, solo, nutrientes e estação do ano que influenciam no

metabolismo e na produção de metabólitos e ainda fatores artificiais, como poluentes podem interferir fazendo com que a planta produza maior quantidade de metabólitos secundários, incluindo flavonoides, como mecanismo de defesa contra patógenos como vírus, bactérias, fungos e insetos (BECHO et al., 2009; SILVA Jr. et al., 2009). Em períodos de chuva, os compostos mais polares são eliminados da planta por lixiviação (BECHO et al., 2009).

Estes fatores ambientais, assim como a metodologia empregada, influenciam nos resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos.

Os resultados obtidos neste estudo com os extrativos, frações e compostos isolados de raiz frente ao *S. aureus*, possibilitam afirmar que houve uma diminuição gradativa da bioatividade das frações e compostos isolados, quando comparada ao valor de CIM do extrato. Pauletti e colaboradores (2003) relacionam alguns fatores como a perda de atividade durante a separação cromatográfica e ao sinergismo dos compostos, os quais podem influenciar nos resultados da atividade antimicrobiana. Esta afirmação permite supor que a atividade observada neste estudo seja devido ao sinergismo de compostos bioativos presentes nos extrativos, justificado pela atividade apresentada pelo extrato de raiz com CIM = 15,6µg/mL. A rotina (composto G5) apresentou CIM = 1000µg/mL e as frações não apresentam atividade, possivelmente pela presença de outros compostos nas frações que tenham inibido a atividade da mesma.

Alcerito e colaboradores (2002) isolaram da *A. brachypoda* quatro flavonas de cera das folhas, sendo estes: o cirsililol, o cirsimaritin, a hispidulina e a 3',4'-di-hidroxi-5,6,7-trimethoxyflavone. Estes autores comprovaram a atividade antifúngica destes compostos contra *Cladosporium sphaerospermum* pela técnica de autobiografia.

Outros estudos com *A. brachypoda* comprovaram sua ação antiviral (BRANDÃO et al., 2010), leishmanicida (PAVAN et al., 2010; ALVES & PEREIRA, 2011), anti-inflamatória e antinociceptiva (ROCHA et al., 2011).

A investigação fitoquímica de *Arrabidaea samyoides* resultou no isolamento do lupeol, sitosterol, estigmasterol, crisina, $3\beta,16\alpha$ -diidroxi-olean-12-eno, eritrodíol, uvaol, ácido ursólico e triterpenos (PAULETTI et al., 2003). Esta possui o ácido ursólico e triterpenos que são compostos comuns a *A. brachypoda*, embora os triterpenos, assim como os flavonoides sejam específicos do gênero.

Uma grande diversidade de vegetais, normalmente utilizados como alimentos ou com aplicação medicinal, apresenta ácidos triterpênicos em sua constituição química, tanto na forma livre, quanto na forma de agliconas, de saponinas triterpenoides. De acordo com a espécie da qual foram isoladas, as estruturas destes metabólitos usualmente variam entre os esqueletos ursano, oleonano e lupano, contendo normalmente um ou dois grupos hidroxilas. Os ácidos triterpênicos mono-hidroxilados (oleanólico, ursólico e betulínico) foram muito investigados quanto ao seu amplo espectro de atividades biológicas, onde se destacam as atividades: anti-inflamatória, antineoplásica, antivirótica, antimicrobiana, antiparasitária, hepatoprotetora e outras. Estes ácidos apresentam uma baixa ou nenhuma toxicidade, sendo, inclusive, utilizados como aditivos em bebidas, alimentos e em cosméticos (FRIGHETTO et al., 2005).

No presente estudo não foi demonstrada atividade das amostras vegetais contra *C. albicans*.

É importante, no entanto, a continuidade nos estudos com esta espécie vegetal partindo-se de outros métodos extrativos e/ou o emprego de outros solventes para obtenção de extrativos que possam ter outros componentes químicos ou em concentrações distintas dos extrativos utilizados neste estudo.

Estudos com a *A. chica*, por exemplo, foram isolados taninos, 7,4-dihidroxi-5-metoxiflavona, fitosteróis, flavonóides, pigmentos utilizados em cosméticos, compostos derivados das 3-deoxiantocianidinas e a carajuruflavona (PAULETTI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009). Em outro estudo com o extrato etanólico de folhas desta planta, foi verificado ausência de atividade frente a *C. albicans* (BARBOSA et al., 2008), enquanto ainda um outro estudo comprovou uma forte atividade do extrato diclorometânico para *C. albicans* e ausência de atividade para o extrato metanólico (HÖFLING et al., 2010).

A controvérsia apresentada entre esses dados da literatura demonstram a importância do processo de extração bem como do solvente utilizado na obtenção e preparo dos extrativos vegetais.

Para determinar um composto biologicamente ativo a partir de um material vegetal é necessário buscar um solvente mais polar ou apolar, dependendo da natureza do composto. Baixa toxicidade, facilidade de evaporação a baixa temperatura, absorção fisiológica rápida do extrato, ação conservante e incapacidade de fazer com que o extrato se dissocie ou torne um complexo são algumas características de um bom solvente (DAS et al., 2010).

O método Checkerboard é um ensaio *in vitro* o qual analisa o efeito de combinações de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação distintos no crescimento bacteriano (JACKSON et al., 2009). A terapia de combinação pode ser utilizada para expandir o espectro antimicrobiano, para evitar o surgimento de organismos resistentes, para minimizar a toxicidade, e para se obter a atividade antimicrobiana sinérgica (KUMAR et al., 2012).

Os resultados obtidos neste estudo pelo ensaio Checkerboard foram interessantes uma vez que quando testados em combinação, o extrato de raiz e a

amoxicilina, a Concentração Inibitória Mínima foi inferior ($CIM_{ERAb\ comb} = 3,9\mu\text{g/mL}$ e $CIM_{AMOX\ comb} = 0,0005\mu\text{g/mL}$) do que quando testadas isoladamente ($CIM_{ERAb} = 15,6\mu\text{g/mL}$ e $CIM_{AMOX} = 0,015\mu\text{g/mL}$). Isso significa que no tratamento para *S. aureus* a dose terapêutica do antimicrobiano (amoxicilina) combinado com o extrato vegetal poderá ser menor, retardando assim o desenvolvimento de resistência ao micro-organismo e melhorando o resultado da terapia.

Esses valores são expressos em índice de concentração inibitória fracionada, calculados por uma equação, sendo que valores ≤ 5 indicam uma interação sinérgica, sendo que o grau de sinergismo aumenta quando o valor tende para zero (JACKSON et al., 2009). Baseando-se nesta informação, o resultado obtido da associação do extrato com a amoxicilina foi de uma interação sinérgica. Há outros estudos que demonstram sinergismo como a associação de estilbenos e ciprofloxacino (KUMAR et al., 2012), de triterpenoides pentacíclicos e os antibióticos metilicina e vancomicina (CHUNG et al., 2011), de silibinina e ampicilina ou gentamicina (LEE et al., 2012), da tomatidina e antibióticos aminoglicosídeos (gentamicina, canamicina, tobramicina, amicacina e estreptomicina) (MITCHELL et al., 2011), entre outros.

O ensaio Time-Kill é um teste na qual se determina o tempo em que a substância-teste impede o desenvolvimento do micro-organismo testado. Ele fornece a dinâmica de ação desta substância e sua interação com o tempo (ELIOPOULOS & ELIOPOULOS, 1988; ELIOPOULOS & MOELLERING Jr, 1996). Neste estudo foi realizado o Time-Kill do extrato de raiz para *S. aureus* e como controle a amoxicilina, antibiótico de primeira escolha no tratamento de doenças relacionadas ao *S. aureus*. O resultado foi significativo, pois inibiu completamente o crescimento do micro-organismo entre 6 e 12 horas. Há muitos estudos na literatura os quais realizam este ensaio para substâncias que ao serem testadas anteriormente pelo Checkerboard

apresentaram sinergismo, ou seja, tiveram sua atividade potencializada, e seus resultados são comparados com os testes realizados com as substâncias isoladamente (MITCHELL et al., 2011; KUMAR et al., 2012; LEE et al., 2012).

As principais razões para o enorme interesse em investigar e identificar compostos de origem vegetal e suas atividades biológicas são justificadas pela vasta gama de substâncias presentes nas plantas que podem ser usadas para tratar infecções crônicas bem como doenças infecciosas, aumento da resistência microbiana aos medicamentos, presença de efeitos colaterais nos medicamentos sintéticos, segurança e eficácia com menor efeito adverso de medicamentos produzidos a partir de fontes naturais, o custo da terapia bem como o aumento de doenças emergentes (ALBERNAZ et al., 2010; ABDOLLAHZADEH et al., 2011; SASIDHARAN et al., 2011; SILVA et al., 2012) . Este trabalho demonstrou o potencial antimicrobiano de *A. brachypoda* em especial contra *S. aureus* devido a importância desse micro-organismo para a Saúde Pública. O conhecimento da atividade antimicrobiana é importante para determinar o perfil biológico da planta e para estudos futuros que visam a obtenção de um novo fitoterápico ou mesmo um medicamento sintético produzido a partir de seus compostos.

6. CONCLUSÕES

- *A. brachypoda* apresenta potencial como antibacteriano;
- O extrato hidroalcoólico de raiz de *A. brachypoda* mostrou ser um potente inibidor de *Staphylococcus aureus*;
- Os extratos hidroalcoólicos de raiz, caule e folha de *A. brachypoda* apresentaram moderada atividade anti-*Pseudomonas aeruginosa*;
- O composto G5 (rutina) apresentou moderada atividade antibacteriana frente a *P. aeruginosa* e *S. aureus*;
- Os extratos e frações de *A. brachypoda* não apresentaram atividade anti-*Helicobacter pylori*;
- O extrato de raiz de *A. brachypoda* combinado com a amoxicilina apresentou um efeito sinérgico para *S. aureus*;
- A atividade anti-*S. aureus* do extrato de raiz de *A. brachypoda* foi confirmada e determinada pelo ensaio Time-Kill.

7. REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, S.H.; MASHOUF, R.Y.; MORTAZAVI, H.; MOGHADDAM, M.H.; ROOZBAHANI, N.; VAHEDI, M. Antibacterial and antifungal activities of *Punica granatum* peel extracts against oral pathogens. **Journal of Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2011.

AGRIPINO, D.G.; LIMA, M.E.L.; SILVA, M.R.; MEDA, C.I.; BOLZANI, V.S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R.H. Screening of brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest. Ecological station Juréia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, 2004. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v4n2/pt/abstract?article+BN03804022004>. Acesso em: 8 out. 2012.

ALBERNAZ, L.C. **Substância antimicrobiana de amplo espectro de *Tabebuia caraiba***. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plants extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.

ALCERITO, T.; BARBO, F.E.; NEGRI, G. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 7, p. 677-683, 2002.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ALVES, L.; PEREIRA, I.O. Avaliação da atividade leishmanicida de extratos obtidos de diferentes partes de *Arrabidaea brachypoda*. **Revista Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, p. 42-42, 2011.

BARBOSA, W.L.R.; PINTO, L.N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J.M.S.; SILVA JR., J.O.C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 544-548, 2008.

BECHO, J.R.M.; MACHADO, H., GUERRA, M.O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.

BERENBAUM, M.C. A method for testing synergy with any number of agents. **Journal Infections Diseases**, v. 137, p. 122-130, 1978.

BLATT, C.T.T.; SANTOS, M.S.; SALATINO, A. Flavonoids of bignoniaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. **Plant Systematics and Evolution**, v. 210, n. 3-4, p. 289-292, 1998.

BONACORSI, C.; RADDI, M.S.G.; CARLOS, I.Z.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 2, p. 1-7, 2009.

BRANDÃO, G.C.; KROON, E.G.; DOS SANTOS, J.R.; STEHMANN, J.R.; LOMBARDI, J.A.; OLIVEIRA, A.B. Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil). **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 469-476, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **SUS financia seis novos fitoterápicos**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10896. Acesso em: 14 abr. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA 2004. **Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004**. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=10230>. Acesso em: 02 ago. 2012.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003. 239 p.

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

BURGER, O.; OFEK, I.; TABAK, M.; WEISS, E.I.; SHARON, N.; NEEMAN, I. A high molecular mass constituent of cranberry juice inhibits *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 295-301, 2000.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CHUNG, P.Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L.Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 25, p. 1-6, 2011.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standards- 8th ed. Document M2-A8 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2005.

CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th 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**. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards- 6th ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006a.

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.

COGO, L.L.; MONTEIRO, C.L.B.; MIGUEL, O.G.; CUNICO, M.M.; RIBEIRO, M.L.; CAMARGO, E.R.; KUSSEN, G.M.B.; NOGUEIRA, K.S.; COSTA, L.M.D. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 304-309, 2010.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids – Review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DRAGO, L.; VECCHI, E.; NICOLA, L.; GISMONDO, M. R. *In vitro* evaluation of antibiotics combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infections Diseases**, v. 111, p. 1-7, 2007.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

ELIOPOULOS, G.M.; ELIOPOULOS, C.T. Antibiotic combinations: should they be tested? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p. 139-156, 1988.

ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING Jr, R.C. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. (Ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4th ed. Baltimore, Williams and Wilkins, Md: 1996. p. 330-396.

ELOFF, J.N. A Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: Fiocruz, 2010, v. 1, p. 236-253.

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R.M.; SILVA, A.M.P.; NAKAMURA, M.J.; SIANI, A.C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 338-343, 2005.

FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D.A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

FUNATOGAWA, K.; HAYASHI, S.; SHIMOMURA, H.; YOSHIDA, T.; HATANO, T.; ITO, H.; HIRAI, Y. Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 251-261, 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. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

GARCIA, F. **Estudo fitoquímico da fração AcOEt do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea brachypoda* (DC) Bureau – Bignoniaceae e atividades antioxidante e inibitória da enzima mieloperoxidase das substâncias isoladas.** 2008. 101f.

Dissertação (Mestrado em Química na Área de Química Orgânica) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

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

GUDIÑA, E.J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. Paracasei A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 2, p. 207-211, 2009.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 411-413, 1999.

HIRATA, J.; CHUNG, L.P.; ARIESE, F.; IRTH, H.; GOOIJER, C. Coupling of size-exclusion chromatography to a continuous assay for Subtilisin using a fluorescence resonance energy transfer peptide substrate: Testing of two standard inhibitors. **Journal of Chromatography**, v. 1081, n. 2, p. 140-144, 2005.

HÖFLING, J.F.; ANIBAL, P.C.; OBANDO-PEREDA, G.A.; PEIXOTO, I.A.T.; FURLETTI, V.F.; FOGGIO, M.A.; GONÇALVES, R.B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1065-1068, 2010.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V.F.; SANTOS, A.J.R.W.A.; WESTPHALEN, A.B.; INGLESIAS, B.A.; MARTINS, P.R.; AMARAL, C.H.; MICHELOT, T.M.; REETZ, L.G.B.; BERTONCHELI, C.M.; PARAGINSKI, G.L.; HORNER, R. Triazenos e

atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

JABOUR, F.F.; SEIXAS, J.N.; TOKARNIA, C.H.; BRITO, M.F. Variação da toxidez de *Arrabidaea bilabiata* (Bignoniaceae) em coelhos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 171-176, 2006.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.

KIM, K.T.; MOON, S.H.; YEO, E.J.; PARK, Y.S.; HAN, Y.S.; NAH, S.Y.; LEE, N.G.; PAIK, H.D. Inhibitory effect of 7-Obutyl naringenin on growth of *Helicobacter pylori* ATCC 26695. **Food Science and Biotechnology**, v. 15, p. 466-468, 2006.

KUMAR, S.N.; SIJI, J.V.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 3143-3150, 2012.

LADEIRA, M.S.P.; SALVADORI, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 335-342, 2003.

LANGFIELD, R.D.; SCARANO, F.J.; HEITZMAN, M.E.; KONDO, M.; HMMOND, G.B.; NETO, C.C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 279-281, 2004.

LEE, Y.S.; JANG, K.A.; CHA, J.D. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

LIMA, Z.P.; CALVO, T.R.; SILVA, E.F.; PELLIZZON, C.H.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A. Brazilian medicinal plant acts on prostaglandin level and *Helicobacter pylori*. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 701-708, 2008.

LIMA, C.S.A.; AMORIM, E.L.C.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; NUNES, X. P.; AGRA, M. F.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, M. J. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n.1, p. 77-81, 2003.

LIN, Y.T.; KWON, Y.I.; LABBE, R.G.; SHETTY, K. Inhibition of *Helicobacter pylori* and associated urease by oregano and cranberry phytochemical synergies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8558–8564, 2005.

MAREGESI, S.M.; PIETERS, L.; NGASSAPA, O.D.; APERS, S.; VINGERHOETS, R.; COS, P.; BERGHE, D.A.V.; VLIETINCK, A.J. Screening os some tanzanian medicinal plants from bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 58-66, 2008.

MARTINI, S.; D'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. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 50-59, 2009.

MAZZOLIN, L.P.; NASSER, A.L.M.; MORAES, T.M.; SANTOS, R.C.; NISHIJIMA, C.M.; SANTOS, F.V.; VARANDA, E.A.; BAUAB, T.M.; ROCHA, L.R.M.; DI STASI, L.C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Qualea parviflora* Mart.: An integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 508-514, 2010.

MENDONÇA, S.; ECCLISSATO, C.; SARTORI, M.S.; GODOY, A.P.; GUERZONI, R.A.; DEGGER, M.; PEDRAZZOLI JR., J. Prevalence of *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole, clarithromycin, amoxicillin, tetracycline, and furazolidone in Brazil. **Helicobacter**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 2000.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D.L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MARSAULT, E.; BOUARAB, K.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 559- 568, 2012.

MORAIS, H.P. **Avaliação “in vitro” da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonima* spp e *Alchornea* spp**: Estudos comparativos entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas. Araraquara, 2006. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

NAPOLITANO, D.R.; MOINEO, J.R.; SOUZA, M.A.; PAULA, J.E.; ESPINDOLA, L.S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.

NCCLS. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999.

NETO, C.C.; OWENS, C.W.; LANGFIELD, R.D.; COMEAU, A.B.; ST. ONGE, J.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 133–138, 2002.

NOHYNEK, L.J.; ALAKOMI, H.N.; KAHKONEN, M.P.; HEINONEN, M.; HELANDER, I.M.; OKSMAN-CALDENTEY, K.M.; PUUPPONEN-PIMIA, R.H. Berry Phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. **Nutrition and Cancer**, v. 54, n. 1, p. 18-32, 2006.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MIRAGLIA, M.C.M.; MESQUITA, A.A.L.; ZANI, C.L.; FERREIRA, D.T.; MAIA, J.G.S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniaceas brasileiras. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 302-307, 1990.

OLIVEIRA, F.Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, M.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na Odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.

OLIVEIRA, D.P.C.; BORRÁS, M.R.L.; FERREIRA, L.C.L.; LÓPEZ-LOZANO, J.L. Atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.)

B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 643-649, 2009.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PALOMBO, E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-15, 2011.

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

PAULETTI, P.M.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samyoides* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003.

PAVAN, A.L.R.; ROCHA, C.Q.; CODONHO, B.S.; PEREIRA, I.O.; SANTOS, M.H.; MARQUES, M.J. Avaliação da atividade leishmanicida de extratos de *Arrabidaea brachypoda*. **Revista Saúde – Universidade Federal de Alfenas**, v. 4, n. 1, p.105, 2010.

PILLAI, S.K.; MOELLERING, R.C. **Antimicrobial combinations**. Antibiotics in laboratory medicine. Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2005, p. 365-400.

RAHAL, J.J. Antibiotic combinations: the clinical relevance of synergy and antagonism. **Medicine**, v. 57, p. 179-195, 1978.

RAMADAN, M.A.; SAFWAT, N.A. Antihelicobacter activity of a flavonoid compound isolated from *Desmostachya bipinnata*. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 3, p. 2270-2277, 2009.

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

ROCHA, C.Q.; VILELA, F.C.; CAVALCANTE, G.P.; SANTA-CECÍLIA, F.V.; SANTOS-E-SILVA, L.; SANTOS, M.H.; GIUSTI-PAIVA, A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 396-401, 2011.

ROMERO, C.; MEDINA, E.; VARGAS, J.; BRENES, M.; DE CASTRO, A. In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 680-686, 2007.

ROZZA, A.L.; MORAES, T.M.; KUSHIMA, H.; TANIMOTO, A.; MARQUES, M.O.M.; BAUAB, T.M.; HIRUMA-LIMA, C.A.; PELLIZZON, C.H. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* (Rutaceae) essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock protein-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulfhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E₂. **Chemico-Biological Interactions**, v. 189, p. 82-89, 2011.

RUGGIERO, P.; TOMBOLA, F.; ROSSI, G.; PANCOTTO, L.; LAURETTI, L.; DEL GIUDICE, G.; ZORATTI, M. Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2550–2552, 2006.

SALAZAR-ARANDA, R.; PÉREZ-LÓPEZ, L.A.; LÓPEZ-ARROYO, J.; ALANÍS-GARZA, B.A.; TORRES, N.W. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-6, 2009.

SASIDHARAN, S.; CHEN, Y.; SARAVANAN, D.; SUNDRAM, K.M.; LATHA, L.Y. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SILVA JR., I.E.; CECHINEL FILHO, V.; ZACCHINO, S.A.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1b, p. 242-248, 2009.

SILVA, O.; VIEGAS, S.; MELLO-SAMPAYO, C.; COSTA, M.J.P.; SERRANO, R.; CABRITA, J.; GOMES, E.T. Anti-*Helicobacter pylori* activity of *Terminalia macroptera* root. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 872-876, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 5ª ed. Florianópolis: Editora UFRGS, 2004.

SIQUEIRA, J.S.; LIMA, P.S.S.; BARRETO, A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Aspectos gerais nas infecções por *Helicobacter pylori* – Revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 1, p. 9-13, 2007.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. *Helicobacter pylori* infection – Review Article. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, 2002.

VELÁZQUEZ, M.; FEIRTAG, J.F. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and more of transmission implicating foods and water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 95-104, 1999.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

WEBSTER, D.; TASCHEREAU, P.; BELLAND, R.J.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

WINDLE, H.J.P.; KELLEHER, D. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 8, p. 3132-3137, 1997.

8. ANEXOS

ANEXO 1

1. Materiais

1.1 Solventes, reagentes e meios de cultura

- ácido 3-[N-morfino] propanossulfônico (MOPS) – Sigma-Aldrich®
- agar Mueller-Hinton – Difco®
- agar Sabouraud dextrose – Acumedia®
- agar sangue – Biomérieux®
- amoxicilina – União Química®
- ampicilina – Sigma-Aldrich®
- anfotericina B – Sigma-Aldrich®
- caldo Mueller-Hinton – Difco®
- caldo Sabouraud dextrose – Difco®
- cloreto de sódio – J.T.Baker®
- cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) – Sigma®
- dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma Aldrich®
- etanol 96 – Merck®
- fosfato de sódio dibásico – J.T.Baker®
- fosfato de sódio monobásico – Reagen®
- fluconazol – Sigma-Aldrich®
- glicerol – Sigma-Aldrich®

- glicose – Ecibra®
- hidróxido de sódio – Merck®
- meio RPMI-1640 – Sigma-Aldrich®
- Omeprazol – Sigma-Aldrich®
- resazurina – Sigma-Aldrich®
- RPMI 1640 – Sigma-Aldrich®
- Soro fetal bovino – Cultilab®
- Tween 80 – Sigma-Aldrich®

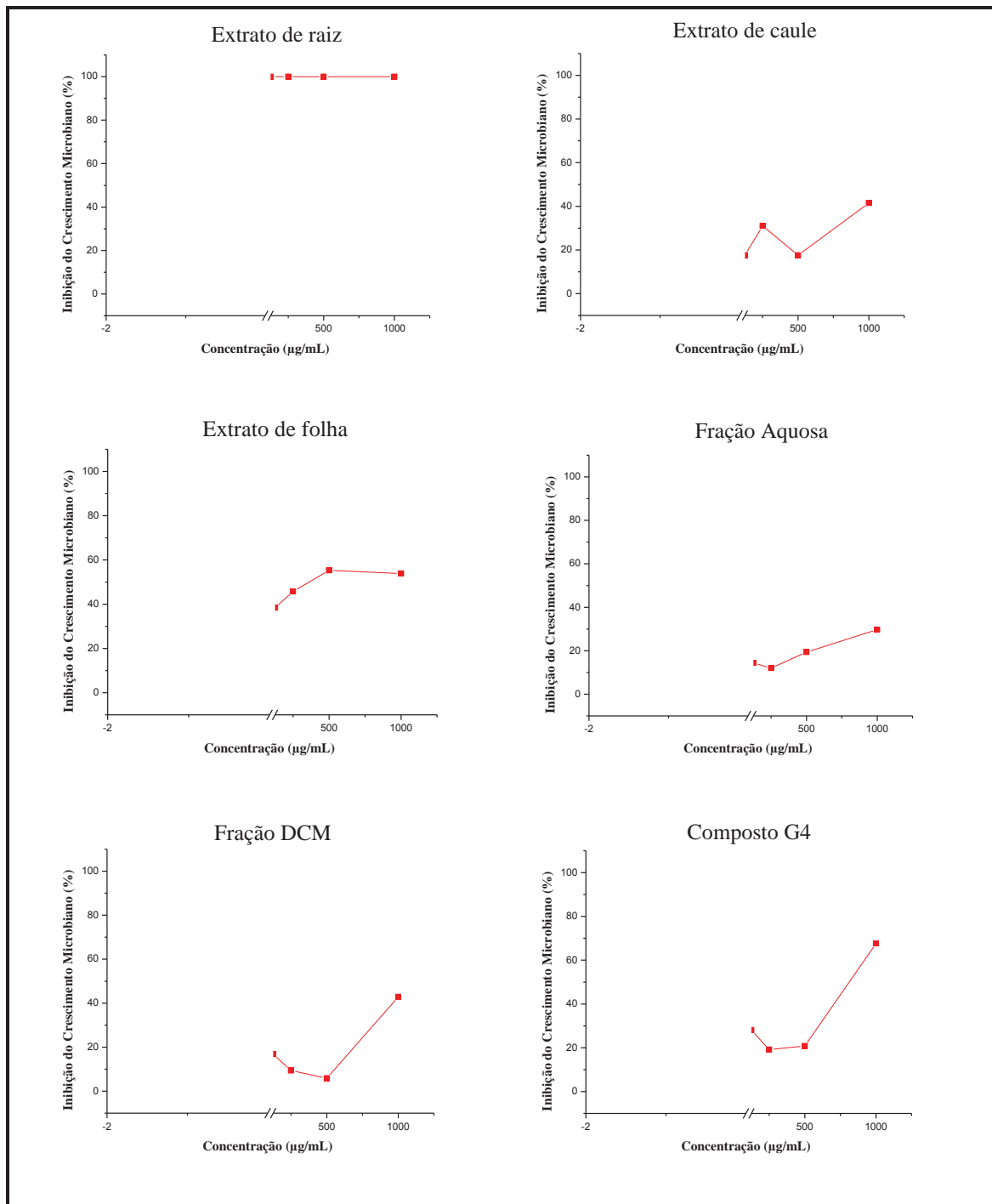
1.2 Equipamentos

- Autoclave vertical – Phoenix®
- Balança analítica – Shimadzu®
- Bomba de vácuo – Motores Elétricos Brasil®
- Câmara de fluxo laminar – Veco®
- Câmara de Neubauer – Boeco® Germany
- Espectrofotômetro – Pharmacia®
- Estufa de incubação bacteriológica – Fanem®
- Estufa de incubação CO₂ – Forma Scientific®
- Leitor de microplacas – Termoplate®
- Microscópio – Olympus CH20®
- Peagômetro – Marconi®
- Purificador de água destilada – Millipore®
- Purificador de água mili-Q – Millipore®

- Ultrassom – Thornton®
- Agitador de tubos – Phoenix®

ANEXO 2

Inibição de crescimento microbiano e seus respectivos controles.



Cont.

Cont.

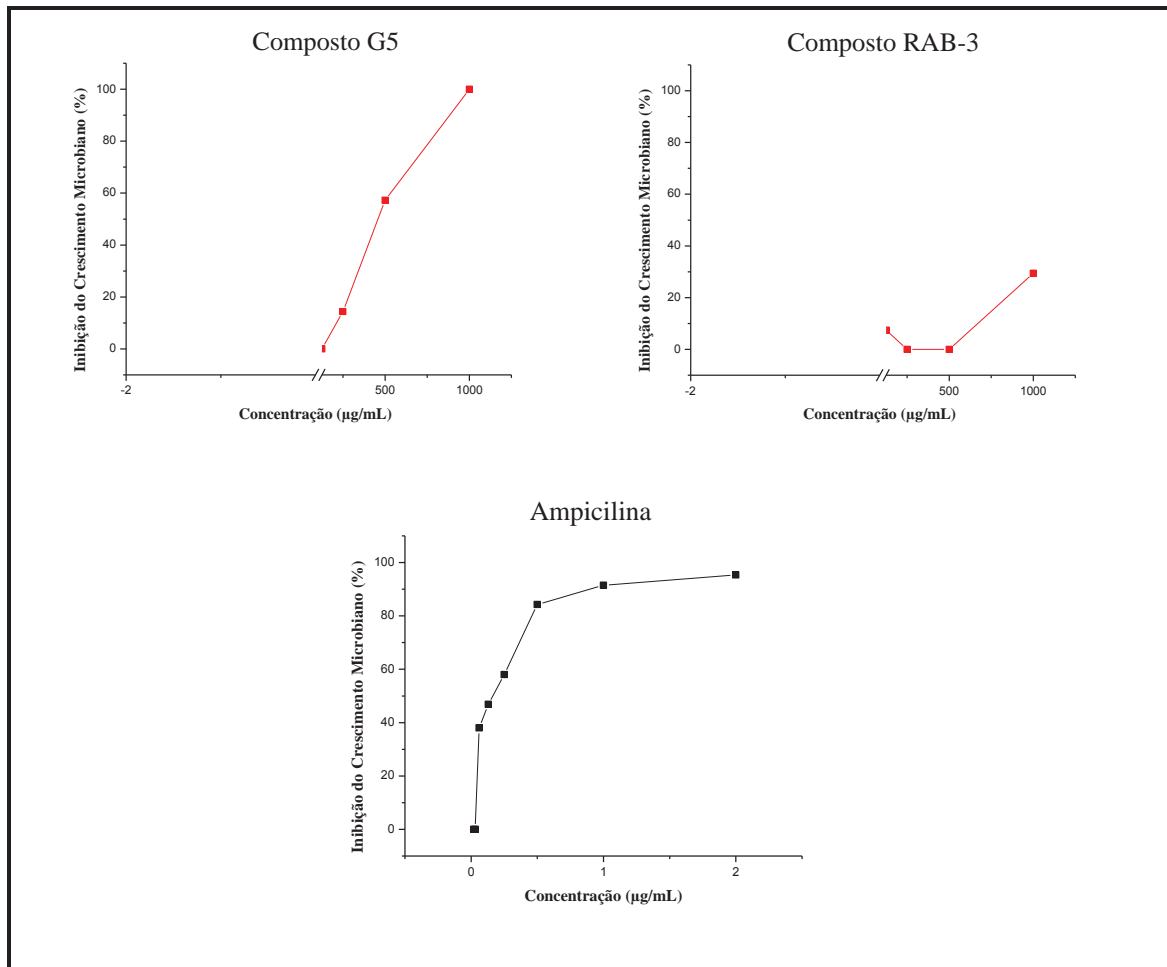


Figura 19. Inibição do crescimento de *S. aureus* para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de *A. brachypoda* e o seu respectivo controle.

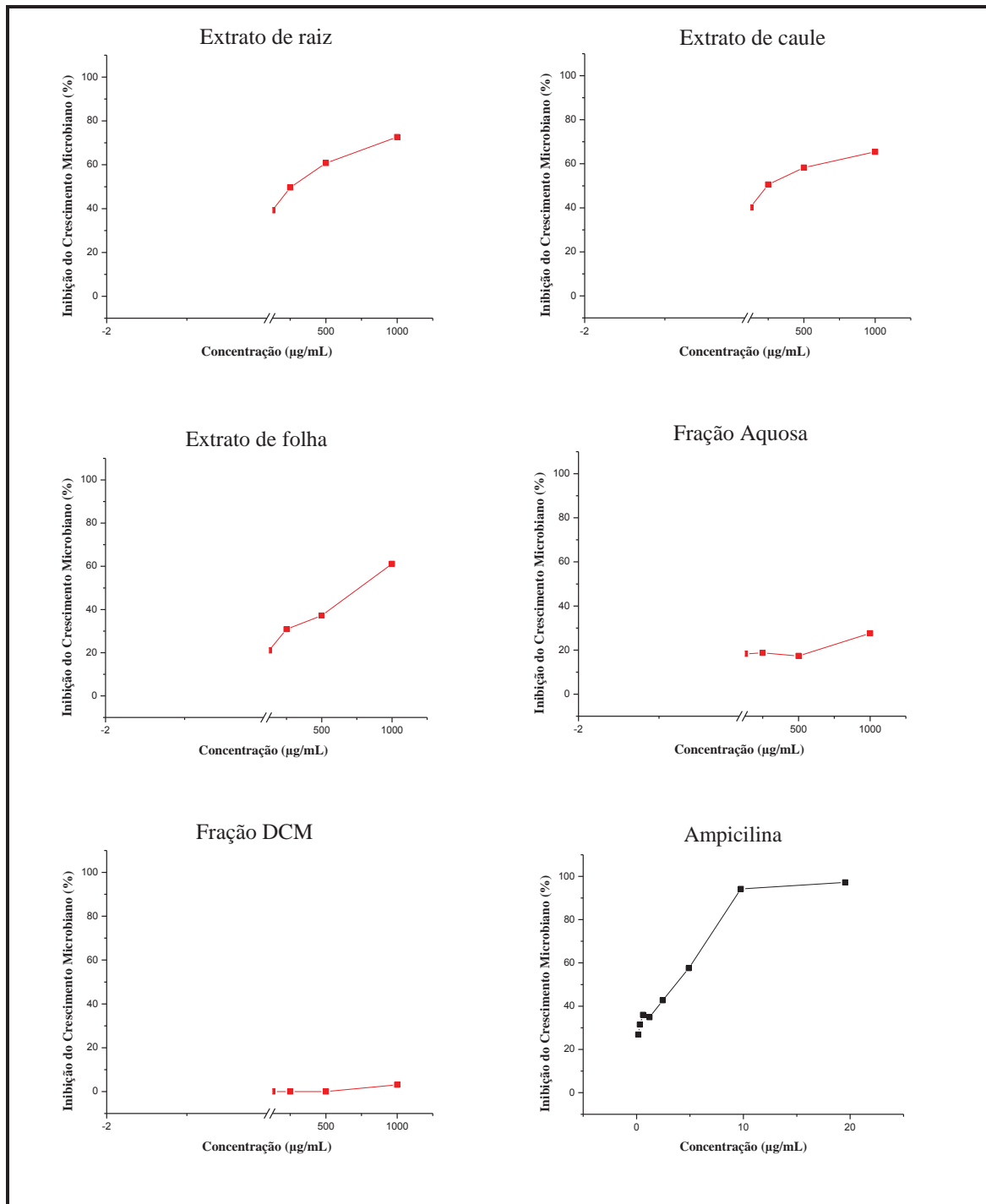


Figura 20. Inibição do crescimento de *E. coli* para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de *A. brachypoda* e o seu respectivo controle.

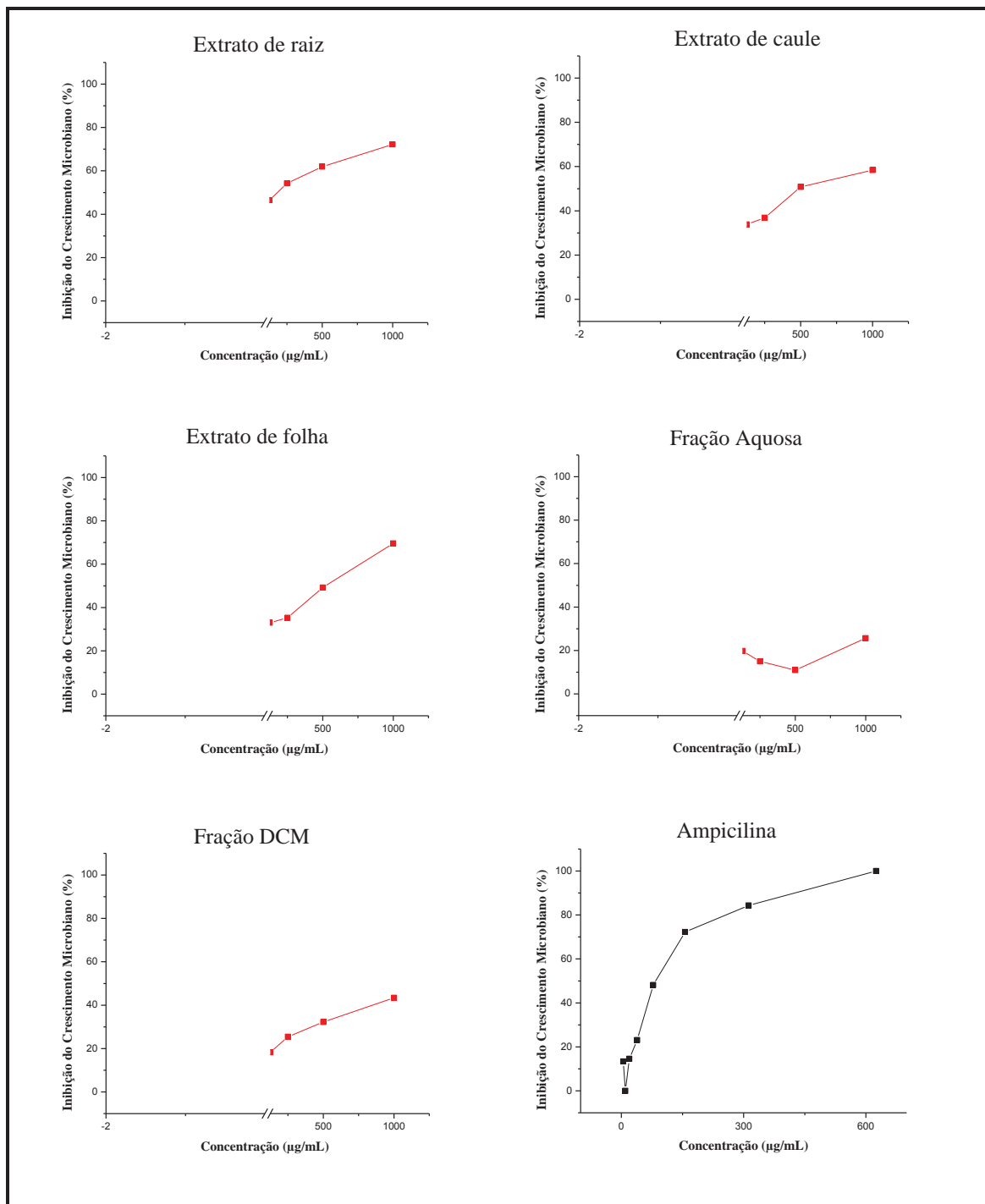
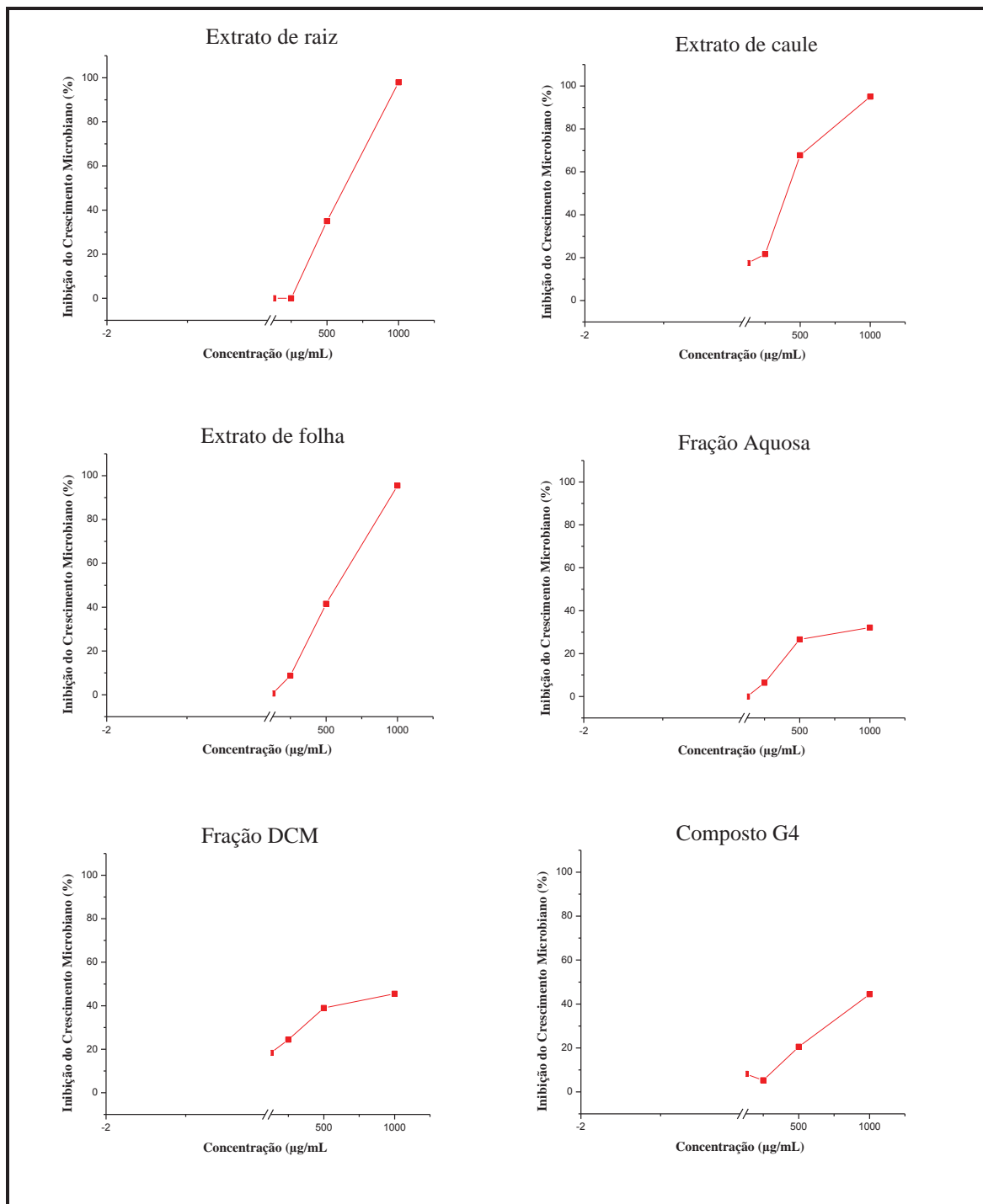


Figura 21. Inibição do crescimento de *S. setubal* para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de *A. brachypoda* e o seu respectivo controle.



Cont.

Cont.

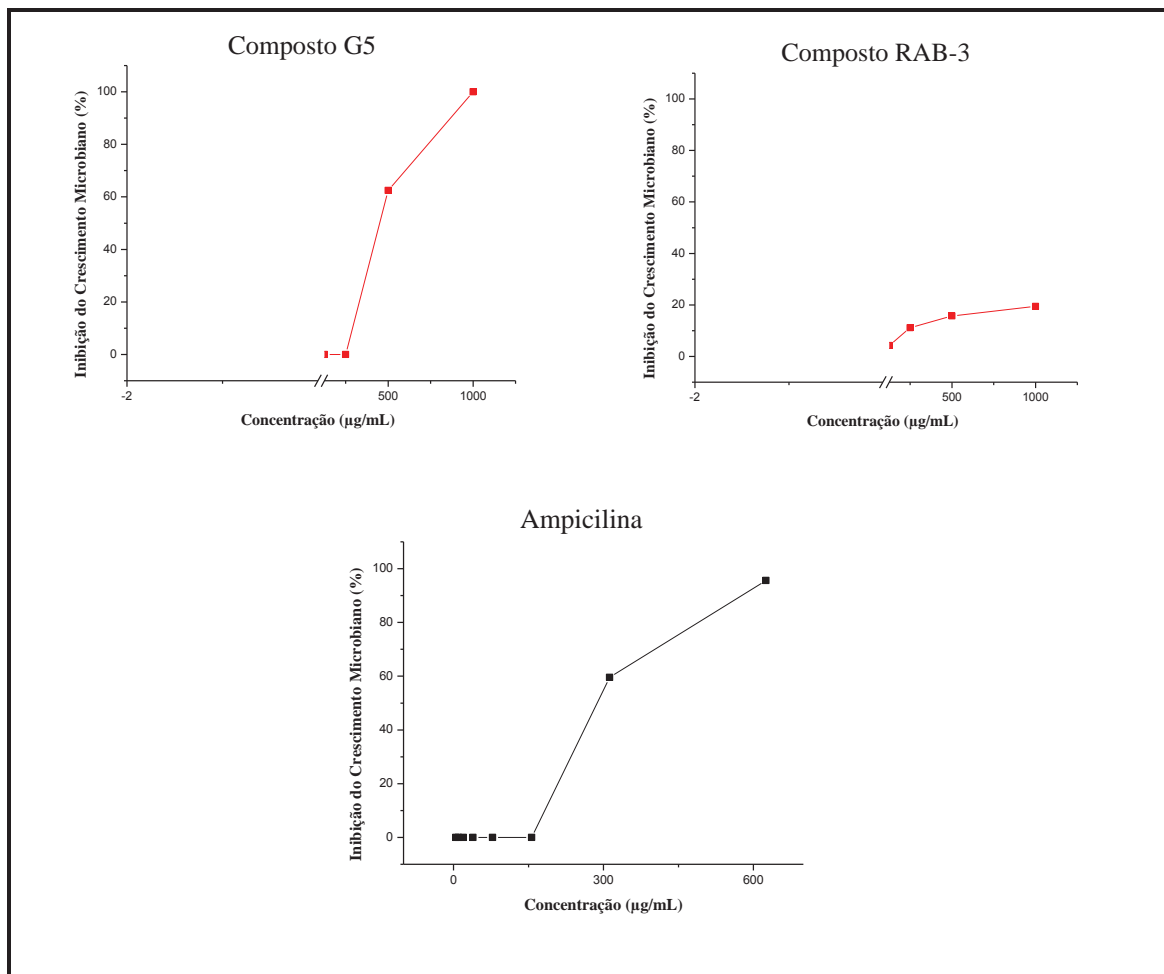
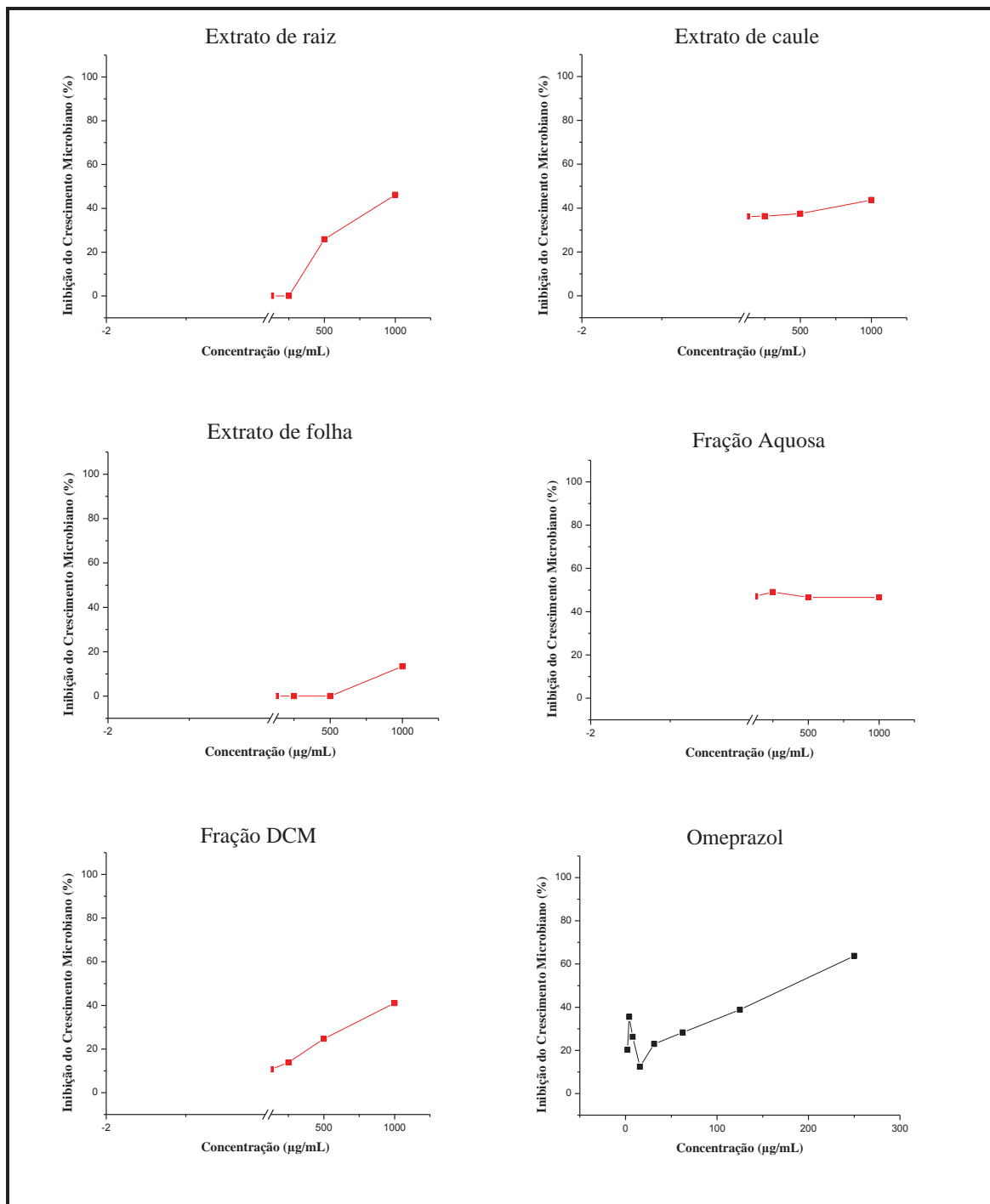


Figura 22. Inibição do crescimento de *P. aeruginosa* para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de *A. brachypoda* e o seu respectivo controle.



Cont.

Cont.

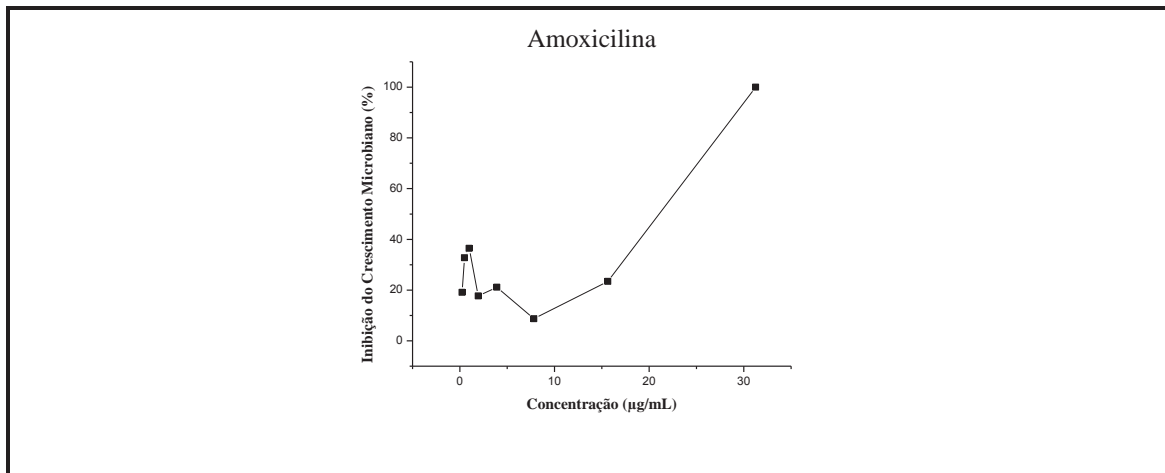
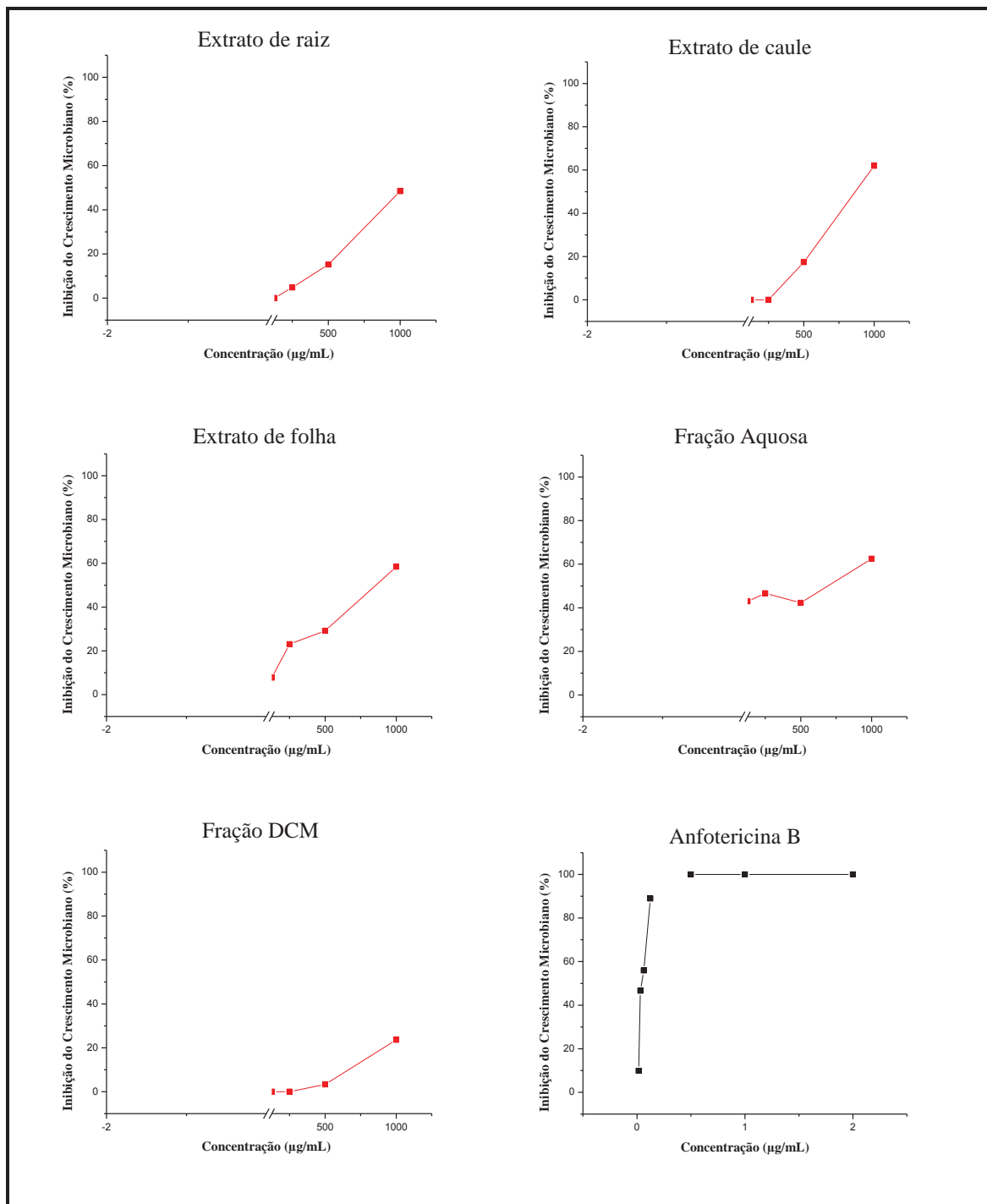


Figura 23. Inibição do crescimento de *H. pylori* para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de *A. brachypoda* e o seu respectivo controle.



Cont.

Cont.

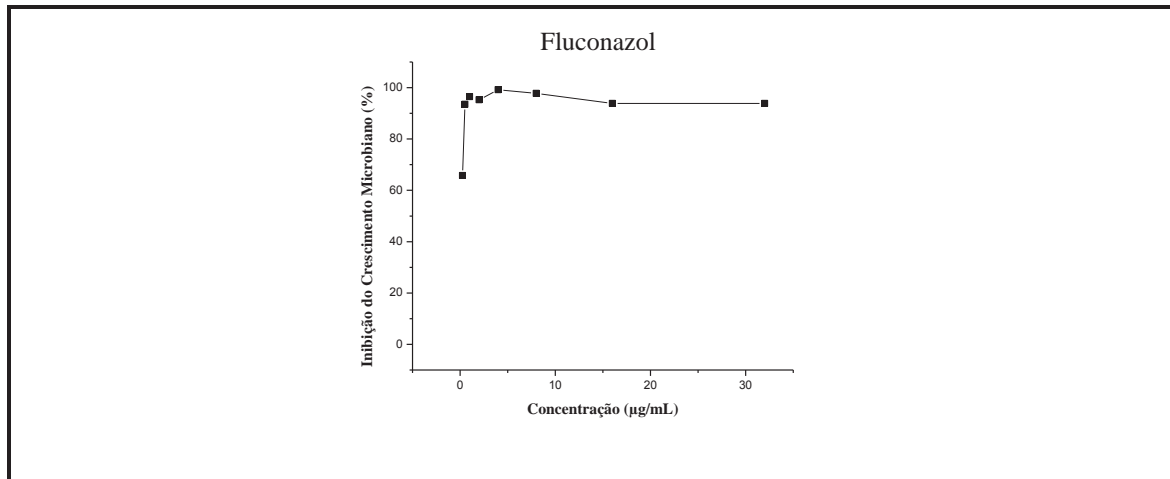


Figura 24. Inibição do crescimento de *C. albicans* para os testes com extratos, frações e substâncias isoladas de *A. brachypoda* e o seu respectivo controle.