



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**LILLIANE BONELLA MEIRELES BAPTISTA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS  
FITOTERÁPICOS PRODUZIDOS NA PASTORAL DA  
SAÚDE DE VENDA NOVA DO IMIGRANTE-ES**

VITÓRIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

B222a      Baptista, Lilliane Bonella Meireles, 1977-  
            Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antioxidante  
de extratos fitoterápicos produzidos na Pastoral da Saúde de  
Venda Nova do Imigrante-E.S. / Lilliane Bonella Meireles  
Baptista. – 2012.  
            95 f. : il.

            Orientadora: Ana Paula Ferreira Nunes.  
            Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

            1. Plantas medicinais. 2. Bactérias. 3. Drogas - Resistência  
em microorganismos. 4. Antioxidantes. I. Nunes, Ana Paula  
Ferreira. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de  
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

---

“Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos fitoterápicos produzidos na Pastoral da Saúde de Venda Nova do Imigrante-ES”

LILLIANE BONELLA MEIRELES BAPTISTA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada

---

Prof.ª. Dr.ª. Ana Paula Ferreira Nunes (UFES)

Orientadora

---

Pro.ª. Dr.ª. Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES)

Membro Interno

---

Prof. Dr. Hildegarde Seibert França (EMESCAM)

Membro Externo

Vitória-ES, 31 de maio de 2012.

**LILLIANE BONELLA MEIRELES BAPTISTA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS  
FITOTERÁPICOS PRODUZIDOS NA PASTORAL DA  
SAÚDE DE VENDA NOVA DO IMIGRANTE-ES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Ferreira Nunes

VITÓRIA

2012

**LILLIANE BONELLA MEIRELES BAPTISTA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS  
FITOTERÁPICOS PRODUZIDOS NA PASTORAL DA  
SAÚDE DE VENDA NOVA DO IMIGRANTE-ES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 31 de Maio de 2012.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Ferreira Nunes**  
**UFES- Orientadora**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Carmo P. Batitucci**  
**UFES- Examinador Interno**

**Prof. Dr. Hildegardo Seibert França**  
**EMESCAM- Examinador Externo**

VITÓRIA

2012

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Deus Triuno, Salvador, Poderoso em Obras, que vence batalhas, Misericordioso, Rei dos reis, Senhor dos senhores, a ti toda honra e toda glória para todo o sempre, não só por isso que me deste - que perto do que podes fazer é nada - mas por tudo o que tem feito e tudo o que há de fazer por mim e por todos os que o amam, agradeço.

À minha orientadora Ana Paula que abriu as portas de seu laboratório para mim e me acolheu com todo o respeito e amizade, valorizando, apoiando e incentivando.

Ao meu esposo Giuliano pela força, companheirismo, amor e amizade, me ajudando a vencer as barreiras e lutando comigo minhas e nossas lutas.

À minha filha Giulia pelo carinho imenso e sorriso contagiante que me acalmam, pelo seu amor que me faz querer seguir sempre em frente e por me esperar até tarde para dormir.

À Msc. Rita Zanúncio pela força, amizade, ajuda e apoio nesse projeto grandioso para nós.

Aos funcionários e voluntários da Pastoral da Saúde de Venda Nova do Imigrante por esse trabalho de grande valor, pela dedicação e amor com que realizam essa obra, em especial D. Cila.

Ao INCAPER pela parceria e ao professor Dr Ayres Ventura pela indicação da Msc Rita Zanúncio.

À minha família, minha mãe Ladimar pelo seu amor e por sempre me incentivar, meu pai Alonso que sempre mostrou que com muito trabalho podemos vencer, às minhas irmãs Adriana e Eliana pelo amor, carinho e apoio, aos meus sobrinhos e sobrinhas pelos beijos e abraços doces que alegam e acalmam. Às minhas tias e tios pelo incentivo, em especial à Céia.

À minha sogra Daudt por me ajudar e cuidar da minha pequena na minha ausência, ao meu sogro Theotonio e meus cunhados pelo incentivo.

À Flávia Caselli e Elaine Gonçalves pela amizade, apoio, compreensão, por compartilharmos nossas tristezas, anseios, alegrias e vitórias: tornamo-nos verdadeiras amigas-irmãs;

Aos irmãos e irmãs em Cristo pelas orações e apoio, em especial Valquíria, Juliana, Geane, Marly, Nenzinha, Monaliza, Patrícia, Eliane e Dalva;

À Juliana Delarmelina, por me ajudar com os ensaios de atividade antioxidante;

À professora Maria do Carmo, por dispor de seu laboratório para a secagem dos extratos e por seu tempo dedicado à avaliação dessa dissertação;

Às amigas e companheiras do RESBAC: Andressa, Carol, Samyra, Izabela, Flávia, Karla, Paula, Thaís, ao professor Dr. Ricardo, e em especial à Manuela e ao Victor;

Às companheiras do Lab-Gin e às Professoras Liliana, Sônia e Maricelli;

À equipe do Herbário Central da UFES-VIES pelo trabalho de depósito das exsicatas e identificação das plantas, de muito valia para essa dissertação, em especial ao Stéfano e à professora Valquíria F. Dutra;

Aos colegas de turma, por vencermos juntos essa jornada;

Aos professores do PPG-Biotec pelos ensinamentos e incentivo, em especial à prof. Patrícia Machado;

Ao prof. Dr Hildegardo S. França por dispor de seu tempo na avaliação dessa dissertação;

Às meninas da microbiologia: Érica, Idenir, Heloisa, Simone, Alexandra e principalmente à mãezona Lia Mara;

À FAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

## RESUMO

As propriedades medicinais de fitoterápicos utilizados tradicionalmente pela população têm sido comprovadas por pesquisas em todo o mundo. Foram avaliadas as atividades antimicrobianas e antioxidantes de oito extratos fitoterápicos produzidos na Pastoral da Saúde de Venda Nova do Imigrante- ES, Brasil, a partir das plantas: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Achillea millefolium* L., *Aristolochia cymbifera* Mart., *Casearia sylvestris* Sw., *Cordia verbenacea* DC., *Echinodorus grandiflorus* (Cham.& Schltld.) Micheli , *Gossypium hirsutum* L. e *Plantago major* L. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo determinando a concentração mínima bactericida (CMB) de cada extrato contra 12 espécies bacterianas, incluindo cepas multirresistentes causadoras de infecções hospitalares como MRSA, VRE e *K. pneumoniae* ESBL. Todos os extratos, com exceção do extrato de *A. cymbifera* cuja CMB > 250 mg/mL, apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias avaliadas com CMB variando entre 4 e 86 mg/mL para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas , com destaque especial para os extratos de *A. colubrina* e *C. verbenacea*, para os quais realizou-se o teste de avaliação da cinética de morte bacteriana (time-kill). A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método DPPH, demonstrando que os extratos fitoterápicos apresentam de razoável a ótima ação antioxidante, comparadas ao padrão quercetina. Os resultados obtidos confirmam indicações empíricas atribuídas aos extratos fitoterápicos incluindo a ação antimicrobiana, corroborando para atribuir novos usos aos fitoterápicos avaliados, bem como para incentivar novos estudos com os extratos e as plantas das quais estes são obtidos.

**Palavras- chave:** Plantas medicinais. Bactérias. Drogas- Resistência em microorganismos. Antioxidantes.

## ABSTRACT

The medicinal properties of herbs used traditionally by the population have been proved by researches from all around the world. Antimicrobial and antioxidant activities of eight phytotherapeutic extracts produced in the Pastoral care of health of Venda Nova do Imigrante-ES were assessed, from the plants: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Achillea millefolium* L., *Aristolochia cymbifera* Mart., *Casearia sylvestris* Sw., *Cordia verbenacea* DC., *Echinodorus grandiflorus* (Cham.& Schltld.) Micheli, *Gossypium hirsutum* L. and *Plantago major* L. The antimicrobial activity was evaluated by the microdilution method for determining the minimal bactericidal concentration (MBC) of each extract against 12 bacterial species, including multi-drug resistant strains causing nosocomial infections like MRSA, VRE and ESBL *K.pneumonie*. All plant extracts, with the exception of *A. cymbifera* whose MBC > 250 mg/mL, showed antimicrobial activity against the tested bacteria, with MBC ranging between 4 and 86 mg/mL to Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria, with special highlights for the extracts of *A. colubrina* and *C. verbenacea*, for which there was the kinetic evaluation test of bacterial death (time-kill). The antioxidant activity of extracts was evaluated by the DPPH method, demonstrating that the extracts are herbal medicines of regular to great antioxidant action, compared to standard quercetin. The results obtained confirm empirical indications attributed to the phytotherapeutic extracts including antimicrobial action, corroborating to assign new uses for the phytotherapics evaluated, as well as to encourage further studies with the extracts and the plants from which they are derived.

**Key words:** Medicinal plants. Bacteria. Drug-resistance in microorganisms. Antioxidants.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Ciclo biossintético dos metabólitos secundários vegetais .....	22
<b>Figura 2-</b> Estrutura química da azadirachtina.....	39
<b>Figura 3-</b> Estufa de secagem das plantas medicinais.....	39
<b>Figura 4-</b> Percoladores utilizados na produção dos fitoterápicos na PSVNI.....	39
<b>Figura 5-</b> Preparo dos extratos fitoterápicos na PSVNI.....	40
<b>Figura 6-</b> Redução do radical livre DPPH pelo flavonóide antioxidante Quercetina..	44
<b>Figura 7-</b> Extratos fitoterápicos produzidos na PSVNI.....	45
<b>Figura 8-</b> Avaliação da solubilidade dos diluentes.....	47
<b>Figura 9-</b> Estrutura química do DMSO.....	48
<b>Figura 10-</b> Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo .....	54
<b>Figura 11-</b> <i>Anandenanthera colubrina</i> , angico.....	56
<b>Figura 12-</b> <i>Cordia verbenacea</i> DC., erva baleeira.....	57
<b>Figura 13-</b> Curva tempo-morte de <i>S. aureus</i> ATCC 33591 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de <i>A. colubrina</i> (angico).....	68
<b>Figura 14-</b> Curva tempo-morte de <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de <i>A. colubrina</i> (angico).....	69
<b>Figura 15-</b> Curva tempo-morte de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 33591 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de <i>A. colubrina</i> (angico).....	69
<b>Figura 16-</b> Curva tempo-morte de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de <i>A. colubrina</i> (angico).....	70
<b>Figura 17-</b> Curva tempo-morte de <i>S. aureus</i> ATCC 33591 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de <i>C.verbenacea</i> (erva baleeira).....	72
<b>Figura 18-</b> Curva tempo-morte de <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de <i>C. verbenacea</i> (erva baleeira).....	73
<b>Figura 19-</b> Curva tempo-morte de <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de <i>C. verbenacea</i> (erva baleeira).....	73
<b>Figura 20-</b> Curva tempo-morte de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de <i>C. verbenacea</i> (erva baleeira).....	74
<b>Figura 21-</b> Atividade antioxidante do extrato do extrato de <i>A. colubrina</i> pelo método DPPH.....	77

<b>Figura 22-</b> Atividade antioxidante do extrato do extrato de <i>C. verbenacea</i> pelo método DPPH.....	77
<b>Figura 23-</b> Atividade antioxidante do extrato do extrato de <i>C. sylvestris</i> pelo método DPPH.....	78
<b>Figura 24-</b> Atividade antioxidante do extrato do extrato de <i>A. millefolium</i> pelo método DPPH .....	78
<b>Figura 25-</b> Atividade antioxidante do extrato do extrato de <i>G. hirsutum</i> L. pelo método DPPH .....	79
<b>Figura 26-</b> Atividade antioxidante do extrato do extrato de <i>E. grandiflorus</i> pelo método DPPH.....	79
<b>Figura 27-</b> Atividade antioxidante do extrato do extrato de <i>P. major</i> pelo método DPPH.....	80
<b>Figura 28-</b> Atividade antioxidante do extrato do extrato de <i>A. cymbifera</i> pelo método DPPH.....	80

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Principais espécies redoxi- ativas.....	32
<b>Tabela 2-</b> Amostras bacterianas utilizadas.....	37
<b>Tabela 3-</b> Amostras bacterianas ATCC ( <i>American type culture collection</i> ) utilizadas no teste Time-kill.....	43
<b>Tabela 4-</b> Plantas medicinais selecionadas e principais indicações de uso popular.....	46
<b>Tabela 5-</b> Partes da planta utilizadas na fabricação dos fitoterápicos e tempo de secagem na estufa.....	46
<b>Tabela 6-</b> Identificação botânica e depósito das exsiccatas.....	49
<b>Tabela 7-</b> Cálculo das concentrações obtidas dos extratos-secos pós-diluição em DMSO.....	50
<b>Tabela 8-</b> CMB (Concentração Mínima Bactericida) em mg/mL de oito extratos fitoterápicos contra bactérias Gram-positivas.....	51
<b>Tabela 9-</b> CMB (Concentração Mínima Bactericida) em mg/mL de oito extratos fitoterápicos contra bactérias Gram-negativas.....	52
<b>Tabela 10-</b> Comparação do maior valor de CMB obtido no teste de atividade antimicrobiana com a concentração encontrada nas formulações produzidas na PSVNI.....	64
<b>Tabela 11-</b> Valores de CMB do extrato de angico frente a quatro bactérias e concentrações sub- inibitórias aproximadas de 90% e 50%.....	66
<b>Tabela 12-</b> Avaliação quantitativa da ação inibitória do extrato fitoterápico de angico nas concentrações CMB-90% e CMB-50%.....	66
<b>Tabela 13-</b> Valores de CMB do extrato de Erva Baleeira frente a quatro bactérias e concentrações sub- inibitórias aproximadas de 90% e 50%.....	70
<b>Tabela 14-</b> Avaliação quantitativa da ação inibitória do extrato fitoterápico de Erva Baleeira nas concentrações CMB-90% e CMB-50%.....	71
<b>Tabela 15-</b> Percentual de redução do DPPH pelos extratos fitoterápicos.....	75

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATCC- *American Type culture collection*  
CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute  
CMB- Concentração mínima bactericida  
CMI- Concentração mínima inibitória  
DMSO- Dimetil sulfóxido.  
DNA- Ácido desoxirribonucleico  
DPPH- Difenil Picril Hidrazil  
ERN- Espécies Reativas do Nitrogênio  
ERO- Espécies Reativas do Oxigênio  
ESBL- Beta-lactamase de espectro estendido  
FB- FF- Farmacopeia Brasileira, Formulário de Fitoterápicos  
INCAPER- Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural  
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente á metilina resistant  
MS- Metabólito Secundário  
OMS- Organização Mundial de Saúde  
PD- Farmacodinâmica  
PK- Farmacocinética  
RNA- Ácido ribonucleico  
SOD- Superóxido dismutase  
TSB- Caldo Tricaseína de Soja , Caldo  
UFC/mL- Unidades formadoras de colônia por mililitros  
UTI- Unidade de Terapia Intensiva  
VRE- *Enterococcus faecalis* resistente à Vancomicina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Medicamentos fitoterápicos.....	18
1.2. Plantas medicinais e a pesquisa de metabólitos bioativos.....	20
1.3. Pesquisa de fitoterápicos com propriedades antimicrobianas.....	23
1.3.1. <i>Agentes antimicrobianos</i> .....	23
1.3.2. <i>Resistência bacteriana aos antimicrobianos terapêuticos</i> .....	25
1.3.3. <i>Fitoterápicos com propriedades antimicrobianas</i> .....	28
1.4. Radicais livres e antioxidantes .....	30
1.4.1. <i>Fitoterápicos com propriedades antioxidantes</i> .....	33
2. OBJETIVOS .....	36
2.1 Objetivo geral .....	36
2.2. Objetivos específicos .....	36
3. METODOLOGIA.....	37
3.1. Amostras.....	37
3.1.1. <i>Fitoterápicos</i> .....	37
3.1.2. <i>Bactérias</i> .....	37
3.2.. Coleta das plantas medicinais para a produção dos fitoterápicos e para identificação e depósito das exsiccatas .....	38
3.3. Identificação das plantas.....	38
3.4. Obtenção dos extratos vegetais .....	38
3.4.1. <i>Produção dos extratos/tinturas-fórmula comercial da PSVNI</i> .....	38
3.4.2. <i>Obtenção do extrato-seco</i> .....	40
3.5. Avaliação dos diluentes .....	40
3.5.1. <i>Avaliação da capacidade de solubilização dos diluentes</i> .....	40
3.5.2. <i>Determinação da concentração mínima bactericida do diluente</i> ....	41

3.5.3. Avaliação dos extratos e diluentes quanto à contaminação bacteriana.....	41
3.6. Massa obtida dos extratos- secos.....	41
3.6.1. Solubilização dos extratos-secos.....	42
3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fitoterápicos pelo método da microdiluição em caldo.....	42
3.8. Avaliação da cinética de morte bacteriana pela ação do fitoterápico (time-kill).....	42
3.9. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos fitoterápicos pela captura de radicais livres pelo método DPPH.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1. Seleção e produção dos fitoterápicos.....	45
4.1.1. Avaliação dos diluentes.....	47
4.2. Coleta e identificação das plantas medicinais.....	48
4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	50
4.4. Comparação dos maiores valores das CMB de cada extrato fitoterápico com a concentração encontradas nas formulações comerciais da PSVNI....	64
4.5. Avaliação da cinética de morte bacteriana (time-kill) sobre quatro bactérias causadoras de infecção hospitalar.....	65
4.5.1 Cinética de morte bacteriana pela ação do extrato de <i>Anadenanthera colubrina</i> ( Vell.) Brenan (angico).....	65
4.5.2 Cinética de morte bacteriana pela ação do extrato de <i>Cordia verbenacea</i> DC. (erva baleeira).....	70
4.6. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos fitoterápicos pela captura de radicais livres pelo método DPPH.....	74
5. CONCLUSÕES.....	81
6. REFERÊNCIAS.....	83

## 1. INTRODUÇÃO

Plantas medicinais têm sido utilizadas desde a antiguidade com o objetivo de curar, prevenir doenças e/ou aliviar seus sintomas. Inicialmente, as propriedades curativas das plantas eram descobertas pelo homem através do instinto, de analogias de cor, forma e sabor, por intuição e na observação dos animais que, quando doentes, buscavam nas plantas o remédio para os seus males. Esse patrimônio de conhecimentos adquiridos foi baseado na observação da natureza e na experimentação sistemática e constante de suas potencialidades (TAVARES, 2009; ELISABETSKY, 1997).

No decorrer da história da humanidade, cada povo procurou compreender as ações de ervas e plantas medicinais com o uso empírico, ou seja, através das observações dos resultados obtidos, formando assim um conhecimento das ações medicinais e tóxicas das plantas. Os registros de uso de plantas como medicamentos estão descritos na história de várias civilizações, dentre elas a egípcia que, por volta de 1600 a.C, já apresentava cerca de oitocentas plantas descritas, como o zimbros, a semente de linho, o funcho, o alho, a folha de sene e o lírio. Com o passar dos séculos, os conhecimentos sobre plantas medicinais foram transmitidos dos egípcios para os mesopotâmios, os gregos e romanos (ALVES, 2000; PROENÇA DA CUNHA, 2007).

Na China, o uso de plantas medicinais, principalmente sob a forma de chás, data de 3.000 anos a.C. e é muito comum até os dias de hoje. A obra denominada *Pen Tsao* é constituída por vários livros com referências a várias plantas que ainda hoje são usadas com bons resultados (PROENÇA DA CUNHA, 2007).

Hipócrates escreveu um conjunto de tratados sobre os conhecimentos médicos de sua época, cujo nome *Corpus Hipocraticum*, reúne a descrição de remédios vegetais e o seu uso no tratamento para enfermidades. Na Grécia antiga, Galeno criou a chamada “farmácia galênica”, utilizando as plantas em preparações com solventes como o álcool, a água ou o vinagre para conservar e concentrar os componentes ativos das plantas e, dessa forma, preparar unguentos, emplastros e outras formas galênicas. No início do século XVI o médico suíço Paracelso, criou a “teoria da similitude” tentando relacionar as virtudes das plantas com as suas propriedades

morfológicas, sua forma e sua cor, considerando que uma doença podia ser curada com aquilo que com ela tivesse semelhança. Essa teoria era baseada nas ideias dos povos indígenas que habitavam a América do Sul e, possivelmente, indígenas de outros continentes (ALVES, 2000).

O uso da fitoterapia no Brasil é proveniente, principalmente, de costumes dos povos indígenas que aqui habitavam. Estes povos nomearam a maioria das plantas e doaram o conhecimento de sua utilidade e seu uso à farmacopeia rústica brasileira. Os povos que colonizaram o Brasil e os imigrantes doaram o conhecimento adquirido das experiências com o uso de plantas indianas e europeias. A cultura negra também exerceu forte influência com a utilização de remédios caseiros por curandeiros, parteiras e em ritos espirituais, já que, devido ao racismo e discriminação sofridos, eram excluídos do acesso a outros serviços de saúde (BALBACH, 1985).

Através dessa mistura cultural e, conseqüentemente, do uso empírico pela população, as plantas medicinais passaram a ser utilizadas em diversas formas de preparação como a “garrafada”, os chás, as inalações, os unguentos, os “banhos de assento”, as infusões, os emplastros e muitos outros, originando o que hoje se denomina fitoterapia.

Apesar do uso bem difundido da fitoterapia e da descoberta de alguns importantes medicamentos provenientes de plantas, a partir do século passado, com o crescimento das indústrias farmacêuticas e com a preferência por substâncias químicas puras isoladas produzidas em larga escala, os estudos com plantas medicinais se tornaram menos expressivos. Isso é devido ao fato de que na história do desenvolvimento de fármacos existiram períodos de grande utilização de plantas medicinais em pesquisas e períodos em que esses estudos foram praticamente esquecidos (TAVARES, 2009; YUNES & CECHINEL FILHO, 2001).

Tendo em vista o desenvolvimento da ciência no que diz respeito à produção de fármacos, Yunes e Cechinel Filho (2001) dividiram a história do desenvolvimento dos fármacos em três períodos. No primeiro período, de 1800 a 1900, os químicos estudavam as plantas medicinais com o objetivo de isolar e determinar a estrutura de compostos ativos de plantas já bem conhecidas e experimentadas pelo uso

popular. O segundo período, que vai de 1901 a 1970/80, seguiu o modelo de produção sintética de fármacos e o terceiro período que vai de 1970/80 aos dias de hoje marca um aumento dos custos nas pesquisas, devido a uma maior dificuldade em encontrar um novo fármaco por projeção química. Principalmente no primeiro período muitos fármacos derivados de plantas foram descobertos como a Morfina, da planta *Papaver somniferum*, além da Codeína e a Papaverina, a Hioscinamina da *Atropa beladonna*, os ésteres do ácido isovalérico da planta *Valeriana officinalis*, da *Ephedra sinica* foi isolada a efedrina, a salicina das cascas da planta *Salix alba* e outros.

Da classe dos antimicrobianos, o Prontosil foi identificado como potente antimicrobiano que se decompunha a Sulfanilida, o verdadeiro princípio ativo, e marcou o segundo período, determinando a era das “sulfas”, compostos muito importantes durante a segunda guerra mundial. Entretanto, esse período teve como produtos naturais de importância terapêutica apenas os antibióticos obtidos de fungos como a penicilina, a actinomicina, a bacitracina, a neomicina e outros sendo marcado, principalmente, pela síntese química, do fármaco como uma molécula pura. No entanto, atualmente os estudos e pesquisas com plantas medicinais têm sido retomados, bem como a busca por alternativas de tratamentos e cura de doenças como o câncer (BRAZ FILHO, 2010).

Dentre esses tratamentos, a fitoterapia está inserida como uma das principais alternativas devido à maior facilidade de acesso pela população, uso disseminado, menor custo e eficácia comparável aos medicamentos sintéticos. Os extratos fitoterápicos podem revelar grande potencial contra doenças pela ação sinérgica ou individual de compostos provenientes de seu metabolismo secundário, como os flavonoides, os taninos, os carotenoides, os glicosídeos, os alcaloides, os diterpenos e outros (MARIOT & BARBERI, 2007).

As doenças infecciosas estão entre as doenças de interesse no estudo dos efeitos benéficos das plantas medicinais e fitoterápicos. Tais síndromes, são responsáveis por grandes gastos em saúde pública devido ao aumento da estadia hospitalar, necessidade de maior consumo de medicamentos e/ou procedimentos médicos, principalmente quando se trata de infecções causadas por microrganismos portadores de resistência a antimicrobianos. Não obstante os altos índices de

mortalidade e morbidade causados por infecções por bactérias apresentando resistência, nenhum novo agente antimicrobiano foi descoberto nos últimos anos, enquanto cresce o número de bactérias portadoras de resistência, algumas delas apresentando resistência a todos os antimicrobianos usados atualmente (TAVARES, 2000).

Além das doenças infecciosas algumas doenças relacionadas ao envelhecimento como doenças degenerativas crônicas, cardiopatias e aterosclerose também têm sido alvo de intensas pesquisas em todo o mundo. Estas doenças podem estar relacionadas a danos causados por estresse oxidativo. Este fenômeno está relacionado, principalmente, à ação constante de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas de Nitrogênio (ERN) geradas em processos inflamatórios ou por alguma outra disfunção biológica, por exemplo, as causadas por infecções (BARREIROS et al, 2006; BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os extratos vegetais possuem substâncias conhecidas por sua capacidade antioxidante, em especial os flavonoides e taninos que, por serem ricos em hidroxilas, são capazes de reagir com as ERO e ERN e, dessa forma, podendo ser úteis no tratamento de algumas doenças por inibir ou retardar significativamente os processos oxidativos (OLIVEIRA et al, 2009 ;VIEGAS JUNIOR et al , 2006).

Diante da necessidade de descoberta de novos fármacos que possam suprir essas emergências em saúde, é preciso que novas pesquisas com agentes antimicrobianos e a ampliação das pesquisas com os já utilizados na clínica sejam realizadas. Além disso, é necessário identificar as substâncias antioxidantes e antimicrobianas presentes em plantas, investigar seu potencial benefício para a saúde e avaliar as implicações do seu uso pela população.

Nesse contexto, as pesquisas com produtos naturais, em especial com plantas medicinais, se tornam importantes tanto no que diz respeito á descoberta de novos medicamentos fitoterápicos, atribuição de novos usos aos já utilizados pela população, quanto no que diz respeito á descoberta, purificação e isolamento de novas moléculas. Isso porque mesmo aquelas plantas medicinais que já possuem alguma descrição farmacológica podem revelar novas atividades biológicas outrora não percebidas, porque geralmente os metabólitos relacionados às atividades

biológicas fazem parte de um metabolismo especial ou secundário do vegetal, em resposta às agressões provenientes do ambiente que o cercam e das condições edáficas de cultivo. Ou seja, o ambiente desempenha um papel crucial no metabolismo das plantas fazendo com que estas produzam diferentes e variados complexos moleculares, abrindo caminho para a descoberta de novos grupos estruturais e para estudos de identificação de alvos moleculares e de mecanismos de ação de fármacos (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001).

Além de atribuir novos usos às plantas medicinais e confirmar as propriedades medicinais e/ou cosméticas de seus extratos, os estudos com plantas medicinais podem contribuir para que novas moléculas sejam isoladas e caracterizadas quimicamente, além de revelar suas informações sobre a relação estrutura-atividade. Conseqüentemente, permitindo através da química combinatorial, o rearranjo de estruturas e a criação de novas moléculas com potencial atividade biológica.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. 1. Medicamentos fitoterápicos

A palavra fitoterapia é originada da junção de dois radicais gregos: “phyton”, que significa planta, e “therapia”, que significa tratamento. É caracterizada como a terapia pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal (BRASIL, 2006).

O fitoterápico é elaboração da planta medicinal para uma formulação específica, sendo considerado como produto final acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, e não são considerados produtos fitoterápicos quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas, que neste caso são considerados como fitofármacos, cuja definição “é a substância ativa, isolada de matérias-primas vegetais ou mesmo, mistura de substâncias ativas de origem vegetal” (VEIGA JUNIOR et al, 2005).

No conceito de fitoterápicos a RDC17-2000 e a RDC14-2010 (BRASIL, 2000; 2010) define: Medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos a partir de plantas medicinais, com o uso exclusivo de derivados de droga vegetal como suco, extrato, tintura, óleo, cera e exsudato. Estes, após serem processados devem oferecer garantia de qualidade, ter evidência de seus efeitos terapêuticos, padronização de sua composição e segurança de uso para a população. Além disso, sua eficácia e segurança devem ser validadas através de documentações tecnocientíficas, de levantamentos etnofarmacológicos em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos. Ainda de acordo com a ANVISA as plantas medicinais são consideradas matérias primas a partir das quais são produzidos os fitoterápicos. Estas podem ser comercializadas no Brasil em farmácias e ervanárias, desde que não apresentem indicações terapêuticas definidas, seja feito um acondicionamento adequado e declarada sua classificação botânica.

Esses conceitos formulados e estabelecidos acerca das plantas medicinais e fitoterápicos foram fruto das observações da comunidade científica sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais pela população leiga. De forma indireta este tipo de cultura medicinal, desenvolvida pela população ao longo dos milhares de anos despertou, e ainda desperta, o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares como farmacologia, botânica e fitoquímica. Estes estudos, em conjunto, aumentam o grau de conhecimentos sobre a inesgotável fonte de medicamentos naturais que é a flora mundial (MACIEL et al, 2002).

Foi com base no conceito popular de utilização de plantas medicinais que os órgãos de saúde foram incentivados a regularizar o uso de preparações fitoterápicas como forma de padronizar o uso, evitar o mau uso, evitar casos de intoxicação e promover maior conhecimento e aplicabilidade do uso dessas plantas. Sendo assim, a industrialização de medicamentos fitoterápicos surge da necessidade de uma padronização dos processos de obtenção da planta medicinal e produção do fitoterápico evitando, assim, intercorrências negativas como contaminações por microrganismos, agrotóxicos e substâncias estranhas, além de propiciar maior segurança de uso por padronizar, também, a posologia e forma de administração (FISCHER, 2005).

Desde a década de 70, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado à adoção de práticas alternativas de cuidado à saúde das populações mundiais, bem como a acentuação de estudos científicos relacionados ao tema (WHO, 2001). Foi a partir de então que, no Brasil, os estudos envolvendo plantas medicinais começaram a ganhar força, incentivados, também, pelo aumento global da preocupação com a biodiversidade e por ideias de desenvolvimento sustentável (LORENZI & MATOS, 2008).

No Brasil, a política de uso de plantas medicinais teve início em 1981, mas foi a partir do ano de 2006, com a publicação do Decreto 5.813/2006, que instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais, que essa política foi regulamentada com o estímulo a pesquisas no setor. Mais recentemente, foi aprovado o Formulário Fitoterápico, em sua 1ª edição, instituído pela resolução RDC 60/2011, publicada em 11 de Novembro de 2011. Esse formulário, que integra a Farmacopeia Brasileira, traz 83 monografias de medicamentos, como infusões, tinturas, xaropes e pomadas,

estando nele registradas informações sobre a forma correta de preparo e as indicações e restrições de uso de cada espécie (BRASIL, 2011).

Neste sentido, através do Ministério da Saúde/Departamento de Assistência Farmacêutica, o Brasil tem desenvolvido diversas ações voltadas ao desenvolvimento da produção de plantas medicinais e fitoterápicos, com vistas à ampliação do acesso a produtos e serviços aos usuários do SUS, visando maior integralidade da atenção à saúde.

Além da importância dessa ampliação dos serviços de saúde, com incentivo à utilização de práticas naturais de cuidado à saúde levando à implantação das farmácias vivas, das farmácias comunitárias e de iniciativas como a criação de hortos ecológicos é inegável a importância das entidades sociais, como é o caso das Pastorais da Saúde. Estas atuam nas dimensões: solidária, onde seus membros prestam assistência junto aos enfermos e aos que sofrem, tendo um foco mais espiritual e psicológico; comunitária, que tem como objetivo a promoção e a educação em saúde com ênfase na saúde pública e no saneamento básico, agindo preferencialmente no campo da prevenção das doenças e na promoção de estilos de vida saudáveis; e finalmente, a político-institucional que tem por objetivo zelar para que os organismos e as instituições públicas e/ou privadas que prestam serviços de saúde e formam profissionais nessa área tenham presente a missão social, política, ética, bioética e comunitária e, além disso, sendo de extrema importância no que diz respeito a formulação de políticas públicas e controle social (DURÃES & SOUZA, 2011).

## **1.2. Plantas medicinais e a pesquisa de metabólitos bioativos**

As pesquisas com plantas medicinais podem favorecer a descoberta de medicamentos fitoterápicos, atribuir novos usos aos já utilizados e padronizados, bem como propiciar a purificação e isolamento de novas moléculas bioativas. De acordo com Yunes e Cechinel Filho (2001) a base das pesquisas de metabólitos bioativos de plantas consiste no fato de que toda substância, independente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo.

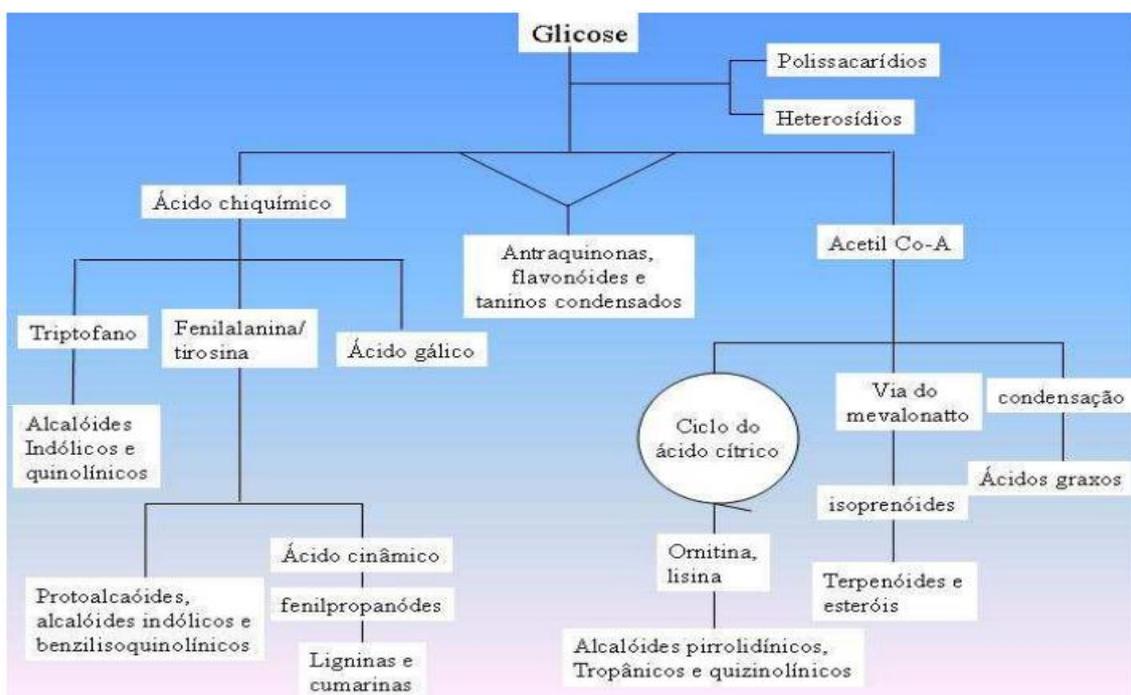
As atividades biológicas das plantas medicinais estão relacionadas com a produção de metabólitos por parte do vegetal. Os vegetais possuem elevada capacidade biossintética do metabolismo secundário, podendo haver grande produção no número e na diversidade de substâncias produzidas, por exemplo, a *Catharanthus roseus* (vinca) que além de planta ornamental, assume importante papel na medicina moderna devido à produção e acúmulo de alcaloides bisindólicos nas folhas (vimblastina e vincristina), que são utilizados no tratamento de diversas formas de câncer. Esta planta, em relação aos alcaloides, é capaz de produzir e acumular mais de 90 compostos diferentes (ROBBERS et. al. 1997).

Os metabólitos podem ser divididos em primários e secundários. Dentre os metabólitos primários incluem-se os carboidratos, as proteínas, os aminoácidos, os ácidos nucleicos (DNA e RNA) e ácidos orgânicos. As funções biológicas do organismo estão relacionadas principalmente à produção dos metabólitos primários como, por exemplo, as funções de um gene, a produção de proteínas específicas e outros. Os metabólitos secundários (MS), por sua vez, são produtos do metabolismo dos organismos, produzidos a partir dos metabólitos primários e se caracterizam por atuarem como substâncias tóxicas contra competidores, predadores e parasitas, como bactérias, fungos, plantas, protozoários, insetos e vírus. Os MS atuam, também, no processo de diferenciação celular, pelos quais são produzidos os diferentes tecidos com diferentes funções nos organismos superiores e têm ainda as funções de auxiliar na excreção de produtos e de servir como substâncias-reserva para o metabolismo celular (MAGALHÃES, 2006). Além disso, os MS são produzidos pelos vegetais como resposta a fatores edáficos e de cultivo, sendo que o clima, o local de plantio, a temperatura, o horário da coleta do material vegetal também podem influenciar na qualidade e quantidade desses metabólitos (BLANK et al, 2005; SOUZA et al, 2006; MARCHESE et al, 2005).

Do metabolismo da glicose são formados praticamente todos os metabólitos primários e secundários. A glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico que, pela via do ácido chiquímico, forma todos os MS aromáticos como alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis e, pela segunda via, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetilcoenzima A (acetil-coA). As acetil-CoA podem

seguir três vias diferentes: a via do ciclo do ácido cítrico, onde serão formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos; a via do mevalonato onde são originados os terpenóides e os esteróis; e via da condensação do acetato que formam as acetogeninas. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados, como mostra a figura 1(SANTOS, 2004).

**Figura 1:** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários vegetais



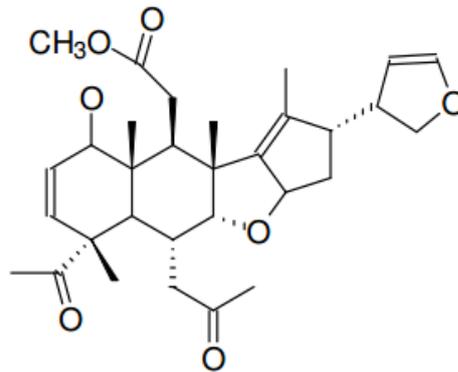
Fonte: SANTOS, 2004

Muitos MS são considerados materiais especiais muito valorizados no mercado, sendo usados comercialmente como compostos biologicamente ativos. A utilidade comercial dos MS pode ser exemplificada pela nicotina, morfina, cocaína, óleos de eucalipto, eugenol e outros. Entretanto, muito destes metabólitos possuem estruturas altamente complexas, que determinam sua atividade biológica e não podem ser economicamente sintetizados, como por exemplo, a azadirachtina extraída do Nim ou Neem (*Azadirachta indica*), com estrutura bastante complexa (figura 2), é utilizada como inseticida, apresenta eficiência em baixas concentrações e baixa toxicidade aos mamíferos (GALLO et al., 2002). Uma vantagem econômica tanto dos metabólitos primários e secundários pode ser a facilidade de obtenção

através de processos relativamente simples, como a destilação a vapor ou por extração com solventes aquosos ou orgânicos.

Neste contexto, estão incluídos os produtos fitoterápicos que, na maior parte das vezes, são produzidos a partir da extração dos princípios ativos das plantas medicinais por solventes aquosos e/ou orgânicos, como o álcool etílico de cereais, produzindo então o que chamamos de extratos e tinturas.

**Figura 2:** Estrutura química da azadirachtina



### 1.3. Pesquisas de fitoterápicos com propriedades antimicrobianas

#### 1.3.1. Agentes antimicrobianos

O termo antibiose significando o processo natural de seleção pelo qual um ser vivo destrói outro para assegurar a própria sobrevivência foi criado por Vuillemin em 1889 e aperfeiçoado por Waksman em 1942, que considerou como antibióticos substâncias químicas produzidas por microrganismos capazes de inibir o crescimento ou destruir bactérias e outros microrganismos. Mais tarde verificou-se que não só os microrganismos produzem substâncias com ação antimicrobiana, mas os vegetais e os animais, também (TAVARES, 2009).

Atualmente o termo antimicrobiano é considerado um termo mais amplo que abrange os termos antibióticos e quimioterápicos. Os agentes quimioterápicos são substâncias químicas utilizadas no tratamento das doenças infecciosas e neoplásicas, em concentrações que são toleradas pelo hospedeiro. Esse conceito abrange essencialmente as substâncias sintetizadas em laboratório ou de origem

vegetal que apresentam toxicidade baixa para as células normais do hospedeiro, mas alta para o agente agressor (MIMS et al 2005; TAVARES; 2009).

Os antibióticos podem ser classificados segundo a sua estrutura química, segundo o espectro de ação e segundo o efeito sobre os microrganismos. Na classificação química são divididos em derivados de aminoácidos, derivados de açúcares, derivados de acetatos e propionatos e outros. Segundo o espectro de ação divididos em ativos sobre protozoários, sobre algas, sobre bactérias Gram-positivas, sobre bactérias Gram-negativas, de amplo espectro, etc. Na classificação segundo o efeito sobre microrganismos podem ser classificados em bacteriostáticos, que interrompem o crescimento e reprodução dos microrganismos e bactericidas, que causam a morte destes. Os mecanismos de ação mais comuns dos agentes microbianos são: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular e inibição da síntese protéica ou de ácidos nucléicos. (TAVARES, 2009).

Para pesquisar um novo agente antimicrobiano os padrões-ouro de comparação continuam sendo a eficácia clínica e a segurança, entretanto, medidas farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD) têm sido muito empregadas atualmente, podendo ser usadas para identificar o melhor agente terapêutico para uma indicação específica. Os parâmetros farmacocinéticos de um fármaco definem a velocidade e a extensão de sua penetração na corrente circulatória e nos diversos outros sítios do organismo, bem como a velocidade e a extensão de eliminação do mesmo, sendo determinados a partir da caracterização do seu perfil plasmático. Os parâmetros farmacodinâmicos definem a relação entre as concentrações do fármaco e seus efeitos terapêuticos e tóxicos, podendo ser quantificados *in vivo*, quando se tratar de um fármaco antimicrobiano (EBERT, 2004).

Combinando apropriadamente os parâmetros PK/PD de um antimicrobiano específico tem-se uma aproximação da atividade do fármaco *in vivo*. As análises PK/PD tem sido consideradas uma alternativa vantajosa na diminuição dos riscos de efeitos colaterais, redução dos custos com o tratamento antimicrobiano e diminuição dos riscos de desenvolvimento de resistência bacteriana (TASSO, 2008).

Nos testes *in vitro* a Concentração mínima Inibitória (CMI) e a Concentração mínima Bactericida (CMB) são os parâmetros mais comumente avaliados. A CMI representa

a menor concentração de um antimicrobiano que inibe o crescimento de um microrganismo em testes de sensibilidade, esse crescimento deve ser visível. A CMB representa a concentração mínima capaz de reduzir 99,9% do inóculo bacteriano inicial (CLSI, 2003; LORIAN, 2005).

### **1.3.2. Resistência bacteriana aos antimicrobianos terapêuticos**

A crença de que qualquer doença infecciosa pudesse ser curada por terapia antimicrobiana acelerou a produção e o consumo de antibióticos e, após o advento da Penicilina, seguiu-se a descoberta e a produção comercial de muitos outros antibióticos fazendo com que estes fossem fabricados mundialmente numa escala de 100.000 toneladas ao ano, como consequência de um consumo desenfreado e do uso irresponsável. A utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos teve profundo impacto sobre a vida das bactérias na Terra: muitas estirpes de agentes patogênicos tornaram-se resistentes aos antibióticos, sendo que alguns se tornaram resistentes a vários agentes, o chamado fenômeno da resistência multidroga. Além do aumento da morbimortalidade causada por esses patógenos, esse fenômeno também tem como consequência o aumento dos custos com os serviços de saúde (NIKAIDO, 2009; NATTHWANI, 2004; SMITH et al, 2006).

Em geral, bactérias têm habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas usadas como agentes terapêuticos (NASCIMENTO et al. 2000) e são frequentes os relatos sobre isolamentos de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas de uso na rotina, mas que se tornaram resistentes a todos ou a quase todos os fármacos disponíveis no mercado (SAKAGAMI & KAJAMURA, 2006).

Os mecanismos de resistência são múltiplos e incluem a diminuição da permeabilidade da membrana citoplasmática, exclusão ativa do antimicrobiano por bombas de efluxo, alteração do sítio de ligação do antimicrobiano, alteração do receptor da membrana citoplasmática, superprodução de enzimas modificadoras de antimicrobianos, síntese de enzimas que inativam o fármaco e rotas metabólicas alternativas ou ainda, aumento da expressão dos sítios de ligação do antimicrobiano (LIVERMORE, 2003; TAVARES, 2009).

Algumas bactérias apresentam resistência intrínseca a antimicrobianos. Essa resistência, que faz parte do código genético do microrganismo, normalmente é descoberta nos estágios iniciais de desenvolvimento de um novo fármaco, no entanto, pode corresponder à necessidade de uma nova droga ser introduzida na clínica (LORIAN, 2005). A resistência adquirida pode ser originada em mutações que ocorrem no microrganismo durante seu processo reprodutivo resultando em erros de cópia nas sequências de base que formam o DNA. Outra origem de resistência é a importação de genes causadores do fenômeno, consistindo no que se denomina resistência transferível, principalmente via plasmídeos e transposons (TAVARES, 2009).

Historicamente, os primeiros casos de microrganismos apresentando resistência surgiram logo em seguida aos primeiros antibióticos serem introduzidos na clínica. A partir da descoberta da Penicilina por Flemming em 1928, novos antibióticos foram descobertos, tendo-se como substrato inicial fungos do gênero *Penicillium*, muitos com maior eficácia e rentabilidade. A incidência de infecções reduziu sensivelmente, permitindo inclusive a erradicação de doenças como, por exemplo, a redução de casos de tuberculose nos países desenvolvidos, em especial com a descoberta da estreptomicina nos anos 50. Entretanto, logo em seguida à introdução da Penicilina como terapia antimicrobiana foi identificada a produção da enzima  $\beta$ -Lactamase, tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas, no início dos anos 40, antes mesmo do uso generalizado da penicilina no mundo todo (FERREIRA, 2008).

O fenômeno de resistência a antibióticos é um problema que afeta todo o mundo, não sendo exclusivo de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Na Europa e América do Norte, por exemplo, têm emergido os casos de *S. aureus* resistentes á meticilina (MRSA), Enterobacteriaceae produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), *Enterococcus* resistente à Vancomicina (VRE) e *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina, tanto em hospitais quanto na comunidade (SANTOS, 2004). No Brasil, dados da ANVISA (2009) sobre ocorrência de infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) envolvendo dados de mais de setenta hospitais brasileiros, mostraram que 47% das amostras isoladas corresponderam ao

gênero *Staphylococcus*, destas, 62% eram resistentes à Meticilina; 17% correspondiam a amostras de *K. pneumoniae* sendo 64% delas produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL- extended spectrum  $\beta$ -lactamase); 11% de *P. aeruginosa*, com aproximadamente 40% destas apresentando resistência a quinolonas e carbapenemas; 5% de *Enterococcus* spp, sendo 16% destas amostras apresentando resistência à Vancomicina.

Devido aos crescentes problemas relacionados, em 2009 a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou a Resistência Bacteriana como uma das três maiores ameaças para a saúde humana e o foco do Dia Mundial da Saúde em 2011 foi o “Combate à resistência bacteriana”, numa tentativa de chamar a atenção das autoridades competentes e da população mundial para o problema. De acordo com o BSAC (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*) existem sérias preocupações quanto à eficácia futura dos antibióticos atualmente disponíveis e a falta de antibióticos no mercado, levando à necessidade de novas pesquisas com foco em investigação, regulamento e economia (WISE, 2011), já que o número de novos agentes antimicrobianos lançados para o uso terapêutico vem diminuindo a cada ano: entre os anos de 1983 a 1987 foram lançados 16 antimicrobianos, entre os anos 2003 a 2007 foram lançados apenas 4 novos agentes antimicrobianos (FOX, 2006).

As discussões recentes sobre pesquisa e desenvolvimento tem destacado a importância de novos fármacos e dos fármacos já conhecidos e de elevado interesse social e de expressão estratégica para o país. Incluem-se aí os fitoterápicos, fitofármacos, produtos biotecnológicos, medicamentos genéricos, medicamentos similares que apresentem vantagens tecnológicas, dentre outros (MARQUES, 2002; ELISABETSKY, 2003). Além disso, o Ministério da Saúde também demonstrou que dentro de suas atuais prioridades está a orientação para produção desses novos medicamentos.

No Brasil, a principal ação que diz respeito ao controle do uso de antimicrobianos foi a instituição da RDC Nº 20, de 5 de Maio de 2011, que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. Isso se torna um benefício para a saúde

pública já que promove a diminuição da auto-medicação e conseqüente diminuição de pressão seletiva sobre espécies bacterianas.

A OMS também reconhece a importância no desenvolvimento de novos fármacos e acredita que o conhecimento tradicional sobre produtos da biodiversidade é extremamente necessário para o combate de doenças que destroem populações dos países em desenvolvimento.

### ***1.3.3. Fitoterápicos com propriedades antimicrobianas***

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de serem encontradas novas moléculas derivadas de plantas com propriedades biológicas. Existem vários métodos para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição.

O teste de difusão em ágar ou difusão em placas é um método físico que consiste em desafiar um microrganismo conhecido contra uma substância biologicamente ativa sendo, no entanto, limitado a microrganismos de crescimento rápido, aeróbios ou aeróbios facultativos e sua avaliação é comparada a um padrão biológico de referência (BARRY & THORNSBERRY, 1991; PINTO et al., 2003). A medida do halo de inibição dos microrganismos frente ao agente antimicrobiano classifica-os como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003).

O método desenvolvido por Eloff (1998) é considerado um método sensível para determinar a CMI ou a CMB de extratos ativos de plantas. Entretanto, ocorrem muitas variações referentes à determinação da CMI como: técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extrato testada. Além disso, a própria característica físico-química do extrato, como a coloração e capacidade de diluição em solventes inócuos, torna difícil a padronização de um método que possa expressar os resultados dos testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL et al., 2004).

O método de diluição em caldo avalia a proporção de crescimento do microrganismo no meio líquido, entendida como a turbidez provocada pelo crescimento do mesmo, e a concentração da substância a ser testada comparada a um padrão biológico de referência. Este método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos microrganismos, apresentando como desvantagem a dificuldade de detectar contaminação em testes com amostras clínicas (PINTO et al., 2003). Podem ser empregadas duas metodologias: a macro e a microdiluição. A macrodiluição é considerada uma técnica laboriosa, que consome muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gera grande quantidade de resíduos enquanto se usa pequeno número de réplicas (ZGODA & PORTER, 2001). A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços e é considerada a miniatura da técnica de macrodiluição.

Partindo desses princípios, Michelin et al (2005), determinaram a CMI de extratos de *Xantosema violaceum* conhecida popularmente como Taioba e que serve também como alimento, e *Syzygium cuminii* – fruto conhecido como jambolão. A CMI destes extratos variou entre 120 e 180 mg/mL, respectivamente, contra 14 espécies bacterianas e a levedura *Candida albicans* através da técnica de difusão em disco. Também avaliaram o extrato de *Punica granatum* (conhecido como romã, cujos frutos são utilizados como alimento e na medicina popular como antisséptico, adstringente e antimicrobiano) contra os mesmos microrganismos e este demonstrou ser mais eficaz, apresentando CMI entre 25 e 40 mg/mL. A atividade antimicrobiana de *P. granatum* também foi observada por Machado et al. (2003) que estudando 14 extratos de plantas usadas tradicionalmente no Brasil para tratamento de doenças infecciosas, verificaram que *P. granatum* inibiu linhagens de *S. aureus* sensíveis e resistentes a meticilina (MRSA), concluindo que estas substâncias poderiam se revelar como potenciais agentes no tratamento de infecções causadas por MRSA.

Kalemba et al. (2002) observaram boa atividade antimicrobiana de óleos essenciais obtidos de *Artemisia asiatica*, planta popularmente conhecida como Artemísia utilizada como emenagoga (que faz descer a menstruação), estimulante e contra bactérias e fungos.

Schuck et al (2001) estudaram a atividade antimicrobiana da planta *Cymbopogon citratus* conhecida popularmente como capim-cidró, capim-cidreira e capim-limão

pelo método de difusão em ágar, demonstrando que o infuso, decocto e macerado das folhas frescas foram inativos frente aos microrganismos testados. Entretanto, o infuso de folhas secas apresentou atividade antimicrobiana contra *S.aureus* e *E. coli*, e o decocto de folhas secas demonstrou atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*.

Aguiar et al (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Lippia alba* conhecida popularmente como erva cidreira e utilizada na medicina popular como analgésica, febrífuga, antiinflamatória, antigripal e nas afecções hepáticas. Os resultados obtidos mostraram que os extratos clorofórmico, acetônico e etanólico da raiz foram ativos frente a *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans* e *Monilia sitophila* e os extratos hexânicos, etanólicos e metanólicos das folhas inibiram *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *M. smegmatis* e *M. sitophila*.

Segundo a OMS, 80% da população mundial faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais, no Brasil pesquisas demonstram que mais de 90% da população já fez uso de alguma planta medicinal (ABIFISA, 2007). A riqueza da diversidade vegetal brasileira contribuiu para que a utilização das plantas medicinais seja considerada uma área estratégica para o país. Segundo Batalha et al. (2007), o País contém cerca de 23% das espécies vegetais existentes em todo o planeta.

#### **1.4. Radicais livres e antioxidantes**

Muitas condições clínicas podem causar um desequilíbrio entre os sistemas de geração e de eliminação de radicais livres no organismo afetado causando um estresse oxidativo. Radicais livres são átomos ou moléculas consideradas altamente instáveis e reativas, possuindo meia-vida extremamente curta. Podem ser moléculas orgânicas, inorgânicas ou átomos que contenham um ou mais elétrons não pareados. Os radicais livres que possuem o elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados, respectivamente, ERO e ERN. Um termo geral que inclui as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio é denominado espécies redoxi-ativas (HALLIWELL, 2001).

Os radicais livres podem ser gerados, nas mitocôndrias, no citoplasma ou na membrana das células e o alvo celular dessas espécies reativas: proteínas, lipídeos,

carboidratos e DNA, estão relacionados com o seu sítio de formação (YU, 2007). Muitas funções fisiológicas normais ocorrem devido à presença de radicais livres entretanto, a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (ANDERSON, 1999).

Nas doenças infecciosas, lesões mediadas por radicais livres contribuem para processos variados como a eliminação de microrganismos pelas células fagocitárias. Quando ocorre uma lesão tecidual ou celular ânions superóxidos podem ser produzidos como resultado da redução incompleta do oxigênio pelas mitocôndrias danificadas ou devido à ação das oxidases derivadas de leucócitos e/ou outras células, favorecendo o acúmulo de radicais livres pela ativação do surto oxidativo e secreção de citocinas, o que amplifica e regula as ações inflamatórias, dentre outros (ROBBINS & COTRAN, 2010).

De acordo com Anaya-Prado et al (2002) a destruição de microrganismos é desempenhada em grande parte por mecanismos dependentes de oxigênio mas também por mecanismos independentes de oxigênio, por meio da ação de substâncias presentes nos grânulos dos leucócitos. Essas substâncias são capazes de causar lesão no endotélio e nos tecidos e podem, assim, amplificar os efeitos da lesão inicial quando o infiltrado de células de defesa for persistente e descontrolado, sendo a base de muitas doenças crônicas.

Para evitar que isso aconteça, os sistemas antioxidantes naturais da célula eliminam metabólitos tóxicos do oxigênio. Assim, a influência dos radicais livres derivados do oxigênio em qualquer reação inflamatória depende do equilíbrio entre a produção e a inativação desses metabólitos pelas células e tecidos (ROBBINS & COTRAN, 2010).

Nos organismos vivos a produção de radicais livres é controlada por compostos antioxidantes de origem endógena capazes de reduzir a ação de ERO, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), ou não-enzimaticamente, como glutathione reduzida (GSH) ou serem provenientes de outras fontes, como por exemplo alimentar, tais como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ - caroteno (pro-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (BARREIROS et al., 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

**Tabela 1:** Principais espécies redoxi-ativas.

ESPÉCIES REDOXI-ATIVAS DE OXIGÊNIO		ESPÉCIES REDOXI-ATIVAS DE NITROGÊNIO	
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete	$\text{NO}^\cdot$	Óxido Nítrico
$\text{O}_2^\cdot$	Radical Superóxido	$\text{ONOO}^\cdot$	Peroxinitrito
$\text{OH}^\cdot$	Radical Hidroxila	$\text{NO}_2^\cdot$	Dióxido de nitrogênio
$\text{Q}^\cdot$	Radical Semiquinona	$\text{ROONO}$	Alquil peroxinitrito
$\text{RCO}_2$ ou $\text{LOO}^\cdot$	Peroxila		
$\text{RO}^\cdot$ ou $\text{LO}^\cdot$	Alcoxila		

Fonte: Adaptado de Halliwell, 1996.

De modo geral, as substâncias presentes em concentrações baixas, quando comparadas ao substrato oxidável, que inibem ou retardam a oxidação do substrato são denominadas antioxidantes. Estas agem nos organismos vivos por meio da complexação de íons metálicos, na captura de radicais livres, na decomposição de peróxidos, na inibição de enzimas responsáveis pela geração de ERO e ERN e na modulação de vias sinalizadoras celulares. Devido aos efeitos deletérios às células, várias pesquisas têm sido realizadas atribuindo papel importante aos radicais livres e oxidantes no que diz respeito ao envelhecimento, doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como o câncer, doenças cardiovasculares, artrites, isquemia, doenças gastrintestinais, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e doenças neuro-degenerativas (SOUSA et al, 2007).

Sendo assim, o emprego de compostos capazes de capturar radicais livres surge como uma alternativa na terapia de várias doenças, o que tornam importantes as pesquisas de novos compostos capazes de inibir processos oxidativos (BARREIROS al., 2006).

Dentre essas pesquisas destacam-se as que utilizam plantas medicinais, já que esses vegetais são uma das principais fontes de moléculas biológicas ativas e terapeuticamente úteis. As substâncias presentes em plantas que possuem núcleo fenólico como: tocoferol, flavonoides, carotenoides, terpenoides, fenólicos e taninos, apresentam destaque especial como antioxidantes, pois podem atuar como captadores de ERO e também podem reduzir e quelar íons ferro catalizadores de peroxidação lipídica (AL-MAMARY et al., 2002; BARREIROS 2006).

Dentre elas, os flavonoides e os ácidos fenólicos são conhecidos por exibirem muitas propriedades farmacológicas, como proteção de vasos sanguíneos, anticarcinogênica, antiviral, anti-inflamatória e outras, sendo que algumas dessas propriedades têm sido relacionadas com a atividade antioxidante desses compostos (CARBAJAL et al. 1996).

#### **1.4.1 Fitoterápicos com propriedades antioxidantes**

Para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais são utilizados vários métodos *in vitro* ou *in vivo*, não existindo um método satisfatório que consiga avaliar a atividade antioxidante total de uma amostra, já que existem vários mecanismos antioxidantes interferentes que podem ocorrer como o sequestro de radicais, habilidade redutora, complexação de íons metálicos e outros. Existe também certa dificuldade na comparação entre os métodos, devido à complexidade e utilização de princípios diversos nas reações (GARCÍA-ALONSO et al., 2004). Entretanto, Halliwell (1995) propôs que algumas questões usadas para avaliar a ação antioxidante *in vivo* podem ser respondidas por experimentos simples, pois concluiu que um composto que exibe baixa atividade antioxidante *in vitro* provavelmente exibirá pouca atividade *in vivo*.

O método DPPH, cujo radical foi descoberto em 1922, por Goldschmidt e Renn, possui as características de radical livre estável de cor violeta e atualmente é utilizado como reagente colorimétrico para processos de oxi-redução. Este radical, quando reduzido a seu homólogo 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPHH) se torna amarelo e a leitura espectrofotométrica pode ser feita entre 515nm e 528nm, sendo a leitura a 517nm a de maior eficiência (IONITA, 2005). Este método provou ser bastante útil em pesquisas que procuraram determinar as propriedades antioxidantes de amins, fenóis ou compostos naturais (vitaminas, extratos vegetais, medicamentos) e para inibir reações hemolíticas. Este método possui uma das metodologias mais fáceis, além de muito precisa e reprodutiva na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides (DAVID et al, 2007).

Outro método espectrofotométrico utilizado, é o método da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, originalmente descrito por Marco (1968) e modificado por

Miller (1971) que permite avaliar a capacidade de uma determinada substância de prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. A reação pode ser monitorada pela perda da coloração do  $\beta$ -caroteno em 470 nm (BROINIZI et al, 2007).

Além dos métodos espectrofotométricos existem os ensaios fluorimétricos, como o método do sequestro do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o método do sequestro do radical peroxil -Método ORAC, o método do sequestro de radical superóxido-xantina oxidase e o método do sequestro do ácido hipocloroso. Além desses métodos, ainda existem as técnicas coulométricas que baseiam-se na medida da quantidade de eletricidade ou carga requerida para oxidar ou reduzir um analito alvo (ALVES, 2010). Utilizando o método do DPPH, Lima et al (2006) avaliaram a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana, *Arctium lappa*, planta medicinal utilizada como anti-inflamatória, antisséptica e depurativa, e que apresentou atividade sequestrante de radicais DPPH acima de 90%, valor próximo ao encontrado pelo padrão de ácido ascórbico utilizado.

Pessuto et al (2009) avaliaram a atividade antioxidante de *Maytenus ilicifolia* popularmente conhecida como espinheira-santa e utilizada no tratamento de lesões gástricas (antiulcerogênica), como antiinflamatória, analgésica, cicatrizante de feridas, antiasmática, como remédio antitumoral indígena e como agente regulador da fertilidade. Os resultados mostraram que a capacidade antioxidante pelos métodos do radical DPPH e do complexo fosfomolibdênio foi diretamente proporcional ao teor de polifenóis totais encontrados no extrato bruto e fração acetato de etila da planta e encontraram uma correlação direta com a capacidade antioxidante quando comparada aos padrões vitamina C e trolox.

Rosa et al (2010) avaliaram a atividade antioxidante pelo método DPPH e o teor em compostos fenólicos totais do extrato bruto metanólico e frações das folhas da espécie *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae, conhecida como gritadeira ou douradão, utilizada principalmente em inflamações do trato urinário pela população. Apesar da baixa atividade apresentada pelo extrato bruto, a fração acetato de etila apresentou atividade moderada e o maior teor de fenólicos totais dentre as frações ensaiadas.

Grassi-Zampieron (2009) avaliaram as atividades antioxidante e captora de radicais livres, de *Achyrocline alata* (Kunth.) DC. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., espécies pertencentes à família Asteraceae, conhecidas como macela ou macela-do-brejo, utilizadas na medicina popular como antiespasmódica e anti-inflamatória, utilizando como modelo  $\beta$ -caroteno e DPPH. Tais ensaios revelaram que os extratos de *A. satureioides* foram mais ativos como captadores de radicais livres do que os extratos obtidos de *A. alata*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro* de extratos fitoterápicos produzidos na Pastoral da Saúde de Venda Nova do Imigrante (PSVNI).

### 2.2. Específicos

Selecionar fitoterápicos produzidos pela pastoral que sejam utilizados pela população no combate a síndromes clínicas que podem ter bactérias como agente etiológico, a fim de pesquisar a atividade antimicrobiana e antioxidante dessas plantas;

Selecionar um diluente para os extratos fitoterápicos, que seja inócuo às bactérias utilizadas nesta pesquisa;

Determinar a Concentração Mínima Bactericida (CMB) de cada extrato fitoterápico contra 12 espécies bacterianas causadoras de infecção, inclusive cepas multirresistentes aos antimicrobianos comumente utilizados, através da técnica de microdiluição em caldo;

Correlacionar a CMB obtida frente a todas as bactérias testadas para cada extrato vegetal com a concentração dos extratos vegetais produzidos pela PSVNI;

Selecionar pelo menos um dos extratos fitoterápicos para realizar o teste Time kill (Curva Tempo-morte) e analisar o perfil de ação do extrato frente a quatro bactérias causadoras de infecção hospitalar: MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), VRE (*Enterococcus faecalis* resistente à Vancomicina), *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL (Beta-lactamase de espectro estendido);

Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos fitoterápicos pela captura de radicais livres com o método DPPH (2,2- difenil-1 picril hidrazil).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Amostras

##### 3.1.1 Fitoterápicos

Fitoterápicos produzidos rotineiramente na forma de tintura na Pastoral da Saúde de Venda Nova do Imigrante- ES (PSVNI-ES) situada na Avenida Elizabete Perim nº 78, Bairro São Pedro, Venda Nova do Imigrante, ES, Cep. 29.375.000, foram selecionados de acordo com a indicação popular e da Pastoral para o tratamento de síndromes clínicas que poderiam apresentar bactérias como possível agente etiológico. Foi selecionada a tintura de uma planta que não apresentava nenhuma dessas indicações para servir como um controle do teste.

##### 3.1.2 Bactérias

Cada extrato fitoterápico foi analisado contra 12 amostras bacterianas, incluindo cepas resistentes a antimicrobianos comumente utilizados na clínica (Tabela 2).

**Tabela 2: Amostras bacterianas utilizadas**

Amostra	Número	Característica
<b>Gram-positivas</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Sensível à Meticilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	Sensível à Meticilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33591	(MRSA) Resistente à Meticilina
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228	Sensível à Meticilina
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 14990	Sensível a Meticilina
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	Sensível à Meticilina
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Sensível à Vancomicina
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299	(VRE) Resistente à Vancomicina
<b>Gram- negativas</b>		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC19606	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Produtora de ESBL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	

### **3.2. Coleta das plantas medicinais para a produção dos fitoterápicos e para a identificação e depósito das exsiccatas**

As plantas medicinais foram coletadas na Fazenda Experimental do INCAPER-FEVN situada na Comunidade Cachoeira alegre - Venda Nova do imigrante/ES latitude 20° e 38' sul longitude 41° 19' oeste. Para a produção dos fitoterápicos foram coletadas entre os meses de Março e Novembro de 2010, preferencialmente pela manhã. Para a identificação e depósito das exsiccatas foram coletadas entre os meses de Março, Outubro e Novembro de 2011 e Março de 2012, quando as plantas apresentavam frutos e/ou flores (FIDALGO & BONONI, 1989).

### **3.3. Identificação das plantas**

O trabalho de identificação das plantas e depósito de exsiccatas foi realizado sob a orientação da prof<sup>a</sup> Valquiria Ferreira Dutra e do técnico Stéfano Dutra, no Herbário central da UFES- VIES, situado no Campus da Universidade Federal do Espírito Santo localizado na Av. Fernando Ferrari, Goiabeiras, ES.

### **3.4. Obtenção dos extratos vegetais**

#### ***3.4.1. Produção das tinturas- formulação comercial dos fitoterápicos***

Primeiro, as plantas foram selecionadas e as que apresentavam qualquer tipo de contaminação com fungos ou pragas, visíveis a olho nu, foram descartadas. Em seguida, as plantas foram colocadas para secagem em uma sala-estufa de tamanho 4,41m x 2,81m em temperatura entre 45°C e 60°C durante quatro a trinta dias conforme a parte da planta e a espécie da planta: para folhas, de 4 a 10 dias, para cipó e casca de 15 a 20 dias, sendo avaliados os graus de secagem periodicamente. Após a secagem, as plantas foram fracionadas em partes menores e estocadas em sacos (plástico por dentro e outro de papel por fora) em sala apropriada até o processamento das mesmas. Para a produção dos extratos, as plantas secas foram trituradas no Triturador M-670 da marca Vencedora-MAQTRON. Os extratos foram produzidos entre os meses de Abril a Dezembro de 2010.



**Figura 3:** Estufa de secagem das plantas medicinais

Após a trituração, cada planta foi submetida ao seguinte procedimento para obtenção do extrato: para cada 1Kg de planta seca foi utilizado um volume total de 5L de álcool de cereais a 70%. Primeiro, adicionou-se parte do álcool de cereais a 70% até cobrir o material vegetal, deixando-se repousar por 2 horas, em recipiente fechado. Em seguida, esse material vegetal foi transferido para o percolador, aplicando-se pressão leve e uniforme e adicionando-se o restante do álcool qsp 5L, deixando-se macerar durante 8 dias. Após esse tempo, o extrato resultante da percolação foi medido e, se não resultou em um volume de 5L, adicionou-se novamente álcool de cereais sobre o material vegetal no percolador, escoando o extrato obtido até completar o volume que faltava para 5L. A técnica utilizada foi a maceração, utilizando-se de um percolador para esse processo. Os fitoterápicos foram preparados conforme a Farmacopeia Brasileira 2004, com adaptações.



**Figura 4:** Percoladores utilizados na fabricação dos extratos fitoterápicos na PSVNI

Após o período de 8 dias de percolação, o extrato/tintura obtido foi filtrado com auxílio de funil e gaze. Esse extrato foi armazenado em frasco âmbar com tampa, periodicamente distribuídos em frascos de cor âmbar com conta-gotas, de volume

final 30 mL, com o objetivo de posteriormente serem comercializados. Os frascos foram rotulados com o nome da Instituição, nome popular da planta medicinal, data do envase e data de validade de 2 anos a partir da data de produção da tintura com indicação de uso de 40 gotas três vezes ao dia para todas as preparações.



**Figura 5:** Preparo dos extratos fitoterápicos na PSVNI

### ***3.4.2 Obtenção da massa seca dos fitoterápicos***

Os frascos contendo 30mL dos fitoterápicos selecionados foram colocados em estufa entre 45°C e 60°C durante 7 a 15 dias, até a evaporação do solvente.

## **3.5. Avaliação dos diluentes**

### ***3.5.1. Avaliação da capacidade de solubilização dos diluentes***

Os seguintes diluentes, bem como possíveis misturas destes, foram avaliados quanto à sua capacidade de solubilidade dos extratos fitoterápicos: Cremophor EI® fluka-Polyoxyethylenglyceroltriricinoleat (Sigma-Aldrich), Soluphor P®- Pyrrolidona (Vetec), Dimetil sulfóxido (DMSO, Vetec) (DMSO 50%, DMSO 30%, DMSO 10% em água deionizada estéril), Álcool etílico de cereais (2,5%, 5%, 7,5% e 10% em água deionizada estéril).

Alíquota de 1mL a 2mL do diluente foi adicionada a pequena parte da massa seca obtida da tintura (cerca de 1mg) e misturada até a obtenção de uma suspensão homogênea. A mistura foi inspecionada quanto à formação de grânulos e a ocorrência de corpo de fundo após 24 horas de diluição, sem agitação, à temperatura ambiente.

Os diluentes que apresentaram melhores resultados no teste de solubilidade foram avaliados quanto à sua inocuidade, ou seja, sua ação antimicrobiana frente às bactérias listadas na tabela 1.

### ***3.5.2. Determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) do diluente***

O diluente escolhido foi avaliado quanto a sua ação antimicrobiana frente a todas as amostras bacterianas apresentadas na tabela 1. Uma alíquota de 10µL de suspensão bacteriana em salina, na concentração aproximada de  $10^6$  UFC/mL, foi inoculada em caldo Tricaseína de soja (TSB- Difco), contendo o diluente em concentrações variáveis, em um volume final de 200 µL por poço da placa de poliestireno de 96 poços. Após 24 horas de incubação a 35°C, uma alíquota de 10 µL de cada poço foi retirada e diluída serialmente em frações de 10 ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em tubos contendo salina estéril a 0,85%. Uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi espalhada com auxílio de alça de Drigalski em placas de ágar nutriente. As placas foram incubadas por 48 h a 35°C e as colônias foram contadas. Poços contendo caldo TSB e suspensão bacteriana foram utilizados como controles positivos. As concentrações do diluente que apresentaram uma redução do número de UFC/mL menor que 1 Log/mL, quando comparados aos controles positivos, foram considerados sem atividade antimicrobiana (LORIAN, 2005).

### ***3.5.3. Avaliação dos extratos e diluentes quanto a contaminação bacteriana***

Uma alíquota de 15µL de cada massa seca obtida da tintura e de cada diluente a ser testado foi semeada em ágar nutriente para avaliar possível contaminação bacteriana. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas a 35°C e avaliadas quanto á presença ou não de crescimento bacteriano.

## **3.6. Massa seca dos extratos**

Cada fitoterápico produzido como tintura, após a eliminação do solvente, ou seja, após eliminar todo o álcool contido, foi pesado em balança analítica de alta precisão para a realização dos testes de atividade antimicrobiana e antioxidante.

### **3.6.1. Solubilização da massa seca dos extratos**

Após obter a massa do extrato-seco, estes foram solubilizados em volume qsp. do diluente selecionado e as concentrações obtidas foram calculadas em mg/mL.

### **3.7. Avaliação da atividade antimicrobiana dos fitoterápicos pelo método da Microdiluição em Caldo**

Para a realização do teste de microdiluição em caldo seguiu-se o preconizado pelo CLSI, Normas M7-A6 (2003) e M7-A10(2009), com modificações. Uma alíquota de 10 $\mu$ L de suspensão de cada amostra bacteriana em salina a 0,85% ( $\sim 10^6$  UFC/mL) foi inoculada em caldo TSB contendo concentrações que variáveis de cada fitoterápico em um volume final de 200 $\mu$ L por poço. Este experimento foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços. Após 24 horas de incubação a 35°C uma alíquota de cada concentração foi semeada em placa de ágar nutriente (AN) com auxílio de alça bacteriológica descartável para verificar se houve ou não crescimento bacteriano após o tratamento com o fitoterápico. A CMB correspondeu à menor concentração em que não foi observado crescimento bacteriano nas lacas de AN após 48h de incubação. Poços contendo apenas caldo TSB mais o diluente foram usados como controle negativo e poços contendo caldo TSB mais o diluente, com suspensão bacteriana, foram usados como controle positivo de crescimento bacteriano.

### **3.8. Avaliação da cinética de morte bacteriana pela ação do fitoterápico (“time-kill curve”)**

Uma alíquota de 10 $\mu$ L de suspensão bacteriana preparada em salina a 0,85% com aproximadamente  $10^6$  UFC/mL foi inoculada em caldo Muller Hinton (Difco) contendo doses sub-inibitórias dos extratos equivalentes a 90% e 50% do valor CMB. Para cada bactéria foi realizado um controle de crescimento positivo, contendo apenas as bactérias em caldo Muller Hinton. O teste foi realizado em microplaca de poliestireno estéril de 96 poços que foram incubadas em estufa bacteriológica a 35° C (LORIAN, 2005). Após 3 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas de incubação a 35°C, alíquotas de 100  $\mu$ L foram retiradas e diluídas serialmente em salina 0,85% ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ). A partir de cada diluição, foi retirada uma alíquota de 10  $\mu$ L e espalhada com auxílio de alça de Drigalski por toda a superfície de placas contendo AN (Difco). Após as

placas serem incubadas a 35° C durante 24 h, as colônias foram contadas e os dados obtidos foram plotados em planilha Excel, calculados os valores em Log<sub>10</sub> e multiplicando-se pelo fator de diluição. A ação bactericida foi definida pela diminuição  $\geq 3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL}$ , enquanto que a ação bacteriostática foi definida como uma redução  $\geq 1 < 3 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$ , quando comparadas ao controle. A ação indiferente foi definida como uma redução  $< 1 \text{ log}_{10} \text{ UFC/mL}$ , quando comparadas ao controle positivo (LORIAN, 2005). Os extratos foram avaliados contra as amostras bacterianas relacionadas na tabela 3.

**Tabela 3: Amostras bacterianas ATCC (American type culture collection) utilizadas no teste Time-Kill**

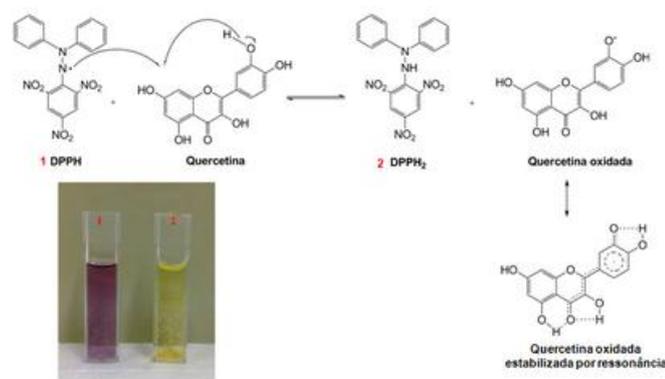
Amostra	Característica
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	Bactéria Gram-positiva/Resistente à Meticilina
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (VRE)	Bactéria Gram-positiva/Resistente à Vancomicina
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Bacilo Gram-negativo Fermentador da Glicose (BGNF)/ Produtor de ESBL (Betalactamase de espectro estendido)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	Bacilo Gram-negativo não fermentador (BGNNF)

### 3.9. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos fitoterápicos pela captura de radicais livres com o método DPPH (2,2- difenil-1 picril hidrazil)

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos fitoterápicos foi realizada segundo Scherer & Godoy (2009) e foi baseada na medida da extinção da absorção do radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH), com leitura em espectrofotômetro Biospectro SP-220 em 517 nm, utilizando cubeta de vidro. Dois mililitros de uma solução metanólica de DPPH a 0,1mM foram adicionados a 1 mL de soluções contendo concentrações crescentes de cada fitoterápico (31,25; 62,5; 125; 250; 500 µg.mL<sup>-1</sup>) em metanol. As soluções foram incubadas ao abrigo da luz durante 30 minutos. Procedeu-se da mesma forma para a preparação da solução denominada “controle”, porém, para cada 1mL da solução de DPPH foram adicionados 2mL da solução metanólica. A solução denominada “branco” foi preparada em concentração 1:2 (v:v), utilizando-se as soluções dos extratos nas diferentes concentrações em metanol, sem DPPH. A alteração da coloração roxa do DPPH para amarela é indicativo de atividade antioxidante. Todas as leituras foram realizadas em triplicata

e, com a média dos dados obtidos, foi calculada a diferença de absorvância entre a amostra e o branco. O teste de atividade antioxidante dos extratos foi comparado com a substância padrão Quercetina. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados de atividade antioxidante que apresentaram probabilidade de ocorrência de hipótese de nulidade menor que 5% ( $p < 0,05$ ) aplicando-se o teste ANOVA de Análise de Variância. O percentual de captação ou redução do radical DPPH foi calculado conforme a equação abaixo (SANTOS et al, 2011). O método DPPH se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura, tornando-se amarelo. Este método avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes.

$$\% \text{ redução do DPPH} = [(Abs. Amostra - Abs. Branco) / Abs. branco] \times 100$$



**Figura 6:** Redução do radical livre DPPH pelo flavonóide antioxidante quercetina

Fonte: <http://qnint.s bq.org.br>

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Seleção e produção dos fitoterápicos

A PSVNI produz mais de setenta fitoterápicos sob a forma de extratos etanólicos/tinturas. Destes, foram selecionados oito fitoterápicos com indicações de antibiótico, anti-inflamatório e antisséptico a partir das plantas medicinais de nome popular: angico, algodoeiro, chapéu-de-couro, cipó-mil-homens, erva baleeira, guaçatonga, mil em ramos e tansagem. A seleção dos extratos foi baseada nas indicações populares de uso dessas plantas, através de questionamento informal das propriedades dessas plantas à pessoas idosas, da comunidade em geral e dos funcionários da PSVNI.



**Figura 7:** Extratos fitoterápicos produzidos na PSVNI

Dos fitoterápicos escolhidos apenas um, Cipó Mil Homens, não apresentava indicação como antisséptico, antimicrobiano ou anti-inflamatório, de acordo com a PSVNI, e pode servir, então, como um controle dos testes, seja confirmando a eficácia da técnica de um modo geral, seja confirmando as indicações propostas aos fitoterápicos. Os resultados obtidos confirmaram que o Cipó Mil Homens não apresenta ação antimicrobiana nas concentrações avaliadas.

As principais indicações das plantas utilizadas na produção dos fitoterápicos selecionados estão relacionadas na tabela 4:

**Tabela 4: Plantas medicinais selecionadas e principais indicações de uso popular**

<b>Planta</b>	<b>Indicações</b>
algodoeiro	Anti-inflamatório, antimicrobiana, antidisentérica, antivirótica, etc
angico	Antigonorreica, antidiarreica, bactericida, combate bronquite, fortificante, analgésica, antirraquítica, anti-hemorrágica, etc
chapéu de couro	Depurativa, para ácido úrico elevado, antimicrobiana (acne, furúnculos), etc
cipó-mil- homens	Anti-tabagismo, vasodilatador, diurético, sedativo, etc
erva baleeira	Antimicrobiana, anti-inflamatória (em casos de artrite, gota), cicatrizante, etc
guaçatonga	Estomáquico, anti-hipertensivo, antiviral (contra herpes labial), antimicrobiana, etc
mil em ramas	Hemorragia uterina, problemas do fígado, antibiótica, analgésica, afecções da pele (abscessos, feridas eczemas), etc
tansagem	Anti-inflamatória, antimicrobiana, depurativa, emoliente, tônica, etc

A tabela 5 relaciona as partes de cada planta utilizadas na fabricação dos fitoterápicos e o tempo gasto para secá-las de acordo com a técnica utilizada na Pastoral.

**Tabela 5: Partes da planta utilizadas na fabricação dos fitoterápicos e tempo de secagem na estufa**

<b>Planta</b>	<b>Parte da planta utilizada para fabricação da Tintura</b>	<b>Tempo de secagem</b>
algodoeiro	Folhas	7 a 10 dias
angico	Casca	20 a 30 dias
chapéu de couro	Folhas	7 a 10 dias
cipó mil homens	Folhas	7 a 10 dias
	Cipó	15 a 20 dias
erva baleeira	Folhas	7 a 10 dias
guaçatonga	Folhas	7 a 10 dias
mil em ramas	Folhas	4 a 7 dias
tansagem	Folhas	7 a 10 dias

De acordo com a FB-FF o tempo de secagem para as partes das plantas mencionadas pode ser menor que o relatado, de 2 a 5 dias conforme a planta, reduzindo, portanto, custos na produção dos fitoterápicos.

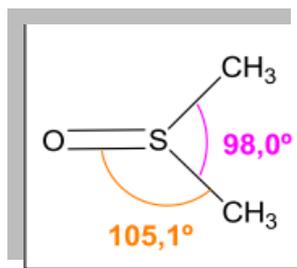
#### 4.1.1. Avaliação dos diluentes

Dos diluentes avaliados, o que apresentou melhor solubilidade foi o Dimetil sulfóxido (DMSO, Vetec) a 50% e o álcool de cereais a 15%. Entretanto, o DMSO 30% e o DMSO a 10% também demonstraram solubilidade satisfatória, desde que utilizados em maior volume. Optou-se pelo uso do DMSO a 10%, já que o álcool de cereais a partir de 15% e o DMSO a partir de 50% reduziram o crescimento das espécies bacterianas avaliadas, apesar de terem sido os diluentes que demonstraram melhor solubilidade. A presença do DMSO juntamente com a água nas proporções 3/7 e 1/9 melhorou a solubilidade dos extratos.



**Figura 8:** Avaliação da solubilidade dos diluentes

Desta forma, o DMSO a 10% foi selecionado como diluente-padrão dos extratos e foi avaliado quanto à capacidade de interferir na taxa de crescimento microbiano conforme a técnica de determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) do diluente. O ensaio realizado demonstrou que o DMSO a 10% não reduziu o crescimento das 12 cepas bacterianas testadas. O teste foi realizado em duplicata. Portanto, para fins de padronização do diluente e para melhor fluxo do trabalho, foi utilizado DMSO a 10% (em água deionizada estéril) na diluição de todos os extratos secos. O teste utilizado para avaliar a CMB do diluente foi o preconizado por Lorian (2005), com modificações.



**Figura 9:** Estrutura química do DMSO

O DMSO é um composto químico orgânico de fórmula  $C_2H_6SO$  (ROSENBAUM, 1965), peso molecular 78,13 g/mol (CARPENTER, 1994) e temperatura de congelamento  $18,5^\circ C$  (BRAYTON, 1986). A elevada capacidade higroscópica decorre da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que as formadas entre moléculas de água. Existem trabalhos que pesquisaram a atividade antimicrobiana de diversas substâncias utilizando o DMSO PA como solvente de extratos vegetais, alcançando uma concentração por vezes superior a 50% nos testes. Carvalho et al (2002) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. (goiabeira) sobre bactérias Gram-negativas utilizando DMSO como solvente e verificando que o mesmo não interferia no crescimento das bactérias em teste. Da mesma maneira, Rabanal et al (2002) e Okeke et al(2001) também utilizaram o DMSO como controle negativo de atividade antimicrobiana em testes de avaliação de atividade antimicrobiana *in vitro*. Entretanto, de acordo com Bonacorsi (2009) concentrações superiores a 1,5 % de DMSO interferiram na taxa de crescimento de *Helicobacter pylori*. Camargo (2008) utilizou DMSO em concentrações não superiores a 4% para não interferir no crescimento de *S. aureus* em testes que avaliaram o efeito da Quercetina sobre os fatores de virulência, seguindo o proposto por Devienne (2002). De qualquer forma, na presente pesquisa, a concentração de DMSO nos testes não ultrapassou 7,5%, considerando o volume final após a adição do meio de cultura.

#### 4.2 Coleta e identificação das plantas medicinais

Após a seleção dos fitoterápicos, as plantas cujos extratos fitoterápicos foram selecionados foram coletadas na Fazenda Experimental do INCAPER- VNI (FEI-VNI) para a realização da identificação botânica e depósito de exsiccatas. Com a finalidade de identificar e confirmar sua identificação, as plantas medicinais coletadas na FEI-

VNI foram encaminhadas ao herbário central da UFES-VIES, para que as mesmas fossem catalogadas gerando seus números de registro, já que os herbários são coleções de plantas secas, ou seja, é local de depósito de coleções antigas, local de pesquisa e fonte de dados (MENTZ & BORDIGNON, 2008).

A tabela 6 apresenta as plantas com seus nomes científicos e populares e o número de registro dos depósitos das exsicatas realizadas no Herbário Central da UFES-VIES:

**Tabela 6: Identificação botânica e depósito das exsicatas**

Nome popular	Nome científico	Nº do depósito das exsicatas (nº de tomo/ nº de coleta)
angico	<i>Anadenanthera colubrina</i> ( Vell.) Brenan	Provisório/ Baptista, L.B.M.08
mil em ramas	<i>Achillea millefolium</i> L.	26201/ Baptista, L. B. M. 01
cipó mil homens	<i>Aristolochia cymbifera</i> Mart.	26207/ Baptista, L. B. M. 07
guaçatonga	<i>Casearia sylvestris</i> Sw.	26202/ Baptista, L. B. M. 02
erva baleeira	<i>Cordia verbenacea</i> DC.	26203/ Baptista, L. B. M. 03
chapéu de couro	<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham.& Schltldl.) Micheli	26206/ Baptista, L. B. M. 06
algodoeiro	<i>Gossypium hirsutum</i> L.	26205/ Baptista, L. B. M. 05
tansagem	<i>Plantago major</i> L.	26204/ Baptista, L. B. M. 04

De acordo com Verdam & Silva (2010) a falta de identificação botânica ou a identificação botânica incorreta pode anular todo um trabalho de pesquisa. Além disso, pode gerar informações incorretas, levar a conclusões errôneas, inclusive ao uso indevido de uma espécie, já que muitos são os casos de intoxicação com plantas. Isto devido a semelhanças morfológicas entre espécies que podem levar ao consumo de uma espécie quando se pretende consumir outra. Portanto, ao realizar a identificação botânica das plantas medicinais minimizam-se os riscos de intoxicação ou reações adversas. A identificação é aspecto importante também no reconhecimento da flora nativa de uma região, principalmente quando se tratar de espécies ameaçadas de extinção. As espécies identificadas corresponderam aos nomes populares comumente atribuídos a elas.

### 4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

As massas secas obtidas das tinturas foram diluídas em volume de DMSO 10% qsp, e foram calculadas as concentrações de cada uma, para servirem de padrão para a realização dos testes, conforme a tabela 7. Este cálculo foi útil para determinar as faixas de concentrações dos extratos para a realização dos testes de atividade antimicrobiana.

**Tabela 7: Cálculo das concentrações obtidas da massa seca das tinturas após a diluição em DMSO 10%, em mg/mL**

Tintura	Rendimento (Massa seca da tintura)	Volume de solvente (DMSO 10%) gasto em mL para diluir a massa seca da tintura	Concentração obtida em mg/ mL (Rend / vol. de solvente)
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan (angico)	a- 7,27g b- 7,50g	50 50	145 150
<i>Achillea millefolium</i> L. (mil em ramas)	a-1,15g	12,6	91
<i>Aristolochia cymbifera</i> Mart. (cipó mil homens)	a- 1,74g	6	290
<i>Casearia sylvestris</i> Sw. (guaçatonga)	a- 1,23g	9	137
<i>Cordia verbenacea</i> DC. (erva baleeira)	a-0,97g	8	121
	b-0,87g	7	124
	c-0,72g	5	144
<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham.& Schltl.) Micheli (chapéu de couro)	a-0,97g	7	138
<i>Gossypium hirsutum</i> L. (algodoeiro)	a-0,77g	7	110
<i>Plantago major</i> L. (tansagem)	a-1,2g	8	150

Sendo: a- primeira amostra, b- segunda amostra, c- terceira amostra

De acordo com os testes realizados nesta pesquisa, foram encontrados os valores de CMB descritos nas tabelas 8 e 9:

Tabela 8: CMB (Concentração mínima bactericida) em mg/mL de 8 extratos fitoterápicos contra bactérias Gram-positivas

Bactérias Plantas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (VRE)
<i>Anadenanthera colubrina</i> (angico)	>10≤12	>10≤12	>14≤20	>8≤15	>8≤15	>14≤24	>15≤24	>15≤24
<i>Achillea millefolium</i> (mil em ramas)	>35≤45	>35≤45	>35≤45	>35≤45	>35≤45	>35≤45	>35≤45	>35≤45
<i>Aristolochia cymbifera</i> (cipó mil homens)	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<i>Casearia sylvestris</i> (guaçatonga)	>50≤68	>50≤68	>50≤68	>50≤68	>50≤68	>50≤68	>68≤86	>68≤86
<i>Cordia verbenacea</i> (erva baleeira)	>4≤6	>4≤6	>5≤12	>5≤12	>5≤10	>5≤12	>20≤25	>20≤25
<i>Echinodorus grandiflorus</i> (chapéu de couro)	>21≤52	>21≤52	>52≤60	>52≤60	>52≤60	>52≤60	>52≤60	>52≤60
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodoeiro)	>40≤55	>40≤55	>55≤70	>55≤70	>55≤70	>60≤70	>60≤70	>60≤70
<i>Plantago major</i> (tansagem)	>50≤55	>50≤55	>50≤55	>50≤55	>50≤55	>45≤55	>50≤55	>50≤55

Tabela 9: CMB (Concentração mínima bactericida) em mg/mL de 8 extratos fitoterápicos contra bactérias Gram-negativas

Bactérias	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC19606	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
<i>Anadenanthera colubrina</i> (angico)	>25≤30	>16≤30	>18≤25	>18≤25
<i>Achillea millefolium</i> (mil em ramas)	>35≤45	>35≤45	>35≤45	>35≤45
<i>Aristolochia cymbifera</i> (cipó mil homens)	>250	>250	>250	>250
<i>Casearia sylvestris</i> (guaçatonga)	>60≤68	>60≤86	>60≤68	>60≤68
<i>Cordia verbenacea</i> (erva baleeira)	>20≤25	>20≤25	>20≤45	>20≤45
<i>Echinodorus grandiflorus</i> (chapéu de couro)	>60≤70	>60≤86	>60≤70	>60≤70
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodoeiro)	>60≤70	>60≤70	>60≤70	>60≤70
<i>Plantago major</i> (tansagem)	>50≤55	>50≤55	>50≤55	>50≤55

Os extratos selecionados como antimicrobianos e/ou anti-inflamatórios mostraram atividade antimicrobiana significativa frente às bactérias testadas, inclusive contra as cepas multirresistentes. Com exceção do cipó- mil- homens, cuja CMB foi maior que 250 mg/mL, demonstrando um resultado esperado para esse extrato, já que o mesmo não é indicado como antimicrobiano, todos os demais extratos mostraram CMB entre 4 e 86 mg/mL para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os maiores valores de CMB foram encontrados para as bactérias Gram-negativas e as multirresistentes. A maior resistência das bactérias Gram-negativas à ação do extrato pode ser devido às diferenças na composição da parede celular e membrana externa. A membrana externa da bactéria Gram-negativa possui natureza lipídica composta por lipopolissacarídeos a Gram-positiva apresenta uma camada de peptidoglicano. (TAVARES, 2009).

Os extratos angico e erva baleeira foram os que apresentaram os melhores valores de CMB frente às 12 bactérias testadas. O angico apresentou valores de CMB  $\leq 12$ mg/mL para MRSA,  $\leq 24$ mg/mL para VRE,  $\leq 25$ mg/mL para *K. pneumoniae* ESBL+. O extrato de erva baleeira apresentou valores de CMB  $\leq 20$ mg/mL para MRSA,  $\leq 25$ mg/mL para o VRE e  $\leq 45$ mg/mL para *K. pneumoniae*. O extrato de angico foi o que apresentou menor variação de CMB para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com valores de CMB entre 8 mg/mL e 30 mg/mL, seguido do extrato de erva baleeira que apresentou valores de CMB entre 4 mg/mL e 45 mg/mL.

Para definir esses valores de CMB foi utilizada a técnica de Microdiuição em caldo que permite, além de avaliar se o extrato possui atividade antimicrobiana, descobrir as faixas de concentrações em que o extrato apresenta esta atividade. Eloff (1998) utilizou esta técnica para verificar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e observou que compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise visual. No entanto, este mesmo autor concluiu que o método de microplacas é barato, tem reprodutibilidade, permite a realização de várias réplicas, o que aumenta a confiabilidade dos resultados, e é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura. Além disso,

requer pequena quantidade de reagentes, pode ser usado para grande número de amostras e deixa um registro permanente (OSTROSKY et al, 2008). Quando se avalia a CMI é possível verificar se houve inibição de crescimento bacteriano através da leitura da turvação do caldo. Esta leitura pode ser realizada a olho nu ou com o auxílio de um espectrofotômetro (CLSI, 2003). No caso dos extratos em teste, essa leitura visual não foi possível devido à variação de coloração dos extratos, entre castanho escuro, castanho avermelhado, verde escuro e verde claro. As cores variavam também entre as diferentes concentrações testadas para o mesmo extrato, o que dificultaria, novamente, uma leitura por espectrofotômetro. Além disso, a leitura de turbidez não pode ser realizada já que alguns extratos, quando diluídos no caldo, tornaram o meio de cultura turvo.

**Figura 10:** Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo.



\*Note a diferença na coloração de um mesmo extrato em diferentes concentrações (Linhas C a G), o controle negativo de crescimento bacteriano (Linha A) e a turbidez do controle de crescimento bacteriano (linha H) na microplaca de cultura.

Para o extrato de *A. colubrina* foram encontrados valores de CMB entre 10 e 24 mg/mL para bactérias Gram-positivas e entre 16 e 30 mg/mL para bactérias Gram-negativas. Com relação às bactérias multirresistentes foram encontrados os seguintes valores de CMB: MRSA  $>14 \leq 20$  mg/mL, VRE  $>15 \leq 24$  mg/mL, *K. pneumoniae* (ESBL)  $>18 \leq 25$  mg/mL, valores bastante próximos.

De acordo com Matos (1997) o angico vem sendo utilizado de diversas formas na medicina popular como o decocto da casca para a preparação de xaropes

usados no tratamento das tosses, coqueluches e bronquites, a maceração da casca utilizada no tratamento de inflamações e leucorréias, e preparações com álcool ou cachaça utilizadas em ferimentos externos, agindo como hemostático e cicatrizante. Mors et al.(2000) relataram evidente atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos da espécie *A. colubrina*, enquanto Gonçalves et al (2005) não observaram atividade antimicrobiana desta planta realizando o método da difusão em ágar. Dantas et al (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de *A. colubrina* contra cepas de *S. aureus* obtendo atividade significativa na concentração 3,12%. Gonçalves et al (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana de 22 extratos vegetais de árvores medicinais brasileiras utilizando o método de difusão em ágar contra *E. coli* enteropatogênica, *Shigella sonnei* e *Salmonella* spp, entretanto não observaram atividade antimicrobiana para o extrato de *A. colubrina* utilizando esta técnica.

Essa variação de resultados pode estar relacionada ao MS produzido, cuja produção pelo vegetal pode variar com o ambiente de plantio, época de colheita, e ainda podendo variar de acordo com a parte da planta escolhida para a produção do extrato, com o solvente de extração utilizado, bem como da difusão ou não da substância no ágar solidificado. Por outro lado, os resultados de CMB do angico encontrados nesta pesquisa demonstraram a potencial atividade antimicrobiana dessa planta. Além disso, por falta de maiores estudos, o angico ainda não faz parte do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 1ª Edição (FB-FF), por isso sugere-se maiores estudos com esta planta e dos fitoterápicos produzidos a partir da mesma, como por exemplo, avaliação da toxicidade *in vivo*, testes de atividade anti-inflamatória, teste de mutagênese, dentre muitos outros.

O angico, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, é uma árvore de até 25m de altura, com tronco desprovido de espinhos com casca de coloração pardo-escura sendo uma espécie pioneira, característica da mata secundária de regiões acima de 400m de altitude, ocorrendo desde o Maranhão até a Argentina e Goiás. Sua casca possui sabor amargo, com propriedades

adstringentes, depurativas, sendo muito utilizada nas afecções das vias respiratórias de um modo geral (ESALQ- USP, 2003).

**Figura 11: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, angico.**



Foto: <http://belezadacaatinga.blogspot.com.br>

Para a *C. verbenacea* DC., erva baleeira, foram encontrados valores de CMB entre 4 e 25 mg/mL para bactérias Gram-positivas e entre 20 e 45 mg/mL para bactérias Gram-negativas. Com relação às bactérias multirresistentes foram encontrados os seguintes valores de CMB: MRSA  $>5 \leq 12$  mg/mL, VRE  $>20 \leq 25$ mg/mL, *K. pneumoniae* (ESBL)  $>20 \leq 45$  mg/mL.

Na FB-FF a *C. verbenacea* DC., possui indicação como anti-inflamatório sob a forma de preparação extemporânea (infusão de folhas secas) bem como sob a forma de pomada a partir do extrato hidroalcoólico, com a indicação de anti-inflamatório em dores associadas a músculos e tendões. Não existe a prescrição de seu extrato e/ou tintura para o uso oral como anti-inflamatório e/ou antimicrobiano. Matias et al (2010) verificaram atividade antimicrobiana em extratos de *C. verbenacea* contra linhagens de *E. coli* e *S. aureus* pela técnica de microdiluição em caldo. Também realizaram prospecção fitoquímica encontrando a presença de fenóis, taninos, antocianinas e antocianidinas no extrato metanólico das folhas desta planta. Através do teste de difusão em ágar De Pinho et al (2012) verificaram atividade antimicrobiana de extrato hidroalcoólico da planta contra *S. aureus*, na prospecção fitoquímica encontraram flavonoides (flavanonas, flavanonóis), saponinas, taninos e taninos caquéticos. Sertié et al (1991) avaliaram os extratos de *C. verbenacea* e

encontraram baixíssima toxicidade gástrica dos extratos das folhas da planta. Com relação à sua atividade anti-inflamatória, a indústria farmacêutica Aché lançou no mercado uma pomada cujo princípio ativo é o óleo essencial desta planta cujo princípio ativo caracterizado é o alfa-humuleno, de nome comercial Acheflan®.

A erva baleeira é uma planta originária do Brasil, um arbusto muito ramificado que atinge até 3 metros de altura, possui folhas de margens dentadas de coloração verde escura e flores brancas pequenas e reunidas em espigas laterais, os frutos são pequenos, arredondados e de cor vermelho-escuro. Em sua composição química ocorre a presença de óleos essenciais, flavonoides, alantoína e açúcares (EMBRAPA, 2006).

**Figura 12: erva baleeira, *Cordia Verbenacea DC.***



Foto: [http://www.campinas.snt.embrapa.br/plantasMedicinais/erva\\_baleeira.pdf](http://www.campinas.snt.embrapa.br/plantasMedicinais/erva_baleeira.pdf)

O extrato de mil em ramas também apresentou valores de CMB baixos,  $> 35 \leq 45$ , inclusive, demonstrou valores de CMB idênticos para todas as bactérias, não diferindo entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, não diferindo também para as multirresistentes.

A *Achillea millefolium* L., mil em ramas, é uma planta da família Asteraceae, conhecida popularmente também como mil-folhas e erva-do-carpinteiro. Tem sido utilizada na medicina popular desde a antiguidade com várias finalidades: anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, entre outras (BALBACH, 1985). É uma das plantas medicinais mais estudadas em todo o mundo, tendo reconhecidas várias de suas propriedades. Está presente na FB-FF com

indicações como antidiarréico, antiflatulento, anti-inflamatório, colerético e antiespasmódico, entretanto, observa-se a ausência de sua indicação como antimicrobiano. GIARETTA et al (2007) compararam a atividade antimicrobiana dos sabonetes contendo Digluconato de Clorexidina, Triclosan e óleo essencial de *Achillea millefolium* L. e concluíram que os resultados obtidos demonstraram um poder inibitório total do triclosan frente aos microorganismos testados e observou-se poder inibitório superior do óleo essencial de *Achillea millefolium* L. na concentração de 2,0% em relação ao sabonete de digluconato de clorexidina, muito utilizado em ambientes hospitalares. No entanto, Woods-Panzaru et al (2009) não observaram atividade antimicrobiana de *A. millefolium* contra bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Bacillus* utilizando a técnica de disco difusão. Souza et al (2006) encontraram a presença de taninos e saponinas nas folhas de *A. millefolium* e não observaram atividade antimicrobiana no extrato etanólico desta planta através da técnica de diluição em ágar. Fathiazad & Lotfipour (2003) encontraram atividade antimicrobiana do extrato clorofórmico de *A. millefolium* contra espécies de *S. aureus* através da técnica de difusão em disco. Em um artigo mais recente Yakhkeshi et al (2012) avaliaram os efeitos da interação da *A. millefolium* com um antibiótico sobre crescimento de frangos para abate e concluíram que utilizando 3% deste extrato na alimentação diária dos frangos, este foi capaz de reduzir a taxa de colesterol do sangue, induzir resposta imune, e levou à redução de bactérias patogênicas no aparelho digestivo das aves, podendo ajudar na melhora da saúde intestinal. Os resultados corroboram o entendimento de que a produção dos MS responsáveis pela atividade antimicrobiana de *A. millefolium* devem estar relacionados ao local de plantio e condições de cultivo.

Dentre os demais fitoterápicos avaliados, o extrato de tansagem foi, em seguida, o que apresentou menor CMB para todas as 12 espécies bacterianas, seguida de chapéu-de-couro e algodoeiro.

Para a *P. major*, tansagem, foram encontrados valores de CMB entre 50 e 55 mg/mL para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Com relação às

bactérias multirresistentes também foram encontrados os valores de CMB entre 50 e 55 mg/mL.

A tansagem, *Plantago major* L., é uma planta herbácea que ocorre espontaneamente nas regiões de clima temperado ou subtropical, sendo facilmente cultivada no Brasil. Popularmente é utilizada no tratamento de inflamações de boca e garganta, infecções intestinais e como agente antibacteriano (BALBACH, 1985). O infuso das folhas é usado como gargarejo no combate às inflamações da boca, garganta, gengivas sangrentas e parotidites. Freitas et al (2002) avaliaram a atividade antimicrobiana da tansagem frente a 12 espécies de *S. aureus* isolados clínicos, utilizando a técnica da difusão em meio sólido. Obtiveram resultado bastante significativo do extrato hidroalcoólico do *P. major* comparada à solução padrão de ciprofloxacina. Sharifa et al (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos metanólico, etanólico e aquoso de *P. major* contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans*, e *C. tropicalis*. Teste de sensibilidade foi feito usando difusão de disco e os efeitos positivos dos extratos observadas com microscopia eletrônica de varredura. Os extratos metanólico e etanólico 100-200 mg/mL mostraram atividade bactericida contra as bactérias Gram-positiva e Gram-negativas bacterias testadas, e os extratos causaram alterações significativas na parede celular das bactérias. A tansagem possui monografia na FB-FF com indicação de preparação extemporânea como antisséptico e anti-inflamatório da cavidade oral, utilizado apenas sob as formas de bochecho e gargarejo, não sendo aconselhada para uso interno.

Para o *E. grandiflorus*, chapéu-de-couro, foram encontrados valores de CMB entre 21 e 60 mg/mL para bactérias Gram-positivas e entre 60 e 70 mg/mL para bactérias Gram-negativas. Com relação às bactérias multirresistentes foram encontrados os seguintes valores de CMB para: MRSA e VRE  $>52 \leq 60$  mg/mL, *K. pneumoniae* (ESBL)  $>60 \leq 70$  mg/mL.

O chapéu-de-couro, *Echinodorus grandiflorus* (Cham.& Schltl.) Micheli, uma espécie nativa brasileira, conhecida vulgarmente por chapéu-de-couro, chá-mineiro, erva-de-bugre, dentre outros, é amplamente utilizada na medicina

popular nas regiões sudeste e centro oeste. Suas folhas são utilizadas popularmente para o tratamento de reumatismo, sífilis, e também empregadas como diurética e para diminuição de ácido úrico (NUNES et al., 2003). Estudos sobre a composição química da espécie têm demonstrado a presença de polifenóis, flavonóides e diterpenos (SHIGEMORI et al., 2002; PIMENTA et al., 2000; KOBAYASHI et al., 2000; LEITE, 1995) e a toxicidade do extrato aquoso das folhas foi analisada por LOPES et al. (2000), em experimentos realizados com ratos, mostrando a ausência de efeito genotóxico. A monografia do chapéu-de-couro consta na FB-FF como preparação extemporânea sob a forma de infusão indicada como diurético leve e anti-inflamatório. Entretanto, não existe na FB-FF indicação como antimicrobiano. Duarte et al (2002) através do teste de difusão em disco observou atividade antimicrobiana de *E. grandiflorus* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Duarte et al (1999; 2002) observaram atividade antimicrobiana do extrato aquoso desta planta sobre *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e do extrato metanólico das folhas sobre *S. aureus*, enquanto Souza et al (2004) observou esta atividade contra *Micrococcus luteus*. Babicz et al (2006) observou atividade antimicrobiana no extrato acetônico de *E. grandiflorus*.

Para o extrato de *G. hirsutum* L., algodoeiro, foram encontrados valores de CMB entre 40 e 70 mg/mL para bactérias Gram-positivas e entre 60 e 70 mg/mL para bactérias Gram-negativas. Com relação às bactérias multirresistentes foram encontrados os seguintes valores de CMB: MRSA > 55 ≤ 70 mg/mL, VRE > 60 ≤ 70mg/mL, *K. pneumoniae* (ESBL) > 60 ≤ 70 mg/mL.

O algodoeiro, é uma planta arbustiva da família Malvaceae, que pode medir até 7 metros de altura, cujo gênero *Gossypium* apresenta cerca de 40 espécies (USDA, 2012). Utilizada pela população como anti-inflamatório, principalmente indicado para afecções no sistema urinário e ginecológico, entretanto, existem poucos estudos em relação às atividades biológicas dos extratos desta planta, a maior parte dos estudos são direcionados à sua utilização na agropecuária por se tratar de uma planta muito utilizada na produção de óleos e fabricação de alimentos e cosméticos e, principalmente, utilizada na indústria têxtil. A planta não possui monografia na FB-FF. Os resultados obtidos indicam que

CMB do extrato hidroalcoólico está entre 60 e 70 mg/mL tanto para as bactérias Gram-positivas quanto para as bactérias Gram-negativas utilizadas neste estudo. Omojasola & Awe (2004) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *G. hirsutum* L. através da técnica de difusão em disco usando uma concentração de 200mg/mL e obtendo ação contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* e *Salmonella typhimurium*.

Para o extrato de *C. sylvestris*, guaçatonga, foram encontrados valores de CMB entre 50 e 86 mg/mL para bactérias Gram-positivas e entre 60mg/mL e 86 mg/mL para bactérias Gram-negativas. Com relação às bactérias multirresistentes foram encontrados os seguintes valores de CMB: MRSA > 50 ≤ 68 mg/mL, VRE > 68 ≤ 86mg/mL, *K. pneumoniae* (ESBL) > 60mg/mL ≤ 68mg/mL.

A guaçatonga é um arbusto que alcança até 6m de altura sendo nativa de quase todo o Brasil, principalmente em florestas secundárias. Pertence à família Salicaceae, família que também abrange o gênero *Salix*, do qual foi obtido originalmente o ácido salicílico (SILVA JUNIOR, et al, 2005). Também conhecida popularmente como erva-de-bugre, erva-de-lagarto e cafezinho do mato é indicada como antidiarréica, anti-febril, depurativa, anti-reumática, nas afecções da pele e nas mordeduras de cobras (especialmente com peçonha proteolíticas, como jararaca e cascavel). Possui monografia na FB-FF como preparação extemporânea sob a forma de infusão, indicada apenas como antidiarréico, sendo advertido seu uso para gestantes e lactantes. Schneider et al (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana das folhas de *C. sylvestris* e foram testados o extrato bruto e as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e o óleo essencial e todos demonstraram atividade antimicrobiana. Entre as frações testadas, a hexânica apresentou melhor CMI frente a *S. aureus* e óleo essencial apresentou atividade bacteriostática e bactericida frente *E. coli*. Güntzel (2008) pesquisou a atividade antimicrobiana desta planta através do teste de bioautografia, para o óleo essencial e da microdiluição para extratos aquoso e etanólico obtendo resultados expressivos contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Portanto, o extrato fitoterápico dessa

planta também pode se revelar promissor no uso contra síndromes que apresentem bactérias como agente etiológico.

A atividade antimicrobiana de *A. cymbifera* não foi observada, alcançando CMB superior a 250 mg/mL para todas as bactérias testadas, sendo que a concentração máxima obtida do extrato foi de 290 mg/mL.

A planta cipó mil homens, *Aristolochia cymbifera* Mart., é nativa do Brasil, pertence à família Aristolochiaceae, cujo gênero *Aristolochia* compreende cerca de 300 espécies. Também conhecida popularmente como cipó-jarrinha, cipó-de-cobra e cassaú. É uma planta trepadeira, herbácea perene, caracteristicamente vigorosa, melhor adaptada a ambientes quentes. Na medicina popular o uso é bastante amplo, com a utilização das folhas, caules e raízes. É considerada como diurética, sedativa, anti-séptica, emenagoga, anti-anoréxica e anti-dispéptica (LORENZI & MATOS, 2008). Estudos fitoquímicos realizados com plantas desse gênero evidenciaram a presença de alcaloides, ácidos aristolóquicos, flavonoides, ésteres fenólicos e óleos voláteis (EVANS, 1996).

No uso empírico, os fitoterápicos selecionados têm sido utilizados em doses diárias aproximadas de 6mL. Para obter um efeito antimicrobiano a dose diária deverá ser maior ou igual à maior CMB obtida para o conjunto de bactérias analisadas neste estudo, isso se considerarmos que serão usadas para combater síndromes clínicas causadas por esses agentes. Quanto menor for o valor de CMB ou CMI para o agente antimicrobiano, melhor será a chance de eficiência do antimicrobiano, mesmo desconsiderando as propriedades de PK em relação à distribuição e disponibilidade. Essa consideração pode ser feita uma vez que estes fitoterápicos já apresentam propriedades antimicrobianas atribuídas ao uso empírico.

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais tem sido atribuída a pequenos terpenoides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e outros, e, apesar dos mecanismos de ação não estarem totalmente elucidados, parece estar associado ao caráter lipofílico dos compostos, havendo um acúmulo destes compostos nas membranas dos microrganismos ocasionando

perda de energia pelas células (DIDRY et al, 1993; CONNER, 1993; SMID et al, 1996).

Ainda é importante ressaltar que os resultados obtidos estão relacionados à CMB e provavelmente, os valores de CMI podem ser de duas a quatro vezes menores que os valores encontrados, o que caracteriza uma atividade antimicrobiana satisfatória frente aos microrganismos utilizados nesta pesquisa. A CMI é definida como uma concentração mínima de antimicrobiano que impede uma suspensão de aproximadamente  $10^5$  UFC /mL de tornar-se turva após incubação durante a noite (12 a 18 horas). A turbidez geralmente indica, pelo menos, um aumento de dez vezes a densidade bacteriana, porque suspensões bacterianas claras podem ter bactérias com densidades de menos que  $10^5$  UFC/mL, assim, a CMI determinada pela diluição do caldo pode realmente ser bactericida em certa medida. Se a concentração mínima de antimicrobiano que impediu a turbidez realmente reduziu a densidade bacteriana de  $10^5$  a pelo menos  $10^2$  UFC/mL (ou seja, 99,9% [3-log<sub>10</sub>] de redução de inóculo bacteriano), a CMI que impediu a turbidez também é a CMB. Como não foi possível avaliar a turbidez do crescimento bacteriano devido à coloração verde ou castanha dos extratos, foi avaliada a CMB e não a CMI. Se a CMB de um antibiótico sobre uma estirpe bacteriana é próxima da CMI (CMB/CMI = 1 ou 2), o antibiótico é considerado bactericida. Se a CMB de um antibiótico é muito elevada em relação à CMI (CMB/CMI = 4 a 16), o antibiótico é considerado bacteriostático. Em ambas as situações, os resultados obtidos de CMB dos extratos sugerem que suas CMI ainda poderiam ter valores duas ou até quatro vezes menores que os valores encontrados, corroborando para o resultado de os extratos serem ainda mais eficientes frente aos microrganismos testados (LORIAN, 2005; LEVISON, 2004).

#### 4.4 Comparação dos maiores valores das CMB de cada extrato fitoterápico com a concentração encontrada nas formulações da PSVNI

**Tabela 10: Comparação do maior valor de CMB obtido no teste de atividade antimicrobiana com a concentração encontrada nas formulações produzidas na PSVNI.**

Tintura	Maior valor de CMB para o conjunto das 12 bactérias testadas	Concentração aproximada obtida da formulação comercial da PSVNI (frasco com 30mL)
<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan (angico)	30mg/mL	246,7 mg/mL
<i>Achillea millefolium</i> L. (mil em ramas)	45mg/mL	38 mg/mL
<i>Aristolochia cymbifera</i> Mart. (Cipó Mil Homens)	>250mg/mL	58 mg/mL
<i>Casearia sylvestris</i> Sw. (guaçatonga)	86mg/mL	41 mg/mL
<i>Cordia verbenacea</i> DC. (erva baleeira)	45mg/mL	28 mg/mL
<i>Echinodorus grandiflorus</i> (Cham.& Schltl.) Micheli (chapéu de couro)	86mg/mL	32,3 mg/mL
<i>Gossypium hirsutum</i> L. (algodoeiro)	70mg/mL	25,6 mg/mL
<i>Plantago major</i> L. (tansagem)	55mg/mL	40 mg/mL

Os resultados mostrados na tabela 10 indicam que os maiores valores de CMB encontrados para o conjunto das 12 bactérias utilizadas neste trabalho são maiores que as concentrações encontradas nos frascos comerciais dos fitoterápicos selecionados, produzidos pela PSVNI, com exceção do extrato de angico, que apresentou CMB bem menor que a concentração obtida no frasco comercial. Os extratos de tansagem e mil em ramas apresentaram valores de CMB próximos aos valores contidos nos frascos comerciais. Desta forma, os mesmos poderiam ser utilizados para o tratamento de síndromes clínicas que apresentem as bactérias avaliadas como causadoras, desde que ajustadas as doses diárias, já que as concentrações obtidas pelo método de extração poderá oscilar para mais ou para menos. No entanto, deverão ser realizados controles de qualidade dos extratos confirmando sua concentração a cada lote preparação, observando também a época e horário de coleta das plantas.

#### **4.5. Avaliação da cinética de morte bacteriana (*Time-kill*) sobre quatro bactérias causadoras de infecção hospitalar**

A determinação da taxa de morte de uma bactéria isolada causada por um agente antimicrobiano (*time-kill*) tem sido aplicada amplamente na avaliação de novas drogas. A cinética mostra a tendência de ação do antimicrobiano indicando sua ação bactericida ou bacteriostática e o tempo de duração desta ação, usualmente 0, 4, 12 e 24h. A curva de tempo morte é representada por um número da parcela dos microrganismos sobreviventes à administração de um típico regime terapêutico. O método tem sido usado para avaliar e comparar novos medicamentos e estudar as diferenças e as alterações na susceptibilidade antimicrobiana de bactérias clinicamente importantes isoladas (LORIAN, 2005).

##### **4.5.1. Cinética de morte bacteriana pela ação do extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico)**

De modo geral, com relação ao teste de atividade antimicrobiana o angico foi o extrato que apresentou o menor valor de CMB frente às 12 bactérias testadas. Além disso, o angico não consta na FB-FF, publicado em 2011, trazendo à tona a necessidade de pesquisar a atividade antimicrobiana atribuída ao uso empírico. Dessa forma, o extrato dessa planta foi selecionado para a realização do teste Time Kill com o objetivo de avaliar o tempo de ação do extrato sobre quatro bactérias causadoras de infecção hospitalar, incluindo espécies multirresistentes aos antimicrobianos usados na clínica. Desta forma, pode-se ampliar os conhecimentos acerca das propriedades medicinais desta planta, contribuindo para a inclusão de sua monografia na FB-FF.

Para a realização do teste, a CMB do extrato de angico para cada uma das quatro bactérias foi confirmado, em duplicata e, em seguida, foram calculadas as concentrações sub-inibitórias 90% e 50%, obtendo-se os seguintes valores (tabela 11):

**Tabela 11: Valores de CMB do extrato de angico frente a quatro bactérias e concentrações sub-inibitórias aproximadas de 90% e 50%**

Bactérias	CMB (mg/mL)	90% (mg/mL)	50% (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	>14≤ 20	18	10
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (VRE)	>15≤ 24	22	12
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	>18≤25	22,5	12,5
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ATCC 15442	>18≤25	22,5	12,5

A tabela 12 mostra a avaliação quantitativa da ação inibitória do extrato de *A. colubrina*, angico, contra quatro bactérias causadoras de infecções hospitalares, incluindo cepas multirresistentes.

**Tabela 12: Avaliação quantitativa da ação inibitória do extrato fitoterápico de angico nas CMB-90% e CMB-50%.**

Amostras bacterianas	Tempo	Controle UFC/mL	CMB-90% *	Redução na CMB-90	CMB-50% *	Redução na CMB-50
<i>Staphylococcus aureus (MRSA)</i> ATCC 33591	Zero	4,5	4,5	IND	4,5	IND
	3h	6,2	1,2	- 5 BC	1,9	-4,3 BC
	6h	9,2	1,2	-8 BC	1,9	-7,3 BC
	12h	9,6	0,4	-9,2 BC	0,4	-9,2 BC
	24h	9,9	0,4	-9,5 BC	0,4	-9,5 BC
<i>Enterococcus faecalis (VRE)</i> ATCC 51299	Zero	4,7	4,9	IND	4,8	IND
	3h	5,9	3,1	-2,8 BT	3,1	-2,8 BT
	6h	9,6	2,4	-7,2 BC	1,9	-7,7 BC
	12h	9,9	0,5	-9,4 BC	1,9	-7,7 BC
	24h	9,9	0,4	-9,5 BC	0,4	-9,5 BC
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> ATCC 700603	Zero	3,1	3,3	IND	3,1	IND
	3h	6,2	4,7	-1,5 BT	5,0	-1,2 BT
	6h	9,9	5,4	-4,5 BC	7,4	-2,5 BT
	12h	9,9	0,4	-9,5 BC	0,4	-9,5 BC
	24h	9,9	9,6	-0,4 IND	9,6	-0,4 IND
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> ATCC 15442	Zero	3,6	3,4	IND	3,4	IND
	3h	4,3	0,5	-3,8 BC	2,4	-1,9 BT
	6h	9,2	0,4	-8,8 BC	0,5	-8,7 BC
	12h	9,9	0,4	-9,5 BC	0,4	-9,5 BC
	24h	9,9	0,4	-9,5 BC	0,4	-9,5 BC

\*Número de UFC expressa em log<sub>10</sub>; BC = ação bactericida, definida como a redução  $\geq 3\log_{10}$  UFC/mL ; BT= ação bacteriostática, definida como uma redução  $< 3\log_{10} > 1\log_{10}$  UFC/mL; IN= ação indiferente definida como uma redução  $\leq 1\log_{10}$  UFC/mL.

A curva tempo-morte para o MRSA demonstrou o efeito bactericida do extrato de angico pela redução  $> 3 \text{ Log UFC/mL}$  para as ambas as concentrações a partir de 3 horas de incubação das amostras, permanecendo o efeito

bactericida até completar as 24h de análise. Para o VRE o efeito bactericida foi observado a partir do tempo aproximado de 6 horas de incubação das amostras. Interessante notar que ambas as bactérias são Gram-positivas e exibiram um perfil semelhante de morte pela ação do extrato de angico. O perfil observado pode ser comparado à ação de antimicrobianos bactericidas.

Com relação às bactérias Gram-negativas, a curva tempo-morte para *K. pneumoniae* demonstrou o efeito bactericida do extrato de angico pela redução  $> 3$  Log UFC/mL para as ambas as concentrações entre 6 e 12 horas de incubação, quando, a partir de então, houve cessação do efeito bactericida do extrato e as bactérias que ainda haviam sobrevivido (fora do limite de detecção do teste) voltaram a multiplicar-se de forma exponencial. Não se pode deixar de lembrar que a *K. pneumoniae* ATCC 700603 é um bacilo Gram-negativo fermentador da glicose produtor de ESBL. A curva tempo-morte para *P. aeruginosa* ATCC 15442 demonstrou o efeito bactericida do extrato de angico pela redução  $> 3$  Log UFC/mL para as ambas as concentrações entre 3 e 6 horas de incubação, permanecendo o efeito bactericida até completar 24h de análise. Foi obtido um resultado bastante significativo desse extrato com relação a todos os microrganismos avaliados no teste *time-kill*.

Em relação ao tempo em que houve ação bactericida do extrato frente às bactérias avaliadas neste estudo, alguns pesquisadores consideram o declive de quatro a oito horas como o fator mais importante para determinar a frequência com que os antimicrobianos devam ser administrados (CLSI, 2003). O extrato do angico mostrou características concentração-dependente, sendo bastante eficaz na CMB 90%.

O efeito bactericida do extrato de angico pode estar relacionado à presença de compostos altamente solúveis em água/álcool etílico possivelmente de caráter polar. As espécies de angico têm sido reconhecidas pelos seus altos teores de taninos em cascas e frutos. Paes et al (2010) pesquisaram a presença de taninos em várias partes da planta *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, encontrando na casca dessa planta alto teor de taninos condensados. Isso sugere a possibilidade de os taninos estarem envolvidos na atividade

antimicrobiana atribuída ao angico. Entretanto, para isso são necessários testes de identificação dos compostos presentes neste extrato, como cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa, cromatografia de alta eficiência dentre outro métodos.

O fato desse fitoterápico já ser utilizado empiricamente sem grandes relatos de efeitos adversos o coloca em evidência para o melhor aproveitamento de seus princípios ativos ou do próprio extrato em novas formulações.

As figuras 13 a 16 exibem o perfil da ação do extrato de *A. colubrina*, no método curva tempo-morte.

**Figura 13: Curva Tempo-morte de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 MRSA sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de *Anadenanthera colubrina* ( Vell.) Brenan (angico)**

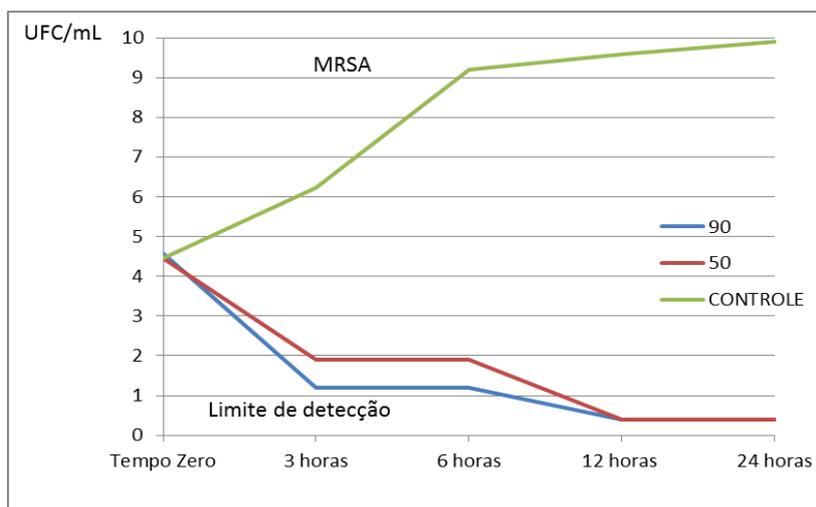


Figura 14: Curva Tempo-morte de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 VRE sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico)

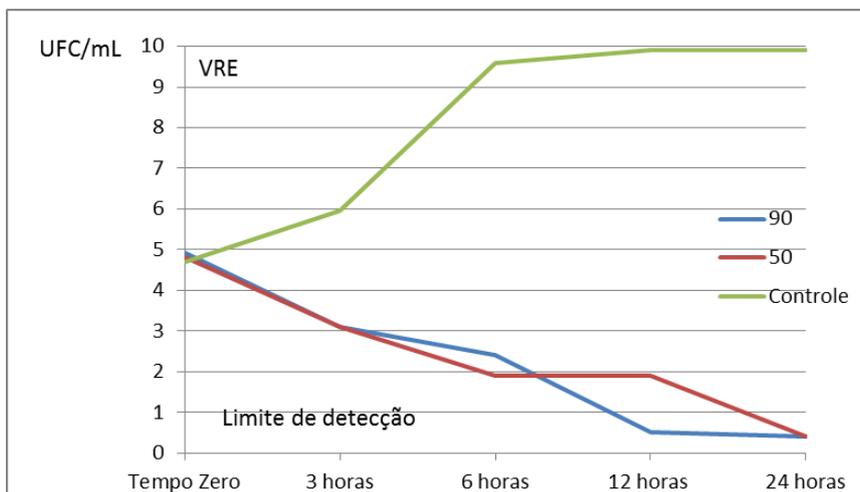


Figura 15: Curva Tempo-morte de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico)

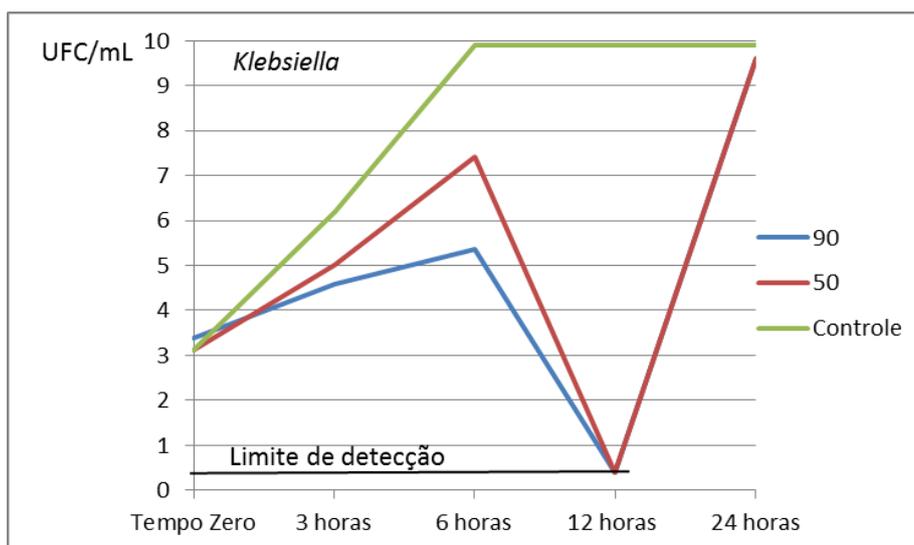
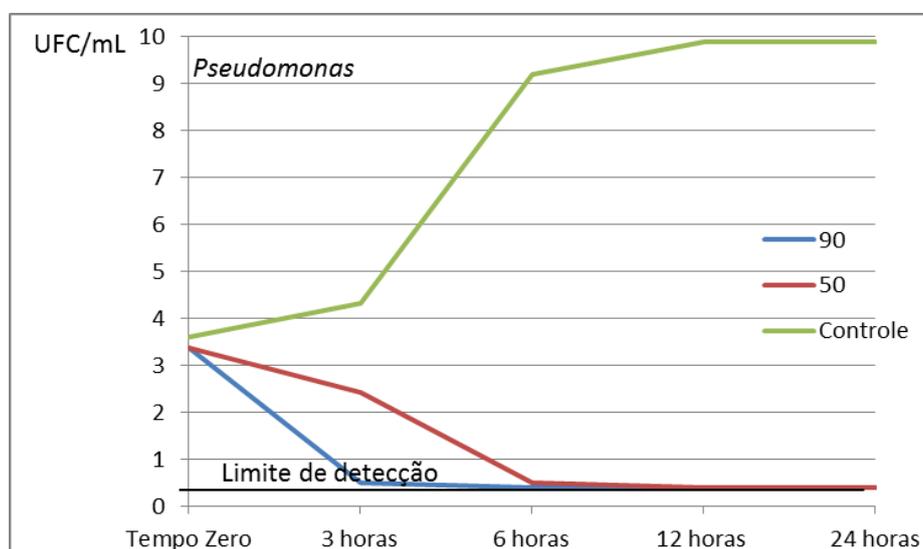


Figura 16: Curva Tempo-morte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de *Anadenanthera colubrina* (angico)



#### 4.5.2. Cinética de morte bacteriana pela ação do extrato de *Cordia verbenacea* DC. (erva baleeira)

A tabela 13 mostra os valores encontrados de CMB e os valores calculados de CMB 90% e 50% para o extrato de *C. verbenacea*, erva baleeira, frente a quatro bactérias causadoras de infecção hospitalar, incluindo cepas multirresistentes.

Tabela 13: Valores de CMB do extrato de Erva Baleeira frente a quatro bactérias em concentrações sub-inibitórias aproximadas de 90% e 50% \*

Bactérias	CMB (mg/mL)	90% (mg/mL)	50% (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 (MRSA)	>9≤ 12	11	6
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 (VRE)	>26≤ 30	28	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	>26≤30	28	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	>24≤26	24	13

A tabela 14 mostra a avaliação quantitativa da ação inibitória do extrato de *C. verbenacea*, contra quatro bactérias causadoras de infecções hospitalares, incluindo cepas multirresistentes.

**Tabela 14:** Avaliação quantitativa da ação inibitória do extrato fitoterápico de erva baleeira nas CMB-90% e CMB-50%.

Amostras bacterianas	Tempo	Controle UFC/mL	CMB-90%*	Redução na CMB-90	CMB-50%*	Redução na CMB-50
<i>Staphylococcus aureus (MRSA) ATCC 33591</i>	Zero	4	3,8	IND	3,6	IND
	3h	5,4	1,2	-4,2 BC	1,2	-4,2 BC
	6h	9,2	0,3	-8,9 BC	1,2	-8,0 BC
	12h	9,6	0,3	-9,3 BC	0,3	-9,3 BC
	24h	9,9	0,3	-9,6 BC	0,3	-9,6 BC
<i>Enterococcus faecalis (VRE) ATCC 51299</i>	Zero	1,9	2,4	IND	1,9	IND
	3h	8,8	4,3	-4,5 BC	3,8	-5 BC
	6h	9,2	5,2	-4 BC	6,7	-2,3 BT
	12h	9,9	9,2	-0,7 IND	9,2	-0,7 IND
	24h	9,9	9,5	-0,4 IND	9,5	-0,4 IND
<i>Klebsiella Pneumoniae ATCC 700603</i>	Zero	1,9	1,9	IND	1,9	IND
	3h	8,3	4,4	-3,9 BC	4,9	-3,4 BC
	6h	9,9	9,2	-0,7 IND	9,5	-0,4 IND
	12h	9,9	9,5	-0,4 IND	9,5	-0,4 IND
	24h	9,9	9,9	IND	9,9	IND
<i>Pseudomonas Aeruginosa ATCC 15442</i>	Zero	3,1	2,79	IND	4	IND
	3h	7,2	3,4	-3,8 BC	3,1	-4,1 BC
	6h	9,2	6,4	-2,8 BT	8	-1,2 BT
	12h	9,9	9,2	-0,7 IND	9,2	-0,7 IND
	24h	9,9	9,5	-0,4 IND	9,9	IND

\*Número de UFC expressa em log<sub>10</sub>; BC = ação bactericida, definida como a redução  $\geq 3\log_{10}$  UFC/mL ; BT= ação bacteriostática, definida como uma redução  $< 3\log_{10} > 1\log_{10}$  UFC/mL; IN= ação indiferente definida como uma redução  $\leq 1\log_{10}$  UFC/mL.

O extrato de *C. verbenacea* mostrou atividade bactericida contra o MRSA a partir de 3h de incubação das amostras, permanecendo bactericida até 24h em ambas as concentrações. Em relação ao VRE, o extrato mostrou atividade bactericida a partir de 3h de incubação das amostras. A atividade bactericida do extrato permaneceu na concentração 90% até o tempo de 6h de incubação, diminuindo no decorrer do tempo. Entretanto, na concentração 50% se mostrou bacteriostática em 6h. A partir do tempo de 12h de incubação não foi verificada

ação bacteriostática ou bactericida e as bactérias retomaram o crescimento exponencial.

Em relação às bactérias Gram-negativas o extrato de *C. verbenacea* mostrou atividade bactericida no tempo equivalente a 3h de incubação das amostras para ambas as concentrações do extrato. A partir de 6 horas de incubação, o extrato demonstrou atividade bacteriostática para *P. aeruginosa*, enquanto para a *K. pneumoniae* não foi observado este efeito mostrando-se indiferente. A partir de 12 h de incubação até 24h o extrato não demonstrou ação antimicrobiana frente às duas bactérias Gram-negativas.

Matias et al (2010) observaram o efeito antibacteriano nos extratos metanólicos e hexânicos de *C. verbenacea* testados contra *E. coli* e *S. aureus*, incluindo cepas de referência e multirresistentes. Para os testes foram utilizadas soluções preparadas a partir dos extratos sob uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido), em seguida diluídos com água destilada para uma concentração de 1024 µg. Entretanto não foi encontrado na literatura o ensaio de curva tempo- morte deste extrato fitoterápico.

**Figura 17: Curva Tempo-morte de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 MRSA sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de *Cordia verbenacea* DC. (erva baleeira)**

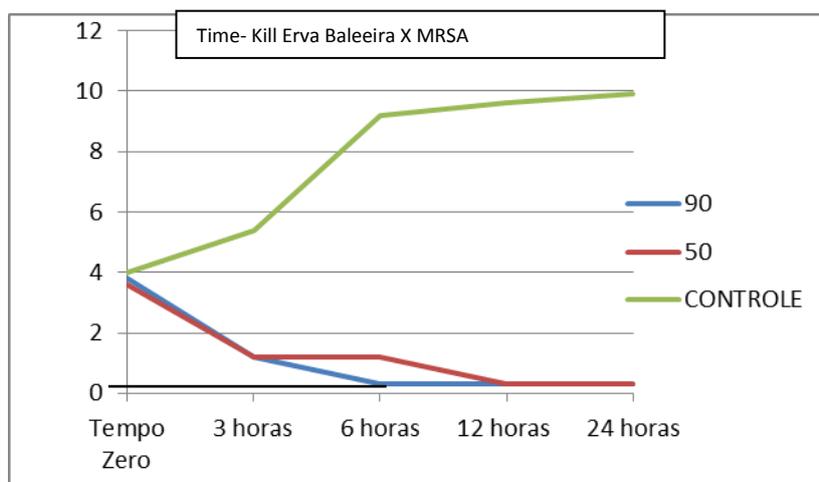


Figura 18: Curva Tempo-morte de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 VRE sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de *Cordia Verbenacea* DC.(erva baleeira)

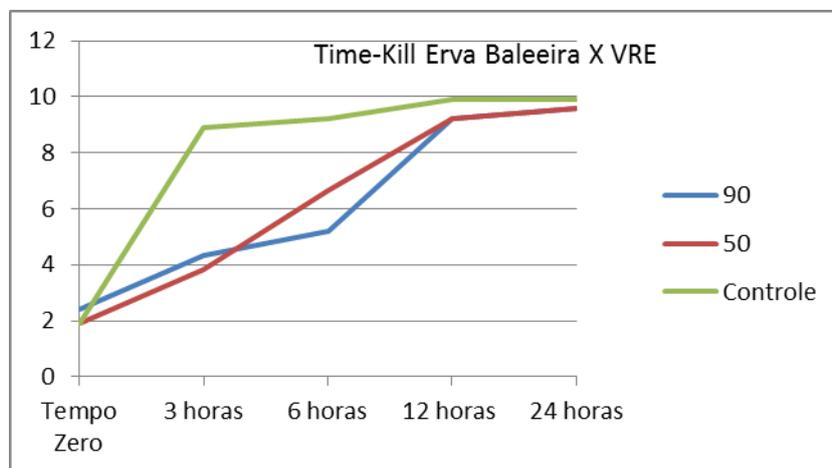
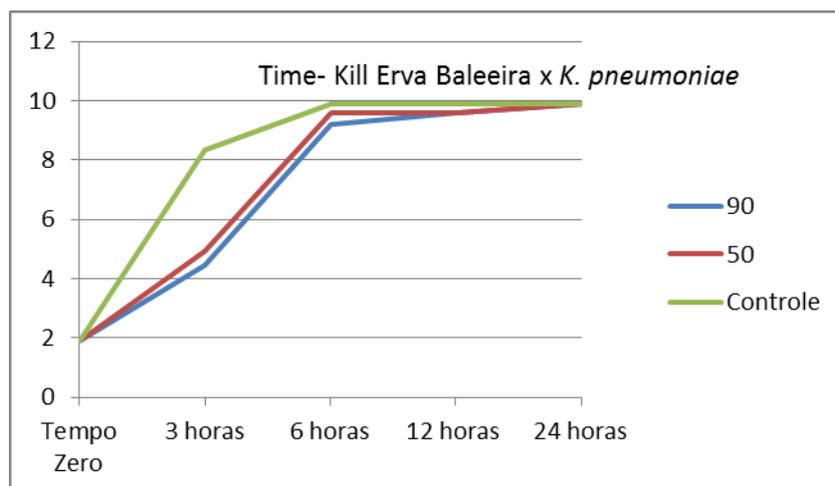
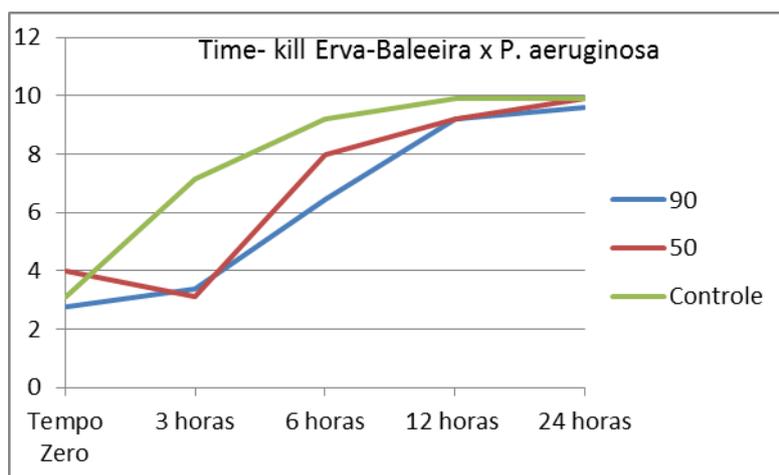


Figura 19: Curva Tempo-morte de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de *Cordia Verbenacea* DC. (erva baleeira)



**Figura 20: Curva Tempo-morte de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 sob a ação sub-CMB 90% e sub-CMB 50% do extrato de *Cordia verbenacea* DC. (erva baleeira)**



#### **4.6. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos fitoterápicos pela captura de radicais livres pelo método DPPH (2,2- difenil-1 picril hidrazil)**

A tabela 15 mostra o percentual de redução do DPPH nas concentrações 500  $\mu\text{g/mL}$ , 250  $\mu\text{g/mL}$ , 125  $\mu\text{g/mL}$ , 62,5  $\mu\text{g/mL}$  e 31,25  $\mu\text{g/mL}$ , para os oito extratos fitoterápicos diluídos em metanol e comparados ao padrão quercetina. Os resultados apresentados correspondem à média de 3 repetições ( $n=3$ ).

Tabela 15: Percentual de redução do DPPH pelos extratos fitoterápicos

Extrato/Tintura	% de Redução do DPPH				
	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62,5 µg/mL	31,25 µg/mL
<b>Padrão-Quercetina</b>	94,52 <sup>a</sup>	96,2 <sup>a</sup>	95,13 <sup>a</sup>	95,89 <sup>a</sup>	94,98 <sup>a</sup>
<i>Anadenanthera colubrina</i>	93,3 <sup>a</sup>	93,7 <sup>a</sup>	93,2 <sup>a</sup>	93,6 <sup>a</sup>	93,6 <sup>a</sup>
<i>Achillea millefolium</i>	93,2 <sup>a</sup>	93,4 <sup>a</sup>	62,7 <sup>a</sup>	31,0 <sup>b</sup>	16,5 <sup>b</sup>
<i>Aristolochia cymbifera</i>	91,2 <sup>a</sup>	66,0 <sup>a</sup>	38,8 <sup>b</sup>	16,5 <sup>b</sup>	7,2 <sup>b</sup>
<i>Casearia sylvestris</i>	92,5 <sup>a</sup>	93,9 <sup>a</sup>	87,7 <sup>a</sup>	48,8 <sup>b</sup>	24,5 <sup>b</sup>
<i>Cordia verbenacea</i>	92,7 <sup>a</sup>	92,5 <sup>a</sup>	62,9 <sup>a</sup>	31,5 <sup>b</sup>	16,5 <sup>b</sup>
<i>Echinodorus grandiflorus</i>	91,5 <sup>a</sup>	88,1 <sup>a</sup>	53,8 <sup>b</sup>	31,6 <sup>b</sup>	19,3 <sup>b</sup>
<i>Gossypium hirsutum</i>	94,5 <sup>a</sup>	93,6 <sup>a</sup>	63,1 <sup>a</sup>	33,9 <sup>b</sup>	17,1 <sup>b</sup>
<i>Plantago major</i>	93,9 <sup>a</sup>	93,9 <sup>a</sup>	93,7 <sup>a</sup>	68,6 <sup>b</sup>	35,4 <sup>b</sup>

Os valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, quando comparados em blocos teste ANOVA- análise de variância e teste de Tukey (5% de probabilidade para todos os fitoterápicos e 1% de probabilidade quando comparados apenas Quercetina e *A. colubrina*).

Os oito extratos comparados entre si e com o padrão Quercetina mostraram ação estatisticamente semelhante nas concentrações 500 µg/mL e 250 µg/mL. Apenas os extratos de *A. cymbifera* e *E. grandiflorus* não exibiram ação estatisticamente semelhante na concentração 125 µg/mL. Nas concentrações 62,5 µg/mL 31,25 µg/mL apenas o extrato de *A. colubrina* mostrou ação estatisticamente semelhante ao padrão quercetina, os demais extratos apresentaram poder de redução do DPPH estatisticamente semelhantes entre si. É possível verificar que a % de redução do DPPH diminui com a diminuição da concentração do extrato em teste, com exceção do extrato de angico que mostrou padrão de Redução similar ao da Quercetina, ou seja, apresentou redução do DPPH independente da concentração. No Teste de “Regressão na

Análise de Variância” ANOVA, o angico e o padrão Quercetina se mostraram significativos a nível de 1% de Probabilidade, com um coeficiente de variação  $CV\%=0,42$ . Isso demonstra que a atividade antioxidante do angico é estatisticamente similar à da Quercetina.

De acordo com Santos et al (2011) a propriedade de sequestrar radicais livres dos compostos presentes em vários extratos de plantas ou microrganismos sugere um possível papel redutor destes compostos, podendo torna-los úteis para o controle e/ou tratamento de doenças, como as cardiovasculares.

Estevam et al (2006), avaliaram a atividade antioxidante de *A. macrocarpa* outra espécie do gênero *Anadenanthera*, obtendo alta atividade antioxidante com as frações etanólica e acetato de etila. Melo et al (2010) observaram grande presença de taninos na planta *A. colubrina*, avaliaram sua atividade antioxidante e a consideraram como razoável. Michielin et al (2011) avaliaram a atividade antioxidante de *C. verbenacea* e obtiveram resultados que indicam seu importante potencial como fonte de compostos bioativos com atividade antioxidante. Güntzel (2008) avaliou a atividade antioxidante de *C. sylvestris* obtendo resultados de redução do radical livre DPPH nas concentrações de 0,1 mg. mL<sup>-1</sup> a 0,005 mg. mL<sup>-1</sup> para os extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) das folhas, onde através da análise estatística ANOVA, demonstrou a potencial atividade antioxidante dos extratos superior aos padrões testados. Não foram encontrados na literatura trabalhos que visam a avaliação da atividade antioxidante de extratos fitoterápicos de *P. major*, *A. millefolium*, *G. hirsutum*, *E. grandiflorus* e *A. cymbifera*.

As substâncias antioxidantes têm a capacidade de reagir com radicais livres e os transformar em espécies estáveis não reativas, antes que possam atuar sobre as células causando danos ao DNA ou oxidando lipídios ou proteínas. Os vegetais são ricos em substâncias capazes de reagir com radicais livres, as principais substâncias relacionadas são os compostos fenólicos. Os flavonoides são substâncias naturais com estruturas variáveis e uma de suas características mais marcantes é a capacidade de atuar como antioxidantes, atuando como sequestradores de radicais livres e de ERO (WILMSEN et al,

2005). Os gráficos 21 a 28 mostram a atividade antioxidante dos extratos fitoterápicos pela redução do DDPH.

Figura 21: Atividade antioxidante do extrato de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (angico) pelo método DPPH

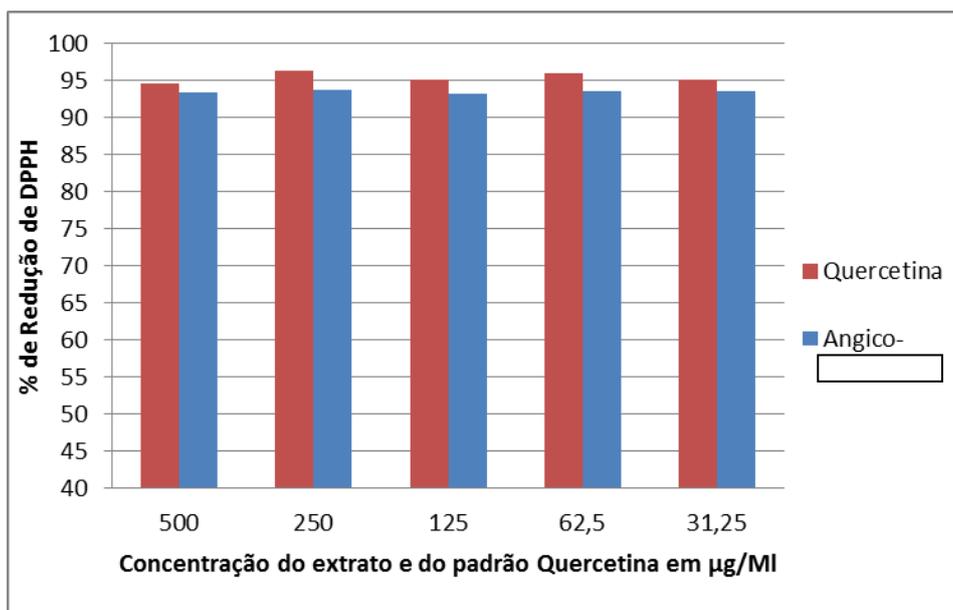


Figura 22: Atividade antioxidante do extrato de *Cordia verbenacea* DC. (erva baleeira) pelo método DPPH

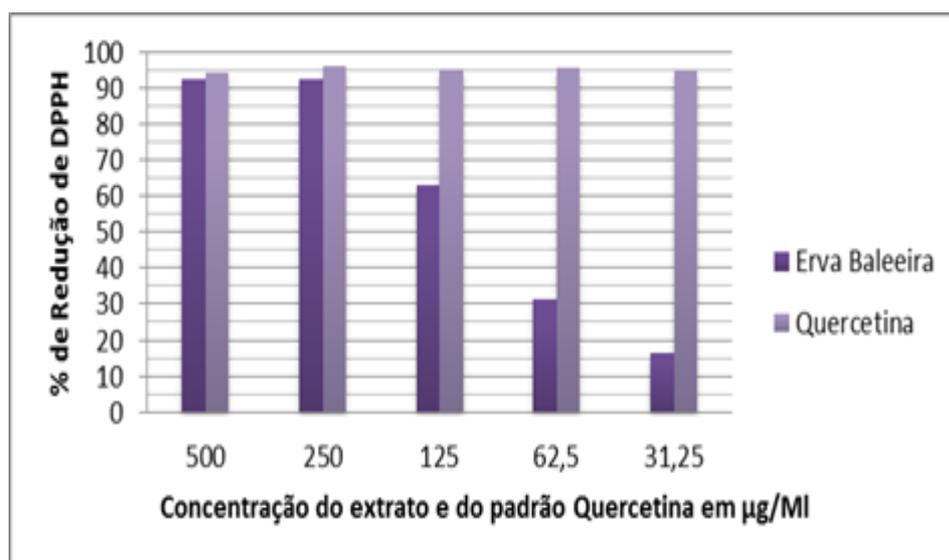


Figura 23: Atividade antioxidante do extrato de *Casearia sylvestris* Sw. (guaçatonga) pelo método DPPH

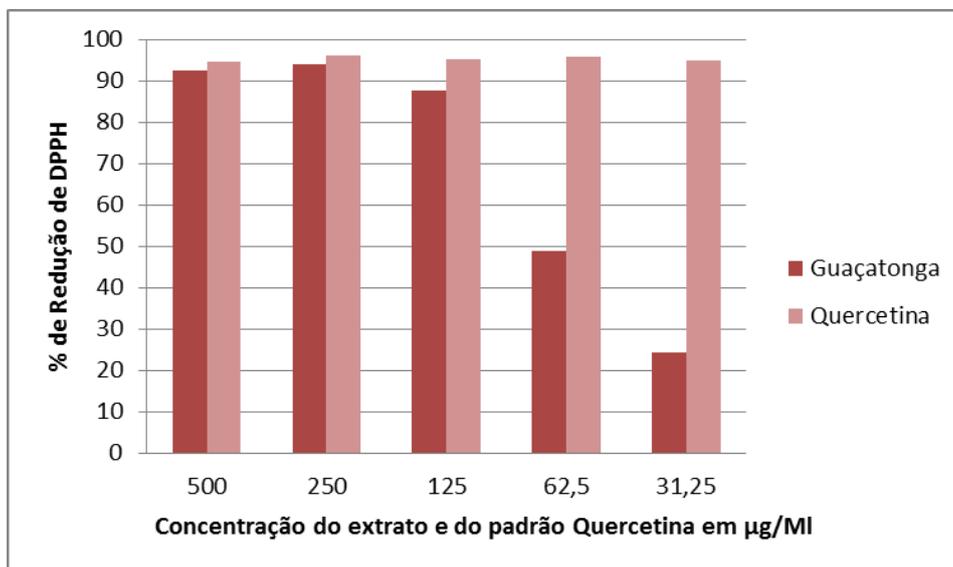


Figura 24: Atividade antioxidante do extrato de *Achillea millefolium* L. (mil em ramos) pelo método DPPH

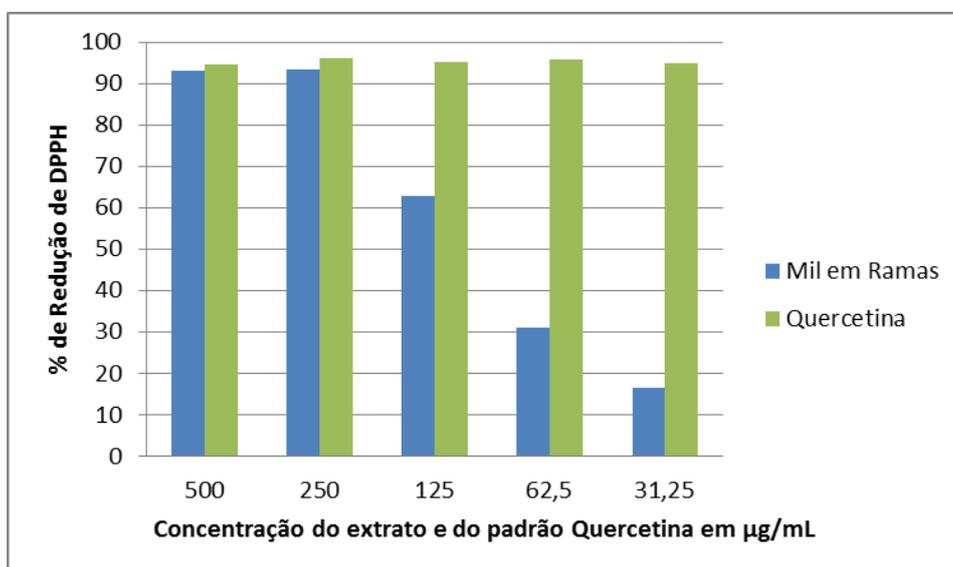


Figura 25: Atividade antioxidante do extrato de *Gossypium hirsutum* L. (algodoeiro) pelo método DPPH

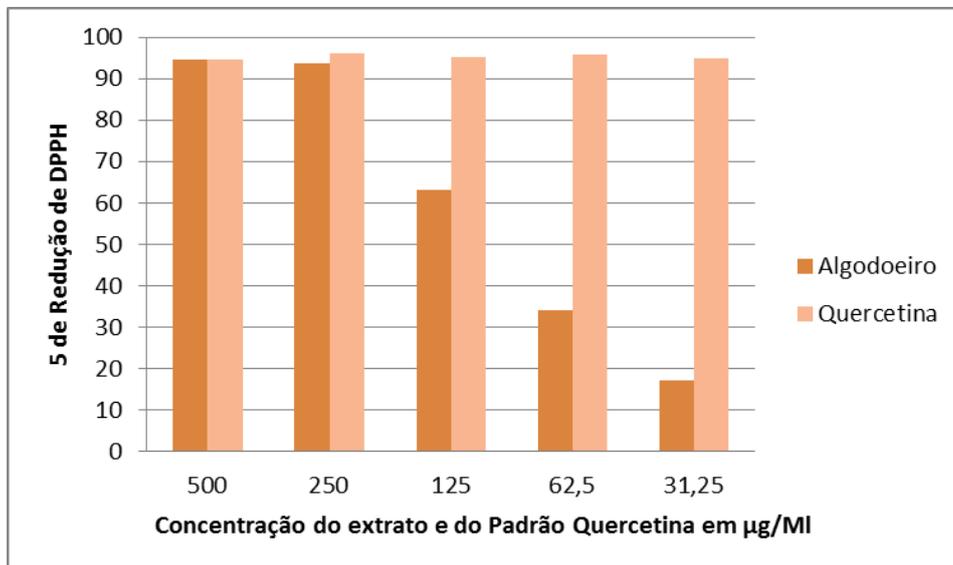


Figura 26: Atividade antioxidante do extrato de *Echinodorus grandiflorus* (Cham.& Schltl.) Micheli (chapéu de couro) pelo método DPPH

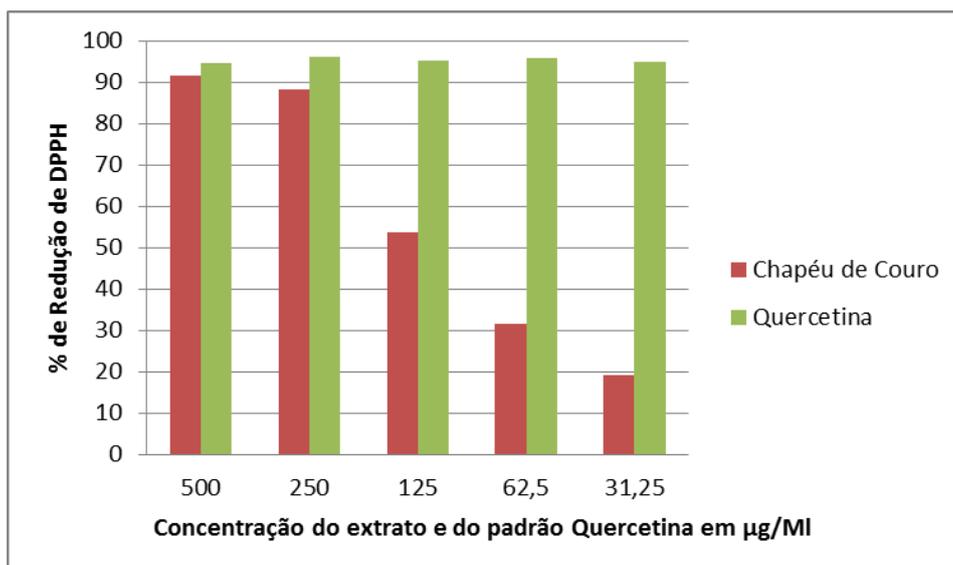


Figura 27: Atividade antioxidante do extrato de *Plantago major* L. (tansagem) pelo método DPPH

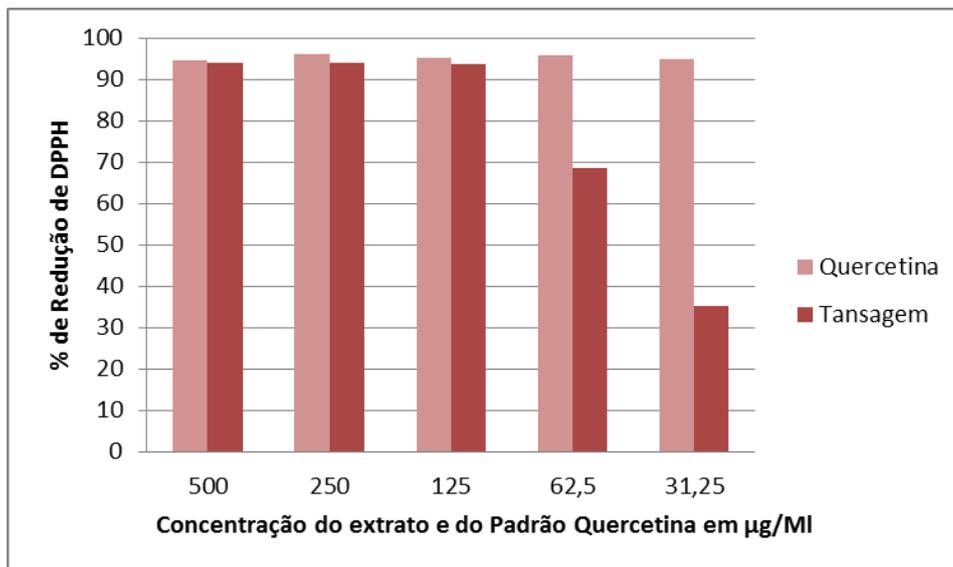
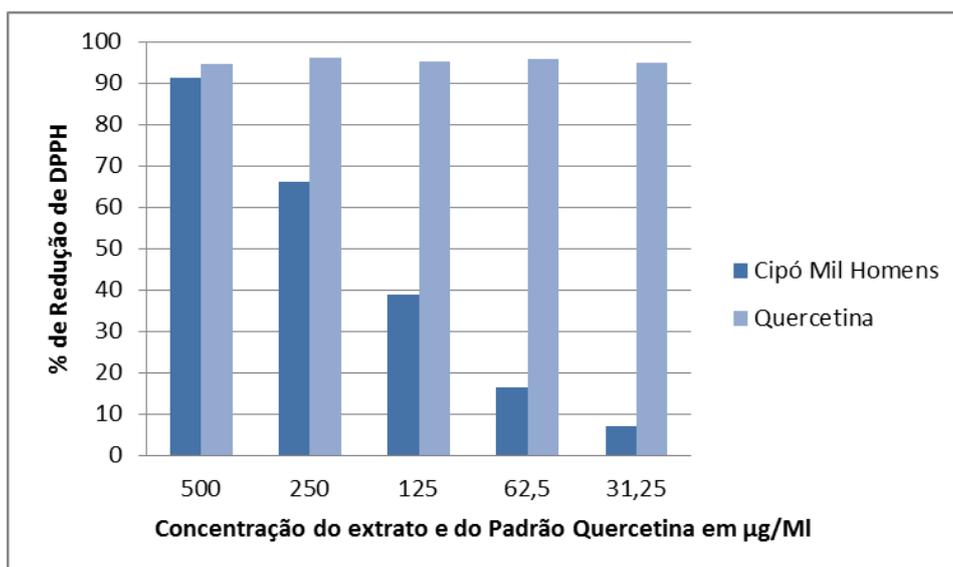


Figura 28: Atividade antioxidante do extrato de *Aristolochia cymbifera* Mart. (cipó mil homens) pelo método DPPH



## 5. CONCLUSÕES

Os extratos fitoterápicos de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, *Cordia verbenacea* DC., *Achillea millefolium* DC., *Gossypium hirsutum* L., *Casearia sylvestris* Sw., *Echinodorus grandiflorus* (Cham.& Schltl.) Micheli e *Plantago major* L. mostraram ação antimicrobiana em baixas concentrações frente às bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 25923, 29213 e 33591 (MRSA), *S. epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 14990, *S. saprophyticus* ATCC 15305, *E. faecalis* ATCC 29212 e ATCC 51299 (VRE), Gram- negativas *E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* ATCC 19606, *K. pneumoniae* ATCC 700603 (produtora de ESBL) e *P. aeruginosa* ATCC 15442. Os resultados obtidos confirmaram a indicação empírica de atividade antimicrobiana destes sete extratos avaliados nesta pesquisa, mostrando que estes fitoterápicos apresentam uso promissor no tratamento de síndromes apresentando bactérias como agentes etiológicos, já que estas indicações são apresentadas somente pelo uso empírico da população. Além disso, a descrição dessas plantas como agentes antimicrobianos não consta na FB-FF, com exceção do extrato de *P. major*, mas que é indicada apenas para uso externo na forma de bochecho e gargarejo, resultados que podem contribuir para possíveis futuras modificações no Formulário. O extrato de *Aristolochia cymbifera* Mart. não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações avaliadas e sua CMB foi maior que 250mg/mL. O extrato de *A. colubrina* foi o que apresentou melhor atividade antimicrobiana frente às 12 espécies bacterianas utilizadas neste estudo.

Não foram encontrados na literatura avaliação da cinética de morte bacteriana (Time-kill) pela ação de extratos fitoterápicos de *A. colubrina* e *C. verbenacea*, como o realizado no presente trabalho. O extrato de *A. colubrina* demonstrou perfil de ação bactericida pelo teste time-kill durante o período de 3h a 24h de incubação contra as bactérias avaliadas: MRSA, VRE, *K. pneumoniae* (ESBL) e *P. aeruginosa*. Por outro lado, o extrato de *C. verbenacea* apresentou ação bactericida durante as primeiras 3h de incubação, passando a bacteriostático na 6ª hora de incubação e indiferente de 12 a 24h de incubação, frente a essas quatro bactérias. O extrato de *A. colubrina* apresentou atividade antimicrobiana

significativa em concentração menor do que a utilizada comumente, confirmando suas indicações empíricas como antisséptico e antimicrobiano.

Além disso, os oito extratos avaliados demonstraram poder antioxidante, quando avaliados pelo método de redução do DPPH. O extrato de *A. colubrina* mostrou redução do DPPH semelhante à do padrão Quercetina, os demais extratos apresentaram boa atividade redutora de DPPH, entretanto, apenas nas maiores concentrações avaliadas.

Os resultados corroboram para a promissora utilização do extrato fitoterápico de *A. colubrina* no tratamento de síndromes clínicas que tenham bactérias como agente etiológico, bem como na prevenção de danos ao organismo causados por estresse oxidativo e, além disso, indica o seu grande potencial para a descoberta de novas moléculas bioativas.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde. **Uma legislação justa para os produtos de origem natural**. Disponível em: <<http://www.abifisa.org.br/introducao.asp>> Acesso em: Jun. 2010.
- AGUIAR, J.S. et al. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18(3): 436-440, Jul./Set. 2008.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABOR, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**. V. 22, Issue 9, P. 1041-1047, September 2002.
- ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. São Paulo. **Química Nova**, vol.33 n.10. 2010.
- ALVES, T. M. A. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n. 3, p. 367-373, Mai/Jun. 2000.
- AMARAL, J. F. Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg. 2004. 151p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia)– Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- ANAYA-PRADO, R.; TOLEDO-PEREYRA, L.H. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury Source Borgess Research Institute, Trauma, Surgery Research Sciences and Molecular Biology, Kalamazoo, Michigan 49048, V.34(7),p.2518-9, USA, Nov. 2002.
- ANVISA. **Rede Nacional de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde**. Rede RM, Brasília, 2009. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede-rm/2009/100709\\_perfil\\_sensibilidade.htm](http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede-rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm). Acesso em Março, 2012.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. **Food Chemistry Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 1015-1025, 1999.
- BABICZ, I et al. Estudo da composição química e avaliação de atividade antimicrobiana de extratos obtidos a partir de *Echinodorus macrophyllus*. **Anais**. XXIX reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP. Maio, 2006.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, V. 29, n1, 113-123, 2006.
- BARRY A.L.; THORNSBERRY C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ 1991. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: **American Society for Microbiology**, p. 1117-1125, 1991.
- BALBACH, A. **Flora nacional na medicina doméstica**. 19.ed. São Paulo: Edel, Série nº 2, 1985.

BATALHA, M.O.; BUAINAIN, A.M. Cadeias produtivas de flores e mel. Brasília: IICA: MAPA/SPA, 2007.

BIANCHI M.L.P., ANTUNES L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, SP, V.12(2), p.123-130, maio/ago, 1999.

BLANK, A.F. et al. Produção de mudas, altura e intervalo de corte em melissa. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 780-784, Jul/ Set, 2005.

BONACORSI, C. et al. Anti-Helicobacter pylori activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine** V.9:2 doi:10.1186/1472-6882, 2009.

BRASIL. Resolução - **RDC n.º 17, de 24 de fevereiro de 2000**/ ANVISA. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17\\_00rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm). Acesso em Março, 2012.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 23 jun. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 04 mai. 2006.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 4. ed. São Paulo, SP:Atheneu, 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.126p

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide: a review. *Cornell Vet.*, v.76, p.61-90, 1986.

BRAZ FILHO, Raimundo. Cientista, brasileiro e cidadão. Editor: Quartet. 285 pgs.2010.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v.27, n.4, p.902-908, 2007.

CAMARGO, M.S.; RADDI M.S.G. Effect of quercetin on *Staphylococcus aureus* growth and hemolytic activity. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol 5 (3), 71 – 78, 2008.

CARBAJAL, A; NUNEZ, C; MOREIRAS, O. Energy intake as a determinant factor of vitamin status in healthy young women. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research** 66, 227–231, 1996.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8** (ISBN 1-56238- 485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003b

CONNER, D.E. Naturally occurring compounds. In: **Antimicrobials and Foods**, Davidson P.M., Branem A. L. Eds., Dekker: New York, 441-468, 1993.

DANTAS, J.P. et al. Evaluation of the antimicrobial activity in vitro and determination of minimum the inhibitory concentration. (MIC) of hidroalcoholic extracts of angico in strains *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 42(1): 33-37, 2010.

DAVID, J. P. et al. Radical scavenging. Antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia** V.78, p.215-218, 2007.

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

DIDRY N., DUBREUIL L., PINKAS M. Activé antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldéhyde cinnamique seuls ou associés (Antibacterial activity of thymol, carvacrol and cinnamaldehyde singly or in combinations), **Pharmazie**. V.48, p.301-304, 1993.

DUARTE, M. G. R. et al. Phytochemical and antibacterial screening of Brazilian weed plants. **Anais**. 2ª IUPAC- INTERNACIONAL CONFERENCE ON BIODIVERSITY, 1999, Belo Horizonte. Livro de Resumos da 2ª IUPAC- International Conference on Biodiversity, Belo Horizonte, 1999, p.188-195.

DUARTE, M. G. R. et al. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana in vitro de plantas invasoras. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v.20, n2, p.177-182, 2002.

DURÃES, J. S.; SOUZA, W. **A Pastoral das Saúde e o SUS: Para que todos tenham vida em abundância**, II Congresso de Humanização - I Jornada Interdisciplinar de Humanização, Curitiba, Agosto, 2011.

EBERT, S.C. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics to antibiotic selection. **Pharmacy and Therapeutics**. 29: 244-253, 2004.

ELISABETSKY Elaine. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura** vol.55 no.3 São Paulo Jul/Set. 2003

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia de algumas tribos brasileiras. In: RIBEIRO, Darcy (Ed.) **Suma Etnológica Brasileira**. Petrópolis, RJ: Vozes, 1997. v.1.

ELOFF J.N.; A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med** 64: 711-713, 1998.

ESALQ, USP – 2003 <http://www.esalq.usp.br/trilhas/> Acesso em Março de 2012.

ESTEVAM, C.S. et al. Sociedade Brasileira de Química ( SBQ) 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Estudo da atividade antioxidante do extrato e partições da entrecasca do Angico-de-carço contra a redução do radical DPPH (1,1-Difenil-2-picrilhidrazil) e determinação de polifenóis totais. 2006.

EMBRAPA. Embrapa Transferência de Tecnologia. Escritório de Negócios de Campinas: (19) 3232.1955. Série Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas 2006.

EVANS, C.W. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. W.B. Saunders, London, 612 p, 1996.

FATHIAZAD F.; LOTFIPOUR F.; Study on the *in vitro* antimicrobial activity of *Achillea millefolium* and *Equisetum arvense*. School of Pharmacy, **Tabriz University of Medical Sciences**, Iran, 2003.

FENNEL C.W. et al. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **Journal Ethnopharmacology** v.94, p.205-217,2004.

FERREIRA, M.V.C.; PAES, V.R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Revista de Medicina**. São Paulo. v.87(4), p.272-6, out/dez, 2008.

FIDALGO, O; BONONI, V. L. R. Técnica de coleta, preservação e herborização de material botânico. Série Documentos, Instituto de Botânica, São Paulo. 62p. 1989.

FISCHER D.C.H. *Controle de qualidade de matérias-primas vegetais e produtos fitoterápicos*. In: Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Campo Grande: Editora Uniderp, 2005.

FOX, J. F. Although some dazzling technical approaches have fallen short, dozens of small companies and a few major pharma seek new products for this medically crucial, modest-growth market. **Nature Biotechnology**, Washington, v.24, n.12, p.1521-1528, dec, 2006.

FREITAS A. G. et al. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia** vol.12 supl.1 Maringá, PR, 2002.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10, 920 p., 2002.

GARCÍA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chemistry**, Salamanca, n. 84, p.13-18, 2004.

GIARETTA, J. et al: Comparação da atividade antimicrobiana dos sabonetes contendo digluconato de clorexidina, Triclosan e óleo essencial de *A. millefolium* L. (Asteraceae). **Arquivos de Ciência e Saúde Unipar**, Umuarama, v.11, n.1, p. 27-32, jan./abr. 2007.

GLAZER, A. N.; **The FASEB Journal**; v.2, p.2487, 1988.

GONÇALVES et al: Antimicrobial effects of some Brazilian medicinal plants against intestinal. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 4, n. 2, p. 153-160, maio/ago. 2011 - ISSN 1983-1870.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. - Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3: p.353-358, 2005.

GRASSI-ZAMPIERON, R.F.; VIEIRA, M.C.; SIQUEIRA, J.M. Atividade antioxidante e captora de radicais livres dos extratos de *Achyrocline alata* (Kunth.) DC. em comparação com extratos de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.19(2B), p.572-576, Abr./Jun. 2009.

GÜNTZEL, Ana Rita de Castro. Avaliação das atividades farmacológicas de *Casearia sylvestris* Sw. Lajeado, RS.UNIVATES. Dissertação de mestrado. Programa de pós-

graduação em ambiente e desenvolvimento. Centro Universitário UNIVATES, Rio Grande do Sul, 2008.

HALLIWELL, B.; **Biochemistry and Pharmacology** v.49, p.1341, 1995.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life sciences. **Nature Publishing Group**, v. 1, p.1-7, 2001

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed.; **Oxford University Press**, Oxford, 2007.

IONITA, P. Is DPPH Stable Free Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species? **Chemistry Papers**. V.59 (1), p.11-16, 2005.

KALEMBA D., KUSEWICZ D., SWIADER K. Antimicrobial properties of the essential of *Artemisia asiatica nakai*. **Phytotherapy Research**. v.16, p.288-291, 2002.

KARAMAN, I et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal Ethnopharmacology**. V.85, p.231-235, 2003.

KOBAYASHI J, SEKIGUCHI M, SHIMAMOTO S, SHIGEMORI H, OHSAKI A . Echinophyllins C-F, new nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. **Journal of Natural Products**. V.63, p.1576-1579, 2000.

LEITE J. P. V. Contribuição ao estudo farmacognóstico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich. Belo Horizonte, 86p. Monografia de Especialização - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 1995.

LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANTANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.16, p.300-306, 2006.

LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clinical Infectious Diseases**. n.36, p.S11-S23, 2003.

LORENZI, H., e MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: ativas e exóticas*. Nova Odessa. Instituto Plantarum. 2008, 512p.

LORIAN, V. 2005. **Antibiotcs in Laboratory Medicine**. 5 ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2005.

MACHADO T. B. et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V. 21, p. 279-284, 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**. v.25(3), p.429-438, 2002.

MAGALHÃES, Vladimir Garcia. *Convenção sobre a diversidade biológica (CDB): A Necessidade da revisão do seu texto substituindo o termo "Recursos genéticos" por "recursos biológicos" nos Arts 1, 9, 15, 16 E 19*. **Revista Eletrônica de Direito**. v.1, Março, 2006.

MARCHESE, J.A; FIGUEIRA, G.M. O uso de tecnologia pré e pós-colheita e boas práticas agrícolas na produção de plantas medicinais e aromáticas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.7, n.3, p. 86-96, 2005.

MARCO, G. J. **Journal of the American Oil Chemist's Society**. v.45, p.594, 1968.

MARIOT M.P. & BARBERI R.L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus illicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. V.9,p.89-99, 2007.

MARQUES, Marília B., *Acessibilidade aos medicamentos: o desafio de vincular ciência, tecnologia, inovação e saúde no Brasil*. Estudos técnicos do Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Secretaria Técnica do Fundo Setorial de Saúde. BRASIL, 2002.

MATIAS, Edinardo F.F. et al. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 8, n. 3, p. 294-298, jul./set. 2010.

MATOS, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2ª Ed. – Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MELO, Joabe Gomes de, et al. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, v.15, p.8534-8542, 2010.

MENTZ, L.A.; BORDIGNON, A.L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: SIMÕES, Cláudia Maria OLIVEIRA; GUERRA, Miguel Pedro... (et al) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRG, 2008. p.1102.

MICHELIN et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais - **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.15(4), p.316-320, Out./Dez. 2005.

MICHIELIN, E.M.Z. et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. Original Research article. **The Journal of Supercritical Fluids**, Volume 56, Issue 1, February 2011, Pages 89-96.

MILLER, H. E.; **Journal of the American Oil Chemist's Society**. V.48, p.91, 1971.

MIMS, C. et al. *Microbiologia Médica*, 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A.. *Medicinal plants of Brazil*. Michigan: Reference Publications, 2000.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C; SILVA, G. L. -Antibacterial activity of plants extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31: p.247-256, 2000.

NATTHWANI, D. Clinical efficacy and cost/benefit ratio of current treatment of MRSA infections in intensive care units. **La Presse Médicale**, v.33, n.12, p 2 S18-22, 2004.

NIKAIDO, H; Multidrug Resistance in Bacteria, **Annual Review of Biochemistry**. v.78, p.119-146, 2009.

NUNES G.P, SILVA M.F, RESENDE U.M., SIQUEIRA J.M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.13, p.83-92, 2003.

OKEKE, M.I.et al. Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. **Journal Ethnopharmacology**. V.78, p.119-127, 2001.

OMOJASOLA, P F. & AWE, S. The antibacterial activity of the leaf extracts of *Anacardium occidentale* and *Gossypium hirsutum* against some selected microorganisms. **Bioscience Research Communications**. V.18 n.1, September, Nigeria, 2004.

OSTROSKY et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.18(2), p.301-307, Abr./Jun. 2008

PAES, J. B. et al. Substâncias tânicas presentes em várias partes da árvore angico-vermelho *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. var. *cebil* (Gris.) Alts. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 38, n. 87, p. 441-447, set. 2010.

PESSUTO, M.B. et al. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. **Química Nova**, v.32, p.412-416, 2009.

PIMENTA D.S.; FIGUEIREDO M.R.; KAPLAN M.A.C.; Chemical studies on cultivation of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schl.) Mich. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. V.72, p.294, 2000.

DE PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, R. M. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência rural**. V.42, n2, Fev., 2012.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M; OHARA M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo, Ed. Atheneu, 2003, 325 p.

PROENÇA DA CUNHA, A., RIBEIRO, J. A., ROQUE R. O. "*Plantas Aromáticas em Portugal – Caracterização e Utilizações*" Ed. Fundação Calouste Gulbenkian – Lisboa, 2007.

RABANAL, R. M. et al. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**. V.81, Issue 2, p. 287-292, July, 2002.

ROBBERS J.E. Farmacognosia e farmacobiocologia. São Paulo: Premier, 1997. 372p

ROBBINS E COTRAN. Patologia das bases patológicas das doenças. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ROSA Elisa A. da , et al .Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20(4), p.484-488, Ago./Set. 2010

ROSENBAUM, E. E.; HERSCHLER, R. J.; JACOB, S. W.; Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **The Journal of the American Medical Association**. v.192, p.309-313, 1965.

SAKAGAMI Y, KAJAMURA K. Bactericidal activities of desinfectants against vancomycin-resistant Enterococci. **Journal of Hospital Infection**. V.56, p.140-144, 2006.

SANTOS, S.N. et al. Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH. EMBRAPA Meio Ambiente. Comunicado Técnico, 50. Jaguariúna, SP, Julho, 2011.

SANTOS, N.Q. A Resistência Bacteriana no Contexto da Infecção Hospital. **Texto & Contexto Enfermagem**. V.13, p.64-70, 2004.

SILVA JÚNIOR, M.C.; SANTOS, G. C. *100 Árvores do Cerrado: guia de campo*. Brasília, Ed. Rede de Sementes do Cerrado, 2005, 278 p.

SCHERER, R. & GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, n.3, p.654-8, 2009.

SCHNEIDER, N. F. Z.; MOURA, N. F. de; MENDONÇA, L. C.; DENARDIM, R. B. N. Atividade Antimicrobiana das Folhas de *Casearia sylvestris* Swart. **Latin American Journal of Pharmacy**. V.29 (4), p.631-634, 2010.

SERTIÉ, J. A. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. CP.; PENNA, S. C. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*. III: oral and topical anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**. V.31, p. 239-247, 1991.

SHIGEMORI, H. et al. Echinodolides A and B, new cembrane diterpenoids with na eight-membered lactone ring from the leaves of *Echinodorus macrophyllus*. **Journal of Natural Products**. V.65, p.82-84, 2002.

SMID E. J., KOEKEN J. P. G., GORRIS L. G. M.: *Fungicidal and fungistatic action of the secondary plant metabolites cinnamaldehyde and carvone*. In: Modern Fungicides and Antimicrobial Compounds, Lyr H., Russell P.E., Sisler H.D. Eds., Intercept: Andover, U.K., p.173-180, 1996.

SMITH R. D.; YAGO M.; MILLAR M.; COASTJ. A macroeconomic approach to evaluating policies to contain antimicrobial resistance: a case study of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). **Applied health economics and health policy**, v 5, n 1, p 55-65, 2006.

SOUSA, C.M.M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRAJR, G.M.; AYRES, M.C. C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, G.C; HAAS, AP. S.; VON POSER, G.L; SHAPOVAL, E. E. S; ELIZABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.90,n1,p135-143, 2004.

SOUZA, T.M.et al: Phytochemical screening of *Achillea millefolium* harvested at Araraquara – SP. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.8, n.esp., p.151-154, 2006.

SPRINGFIELD EP, Amabeoku G, Weitz F, Mabusela W, Johnson Q . An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine** v.10, p.434-439, 2003.

SCHUCK, V.J.A. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n.1, jan./abr. 2001.

TASSO, Leandro: Modelagem farmacocinética-farmacodinâmica das fluorquinolonas levofloxacino e gatifloxacino. *Tese de Doutorado*. Programa de pós-graduação em Ciências farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 281-301, maio/jun. 2000.

TAVARES, Walter. Antibióticos e Quimioterápicos para o clínico. 2Ed rev. atual. São Paulo. ED. **Ateneu**. 2009.

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Acessado em Março, 2012. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/genus>.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. *Plantas medicinais: cura segura?* **Química Nova**, Vol. 28, n3, p.519-528, 2005.

VIEGAS JUNIOR C., BOLZANI V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, V.29, n2, p.326-337, 2006

VERDAM, M.C.S. & SILVA, C.B. O Estudo de Plantas Medicinais e a Correta Identificação Botânica. Visão Acadêmica. ISSN: 1518-5192 (versão impressa) 1518-8361 (versão online), 2010.

WHO - World Health Organization, General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva: WHO, 2001.

WILMSEN, P. K.; SPADA, D. S.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid Hesperidin in chemical and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, n.12, p.4754-4761, 2005.

WISE, Richard. The urgent need for new antibacterial agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V.23, Jun. 2011.

WOODS-PANZARU, S.; NELSON, D.; MCCOLLUM, G.; BALLARD, L. M.; MILLAR, C. B.; MAEDA, Y.; GOLDSMITH, C. E.; ROONEY, P.; LOUGHREY, A.; RAO, J; MOORE, J. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents described in traditional Ulster cures and remedies. **Ulster Medical Journal**. V.78(1), p.13-15, 2009.

YAKHKESHI, S.; RAHIMI, S; HEMATI MATIN, H.R.; Effects of Yarrow (*Achillea millefolium* L.), Antibiotic and Probiotic on Performance, Immune Response, Serum Lipids and Microbial Population of Broilers. **Journal of Agricultural Science and Technology**, V.14, p.799-810, 2012.

YU, F. et al. Antioxidant activities of crude tea polyphenols, polysaccharides and proteins of selenium-enriched tea and regular green tea. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 5-6, p. 843-848, 2007.

YUNES, R. A. & CECHINEL FILHO V. Plantas Mediciniais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó-SC, **Argos**, 2001, 523 p.

ZGODA, J.R.; PORTER J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology**. V.39, p.221-225, 2001.