

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JULIANA MOSCARDINI CHAVASCO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DE PLANTAS ENCONTRADAS NO CERRADO DO SUL DE  
MINAS GERAIS

Alfenas/MG  
2013

JULIANA MOSCARDINI CHAVASCO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DE PLANTAS ENCONTRADAS NO CERRADO DO SUL DE  
MINAS GERAIS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias.  
Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Alfenas/MG  
2013

JULIANA MOSCARDINI CHAVASCO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS  
VEGETAIS DE PLANTAS ENCONTRADAS NO CERRADO DO SUL DE  
MINAS GERAIS

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas  
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Obtenção e avaliação da  
atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Aprovada em:

Profa. Dra. Amanda Latercia Tranches Dias

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Cássia Carneiro Avelino

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. DR. Eriques Gonçalves da Silva

Instituição: USP-SP

Assinatura:

Dedico a Deus, ao meu esposo, pais, irmãos e amigos pelo apoio na realização deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter guiado meu caminho, e por me fazer persistir sempre.

Ao meu esposo, Claudinei, pelo apoio, orações e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus pais, Kleber e Nelma, pelo amor incondicional, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Fábio e André, por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço à minha orientadora professora Dra. Amanda Latercia Tranches Dias pelo grande aprendizado que me proporcionou, pelas contribuições no meu trabalho, pelos ensinamentos e apoio durante este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos ensinamentos.

A todos os colaboradores do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas pelo auxílio nas atividades executadas.

A União Química Farmacêutica Nacional, sobretudo na pessoa de Paula Melo Suzana Gomes, pela amizade, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

## RESUMO

O uso indiscriminado de antimicrobianos pode estar associado ao fenômeno da resistência microbiana, levando ao insucesso no tratamento das infecções e impulsionando a busca por novas alternativas terapêuticas, dentre elas, os bioativos obtidos a partir de fontes vegetais. Foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de plantas sobre bactérias Gram positiva, Gram negativa, leveduras, *Mycobacterium tuberculosis* H37 e *Mycobacterium bovis* pela técnica de difusão em agar e microdiluição em caldo. Dentre os extratos avaliados pelo método de difusão em agar, o extrato de *Bidens pilosa* folha apresentou a mais expressiva média de halos de inibição de crescimento frente aos microrganismos utilizados, seguido por *Bidens pilosa* flor, *E. pyriformis* folha, *M. cauliflora* folha e *E. pyriformis* semente que apresentaram estatisticamente a mesma média de formação de halos inibitórios sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras. Os extratos de *Heliconia rostrata* não apresentaram atividade. *Mycobacterium tuberculosis* H37 e *Mycobacterium bovis* mostraram-se resistentes a todos os extratos. Dos microrganismos avaliados, as bactérias Gram positivas *M. luteus* e *S. aureus* apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade ( $p > 0.05$ ). As bactérias Gram negativas *E. coli*, *E. cloacae*, *S. marcescens* e *P. aeruginosa* também apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade frente aos extratos ( $p > 0.05$ ). O perfil de sensibilidade dos fungos *C. albicans* e *S. cerevisiae* foram comparáveis entre si e entre as bactérias Gram positivas *B. subtilis*, *E. faecalis* e Gram negativa *S. typhimurium* ( $p > 0.05$ ). Os extratos que apresentaram ação inibitória através do ensaio de microdiluição em caldo foram os mesmos extratos ativos no teste de difusão em agar. A avaliação da citotoxicidade foi realizada sobre células C6-36 de larvas de mosquito *Aedes albopictus*. Os extratos de caule e flor de *Heliconia rostrata*, folha e caule de *Plinia cauliflora*, semente de *Annona crassiflora* e caule, flor e raiz de *Bidens pilosa* não apresentaram toxicidade nas concentrações avaliadas. Os maiores índices de seletividade foram apresentados pelos extratos de *A. crassiflora* caule e *B. pilosa* flor para *S. aureus*, apresentando potencial para estudos como futuros candidatos a fármacos. Dos microrganismos avaliados, as bactérias Gram positivas *M. luteus* e *S. aureus* apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade ( $p > 0.05$ ). Dos microrganismos que apresentaram alguma sensibilidade a qualquer um dos extratos, *M. bovis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. cloacae* e *E. coli* foram estatisticamente, igualmente os menos sensíveis. Apenas os extratos de *B. pilosa* folha apresentou igualdade, estatisticamente significativa, da média de efetividade inibitória quando comparado ao controle positivo, a clorexidina.

Palavras-chave: Extratos vegetais. *Mycobacterium tuberculosis*. Teste de difusão em Agar. Citotoxicidade. Microdiluição.

## ABSTRACT

The indiscriminate use of antibiotics may be associated with the phenomenon of microbial resistance, leading to infections treatment failure and boosting the search for new therapeutic alternatives, among them, the bioactive obtained from plant sources. We evaluated the antimicrobial activity of hydroethanolic extracts of plants on Gram positive, Gram negative bacteria, yeasts, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* H37 through agar diffusion and broth microdilution techniques. Among the extracts evaluated through agar diffusion method, the leaf extract of *Bidens pilosa* showed the most significant average halos of growth inhibition against microorganisms used, followed by flower of *Bidens pilosa* leaf *E. pyriformis*, sheet *M. cauliflora* seed and *E. pyriformis* showed that statistically the same average formation of inhibitory halos on Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and yeast. Extracts of *Heliconia rostrata* showed no activity. *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* H37 were resistant to all extracts. Of the tested microorganisms, Gram positive bacteria *M. luteus* and *S. aureus* showed the same sensitivity profile ( $p > 0.05$ ). Gram negative bacteria *E. coli*, *E. cloacae*, *S. marcescens* and *P. aeruginosa* also showed the same sensitivity profile compared to extracts ( $p > 0.05$ ). The sensitivity profile of the fungi *C. albicans* and *S. cerevisiae* and were comparable between the Gram-positive *B. subtilis*, *E. faecalis* and Gram negative bacteria *S. typhimurium* ( $p > 0.05$ ). The extracts which showed inhibitory action by microdilution sample test were the same active extracts as in agar diffusion test. The Cytotoxicity assessment was performed on cell C6-36 larvae of *Aedes albopictus*. The extracts of *Heliconia rostrata*'s stem and flower, *Plinia cauliflora*'s leaf and stem, *crassiflora Annona*'s seed and stem, *Bidens pilosa*'s root and flower showed no toxicity at the evaluated concentrations. The highest selectivity were presented by stem extracts of *A. crassiflora* and *Bloom B. pilosa* as for *S. aureus* there is potential for studies on future drug candidates. Of the tested microorganisms, Gram positive bacteria *M. luteus* and *S. aureus* showed the same sensitivity profile ( $p > 0.05$ ). The sensitivity profile of the fungi *C. albicans* and *S. cerevisiae* and were compared one another and to *B. subtilis*, *E. faecalis* Gram positive and *S. typhimurium* Gram negative bacteria ( $p > 0.05$ ). Among the microorganisms which showed some sensitivity to any of the extracts, *M. bovis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E.* and *E. cloacae coli* were statistically also less sensitive. Only the leaf extracts of *B. pilosa* showed statistically significant equality of the average inhibitory effectiveness when compared to the positive control and chlorhexidine.

Key Words: Plant extracts. *Mycobacterium tuberculosis*. Agar diffusion test. Cytotoxicity. Microdilution.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Amostra de <i>Bidens pilosa</i> .....	13
Figura 02 - Amostra de <i>Eugenia pyriformis</i> .....	15
Figura 03 - Amostra de <i>Annona crassiflora</i> .....	16
Figura 04 - Amostra de <i>Plinia cauliflora</i> .....	17
Figura 05 - Amostra de <i>Heliconia rostrata</i> .....	18
Figura 06 - Teste de difusão. Controle positivo (rifamicina) e negativo (água destilada) do cultivo de <i>M.bovis</i> .....	24
Figura 07 - Determinação da CIM de extratos de Flor de <i>B. pilosa</i> .....	27
Figura 08 - Formação de halos de inibição do crescimento pelos extratos da 1 - Folha, 2 - caule, 3 - fruto e 4 - semente de <i>Eugenia pyriformis</i> (uvaia). Ausência de halo de inibição frente ao controle negativo 5 – água destilada e o halo de inibição do Controle positivo 6 - clorexidina 0,12% frente a <i>M. luteus</i> .....	29
Figura 09 - Células normais da linhagem.....	33
Figura 10 - Células alteradas da linhagem C6/36 pelos extratos vegetais de semente de <i>E. pyriformes</i> na concentração de 5mg/mL .....	33
Figura 11 - Reação de MTT para avaliação da toxicidade dos extratos .....	34

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	Objetivos Gerais .....	20
2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
2.1	Coleta e identificação dos vegetais .....	21
2.2	Preparo dos extratos das plantas .....	21
2.3	Linhagens microbianas utilizadas .....	22
2.4	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos .....	22
2.5	Avaliação da atividade antimicobacteriana dos extratos.....	23
2.6	Avaliação da Atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular .....	24
2.7	Avaliação do perfil fitoquímico dos extratos .....	25
2.8	Determinação do índice de seletividade dos extratos.....	25
2.9	Análise estatística .....	25
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
3.1	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos .....	26
3.1.1	<i>Bidens pilosa</i> .....	26
3.1.2	<i>Eugenia pyriformis</i> Cambess .....	28
3.1.3	<i>Annona crassiflora</i> .....	29
3.1.4	<i>Plinia cauliflora</i> .....	30
3.1.5	<i>Heliconia rostrata</i> .....	31
3.2	Avaliação da Atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular .....	33
4	CONCLUSÕES.....	38
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as savanas, chamadas de cerrado, chegaram a ocupar uma área heterogênea descontínua de aproximadamente dois milhões de km<sup>2</sup> de extensão em mais de dez estados, o que representa cerca de 23% da área do território brasileiro.

Apesar de se encontrar bastante negligenciada (KLINK; MACHADO, 2005), é considerada a savana de maior diversidade de espécies vegetais e animais, resultado da diversidade de ambientes (MITTERMEIER et al., 2005; MYERS et al., 2000).

Do cerrado extraem-se diferentes tipos de produtos animais e vegetais sendo que mais de 200 espécies de plantas potencialmente úteis ainda não foram devidamente exploradas e cerca de 50 são pouco exploradas e apenas algumas dezenas destas são exploradas comercialmente (FERREIRA, 2011).

O cerrado é um dos 'hotspots' para a conservação da biodiversidade mundial. Nos últimos 35 anos mais da metade dos seus 2 milhões de km<sup>2</sup> originais foram cultivados com pastagens plantadas e culturas anuais. A riqueza de espécies de aves, peixes, répteis, anfíbios e insetos é igualmente grande, embora a riqueza de mamíferos seja relativamente pequena. As taxas de desmatamento no cerrado têm sido historicamente superiores às da floresta Amazônica e o esforço de conservação do bioma é muito inferior ao da Amazônia: apenas 2,2% da área do cerrado se encontram legalmente protegida. Diversas espécies animais e vegetais estão ameaçadas de extinção e estima-se que 20% das espécies ameaçadas ou endêmicas não ocorram nas áreas legalmente protegidas.

O cerrado ocupa uma área na porção central do Brasil e engloba parte dos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo e Tocantins, além do Distrito Federal (SANO et al., 2008).

A vegetação mais típica, o cerrado *stricto sensu*, é uma savana coberta por um extenso "tapete" de gramíneas, com pequenas árvores com ramos de troncos retorcidos, arbustos e palmeiras sem tronco (Conservação Internacional, 2005). O clima do cerrado é marcado por uma nítida sazonalidade. Nos meses mais quentes, do final da primavera e todo o verão, as chuvas se concentram e os dias são mais

longos. No inverno, ao contrário, as gramíneas ficam ressecadas e amarelas, e parte das árvores e arbustos perde a folhagem, que depois é trocada por outra nova.

Neste período seco, paradoxalmente, algumas árvores típicas, como o ipê-amarelo, florescem, dando ao bioma uma belíssima coloração.

O Brasil é considerado o país de maior diversidade biológica, destacando-se no *ranking* mundial com cerca de 20% da diversidade de plantas do mundo (CALIXTO, 2003). Para o território brasileiro estima-se em 45,3 mil a 49,5 mil, o número de espécies de plantas descritas (SHEPHERD, 2002).

A tradição popular é a origem de valiosos conhecimentos acerca das plantas, porém o uso indevido de determinadas espécies como medicinais é muito perigoso, podendo acarretar desde leves efeitos colaterais, até a morte do indivíduo. Diante desses fatos, é importante discriminar as relações entre a ciência e o empirismo, sendo indispensável uma ampla pesquisa em plantas medicinais (BOSCOLO et al., 2008).

O uso tradicional de diversas plantas medicinais baseado em conhecimentos populares, aliado à crença de que, por ser natural não causa reações adversas, fez com que poucas plantas medicinais fossem avaliadas através de estudos pré-clínicos e clínicos, a fim de comprovar sua eficácia e segurança. Além disto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração de seus constituintes, até a elaboração do medicamento final (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

Os fitoterápicos ganharam terreno no arsenal terapêutico mundial, principalmente por sua baixa toxicidade, baixo custo e uso de tecnologias que utilizam baixos níveis de investimento e de insumos (VALDES et al., 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o desenvolvimento de pesquisas visando ao uso da flora nacional para fins terapêuticos, visando diminuir o número de excluídos dos sistemas governamentais de saúde. Associados a essa expansão, os fitoterápicos deixaram de ser vistos simplesmente como um recurso da medicina popular, constituindo-se matéria-prima para indústrias de produtos farmacêuticos (MELO et al., 2001). A facilidade de acesso aos fitoterápicos é uma das principais razões que justificam sua ampla utilização em países em

desenvolvimento e nesse sentido a OMS tem trabalhado para desenvolver e implantar normas, pautas e metodologias que permitam garantir a eficácia, segurança e qualidade (CORTÉS-ROJAS, 2011).

Sabendo-se que cada espécie desconhecida pode vir a ser um medicamento importante (e conseqüentemente um produto lucrativo), não é nenhuma surpresa que o interesse das indústrias farmacêuticas esteja voltado para esta área (SCHENKEL et al., 2001).

Espécies vegetais brasileiras são usualmente utilizadas como antifúngicos e é notório que o Brasil, devido à sua diversidade vegetal, é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos com ação medicinal, largamente utilizados em suas diversas regiões (BOTELHO et al., 2007).

No Brasil 20 % da população consomem 63 % dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação. O interesse da pesquisa nesta área tem aumentado nos últimos anos onde estão sendo instituídos projetos financiados por órgãos públicos e privados. Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos para permitir a elaboração de monografias completas e modernas. Muitas espécies são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança, o que demonstra que em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, existe uma enorme lacuna entre a oferta de plantas e as poucas pesquisas. Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO et al., 2006).

O uso indiscriminado de antibióticos pela população tem causado sérios problemas de saúde pública pelo mundo inteiro devido ao fato dos microrganismos terem a capacidade de desenvolver resistência a esses agentes terapêuticos (NASCIMENTO et al., 2000).

A resistência microbiana é um problema que cresce cada vez mais, revelando um aumento alarmante na incidência de doenças infecciosas novas e reemergentes. Tal fato impulsiona a busca por novas substâncias antimicrobianas, com estruturas químicas e mecanismos de ação originais, a partir de outras fontes incluindo as plantas (NASCIMENTO et al., 2000 ; RAJENDRAN et al., 2009).

O abuso por longos anos da utilização de compostos antimicrobianos se apresenta como fator principal para o surgimento do fenômeno de resistência (ANDREMONT,

2001).

O principal problema enfrentado em relação às bactérias patogênicas é a multirresistência aos antimicrobianos e várias medidas tecnológicas têm sido sugeridas para resolver este problema e uma delas é a procura de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais (CECHINEL FILHO, 2000; SOUZA et al., 2003). Bactérias, por exemplo, têm mostrado capacidade de resistir e se adaptar ao seu ambiente, incluindo o desenvolvimento de diferentes mecanismos de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos antigos e novos (HERSCHMARTINEZ et al., 2005).

De acordo com a literatura, bactérias pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, principalmente, *M. tuberculosis* estão se tornando resistente aos antibióticos, provavelmente devido ao longo tempo de tratamento e aos efeitos adversos das drogas, fatores que colaboram para não adesão ao tratamento pelo paciente (TRABULSI, 2005). A tuberculose permanece ainda neste milênio, a doença infecciosa que mais mata no mundo, com 1,6 milhões de mortes em 2005. Um terço da população mundial está infectada pelo *M. tuberculosis* e grande proporção dela poderão desenvolver e transmitir a doença para a comunidade (KRITSKI, 2007). Devido à ocorrência de fatores indesejáveis, como o surgimento de resistência de algumas cepas aos antifúngicos convencionais – principalmente em indivíduos imunodeprimidos – e a presença de efeitos tóxicos destes, o estudo de plantas com propriedades terapêuticas, abrangendo aquelas com atividade antimicótica, tem crescido consideravelmente (MENEZES et al., 2009).

Atualmente, é grande o interesse das indústrias farmacêuticas pelo uso da biodiversidade como fonte de novos medicamentos (BOLDI, 2004) e tem se destacado, cada vez mais, a importância da integração das indústrias farmacêuticas com universidades nos estudos de bioprospecção de recursos naturais na busca de novos medicamentos (MIRANDA, 2007).

Dentre as plantas encontradas no cerrado sul mineiro, *Bidens pilosa* Linné é amplamente utilizada na medicina tradicional para mordidas de cobras, picadas de inseto, feridas, choque após acidentes, problemas pulmonares, febre, infecções de olhos (KHAN et al., 2001), malária (ABAJO et al., 2004), como anti-reumático, anti-inflamatório, diurético, antibiótico (CHIANG et al., 2004), além de propriedades anti-diabéticas devido à presença de glicosídeos poliacetênicos (CHIEN et al., 2009) e como anti-gripal e tratamento da gastroenterite e hepatite (CHANG et al., 2001). A

planta é anual, ereta, com ramificações herbáceas que crescem até 1,5 m de altura, minuciosamente peludas nas hastes. As folhas são opostas, com dentes simples e ovais, compostas de quatro a sete folhas lanceoladas (MORTON, 1962; GEISSBERGER; et al., 1991). É amplamente distribuída nas regiões subtropicais e tropicais do mundo (DEBA et al., 2008). No Brasil, *B. pilosa*, popularmente conhecida como picão preto, é encontrada em praticamente todo o território, com maior concentração nas áreas agrícolas da região Centro-Sul, onde se constitui numa das mais importantes plantas infestantes (KISSMANN et al., 1992). Extensas pesquisas nas últimas décadas têm mostrado que *B. pilosa* possui atividades antiviral (CHIANG et al., 2003.), antifúngica (MOTSEI et al., 2003.; DEBA et al., 2008) e antibacteriana (GEISSBERGER et al., 1991; RABE et al., 1997; KHAN et al., 2001; ROJAS et al., 2006).

*B.pilosa* é utilizada na forma de infusão, sendo utilizadas todas as partes da planta, com muitas indicações, mas as mais comuns são antissepsia bucal e anti-ictérica (ROJAS et al., 2006). Algumas classes de compostos, como flavonóides e poliacetilenos foram isolados de *B. pilosa* (OLIVEIRA et al.,2004). Segundo Martins et al. (2000), os seus principais constituintes químicos são: ácido salicílico, taninos, limoneno, candineno, timol,  $\alpha$ -pineno e afelandreno.



FIGURA 01 - Amostra de *Bidens pilosa*

Fonte: acesso [http://www.alpine-plants-jp.com/art\\_b/kosendangusa\\_1.htm](http://www.alpine-plants-jp.com/art_b/kosendangusa_1.htm) em 5 Jul. 2012.

*Eugenia pyriformis* Cambess (figura 02), popularmente conhecida como uvaia, uvaieira, uvalha, uvalheira, é uma espécie de hábito arbóreo que mede aproximadamente de 5 a 15 m de altura, possui frutos indeiscentes, carnosos, piriformes, pilosos, com coloração amarela, comestíveis, de sabor adocicado e acidulado, podendo ser utilizados na fabricação de sucos, vinagre e vinho. As sementes apresentam tegumento de coloração castanha, cotilédones carnosos e justapostos, e após a extração, essas oxidam-se rapidamente e escurecem, sendo consideradas sensíveis à dessecação (ANDRADE; FERREIRA, 2000; DELGADO; BARBEDO, 2007). Sua alta perecibilidade restringe a comercialização *in natura* (SCALON et al., 2004). Várias espécies de aves apresentam o fruto em sua dieta, o que torna essa espécie vegetal recomendada para reflorestamentos heterogêneos em áreas degradadas, com a finalidade de recompor a vegetação (ANDRADE & FERREIRA, 2000).

Segundo Stieven, Moreira e Silva, (2009) o fruto da *E. pyriformis* apresenta atividade bacteriostática frente a isolados de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Theodoluz et al., (1988) encontrou nas folhas de *E.pyriformis* Cambess flavonóides com propriedades inibidoras da xantino-oxidase, que podem atuar no tratamento da gota humana.

Glicosídeos flavônicos e esteroides e/ou triterpenoides foram encontrados particularmente no extrato hidroalcoólico de folha, enquanto que saponinas, taninos e ácidos fixos foram detectados no extrato aquoso, tanto de folha como de caule (ARMSTRONG, 2011).



FIGURA 02 - Amostra de *Eugenia pyriformis*

Fonte: <http://familiabelle.blogspot.com.br/p/agrofloresta-e-frutas-nativas.html> acesso em 5 Jul. 2012.

A família Annonaceae é constituída por cerca de 120 gêneros e aproximadamente 2300 espécies. Plantas desta família possuem componentes como alcalóides e acetogeninas, que apresentam atividade biológica como: antifúngicas, antitumoral, antimicrobiana, antimalárica, herbicidas, vermicida, entre outras (NASCIMENTO et al., 2003).

*Annona crassiflora* Mart (Figura 03) é uma espécie frutífera característica e exclusiva do cerrado brasileiro, conhecida também como araticum, marolo, cabeça-de-negro, e pinha do cerrado. Seu fruto é do tipo baga subglobosa, de superfície tomentosa e tuberculada, de cor verde com o fruto em desenvolvimento, e marrom quando maduro, sendo uma das espécies mais arbóreas do Cerrado com potencial alimentar e econômico a ser explorado (MELO, 2005).

Sua distribuição é bastante ampla, ocorrendo nos Cerrados dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Distrito Federal, Mato Grosso, Maranhão, Goiás, Tocantins, Pará, Bahia e Piauí (RIBEIRO et al., 2000). A polpa é levemente adocicada e de cheiro agradável. Além do consumo in natura do fruto, são inúmeras as receitas de doces e bebidas que levam o sabor perfumado e forte de sua polpa (FERREIRA, 2011).



FIGURA 03 - Amostra de *Annona crassiflora*

Fonte: <http://lulussweetsecrets.blogspot.com.br/2011/04/marolo-candies-and-ice-cream.html> acesso em 5 Jul. 2012.

*Plinia cauliflora* Berg (*Myrciaria cauliflora* Berg) é uma árvore frutífera pertencente à família Myrtaceae, de ocorrência espontânea em grande parte do Brasil. Seus frutos são tipo baga globosa de até 3 cm de diâmetro, com casca avermelhada quase preta, polpa esbranquiçada mucilaginosa, agridoce, muito saborosa, apresenta comumente uma única semente, mas podendo apresentar até 4 sementes. Pode ser consumida ao natural ou em geléias. A polpa fermentada produz licor, vinho e vinagre. A casca é adstringente, útil contra diarreia e irritações da pele. Também tem indicações na medicina popular como antiasmáticas, na inflamação dos intestinos e hemoptise. Os estudos fitoquímicos da jabuticaba encontrados na literatura são poucos, estando reportada a presença de ácido ascórbico, taninos e glicosídeos cianidínicos e peonidínicos (REYNERTSON, 2006). A jabuticaba, embora popular em todo o País, não chega a ter valor comercial muito alto, por ser muito perecível, mas tem sua venda assegurada. Apesar de ser grande a produção de um único pé, depois de colhida, a fruta tem uma vida útil até três dias, o que prejudica a sua comercialização (LIMA et al., 2008). O gênero *Myrciaria* apesar de possuir propriedades antissépticas amplamente estudadas, não apresenta grandes estudos em relação ao seu potencial terapêutico (MOHANTY; COCK, 2009). Dentre as várias espécies do gênero, destaca-se a *Plinia cauliflora* (*Myrciaria cauliflora*) (Figura 04), conhecida como jabuticabeira, uma árvore frutífera da família Myrtaceae, nativa da Mata Atlântica, podendo ser encontrada desde o Pará ao Rio

Grande so Sul (LIMA et al., 2008; ALVARENGA et al., 2007; COSTA et al., 2009). *Plinia cauliflora* apresentou potencial antimicrobiano *in vitro*, sobre as linhagens de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Lactobacillus casei* (MACEDO-COSTA, 2010).



FIGURA 04 - Amostra de *Plinia cauliflora*

Fonte: <http://www.plant-care.com/1594-jaboticaba.html> acesso em 5 Jul. 2012.

O gênero *Heliconia* é muito pouco estudado e ainda não é certo o número de espécies existentes, porém estima-se que haja entre 150 a 250 espécies. No Brasil, cerca de 40 espécies encontram-se distribuídas na floresta Amazônica e Atlântica (MARQUES et al., 2004). Dentre as várias espécies do gênero, destaca-se a *Heliconia rostrata* (Figura 05) também conhecida como bananeira de jardim, planta herbácea, perene, com reprodução sexuada ou propagação vegetativa por rizoma. A espécie produz uma inflorescência terminal constituída por brácteas vermelhas, cada uma das quais apresentam várias flores hermafroditas e amarelas, (TORRES et al., 2005). As pesquisas têm demonstrado poucos estudos envolvendo a espécie *Heliconia rostrata* e não foi encontrada referência quanto ao seu potencial antimicrobiano, por isso, esta pesquisa visou investigar a possível atividade antimicrobiana desta planta possibilitando a descoberta de um novo componente com possível atividade antimicrobiana.



FIGURA 05 - Amostra de *Heliconia rostrata*

Fonte: Acesso <http://www.hear.org/starr/images/image/?q=071024-0406&o=plants> em 5/7/2012

Uma forma de complementar os estudos com extratos vegetais é associá-los a bioensaios, por esta razão muitos pesquisadores têm inserido dentro de suas rotinas ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas. Dentre esses bioensaios, encontra-se o estudo da toxicidade sobre cultura celular utilizando células de animais e humanas, também alvo deste estudo.

A necessidade por novas substâncias com propriedades antimicrobianas reforça a crescente investigação do potencial terapêutico de plantas medicinais, onde alguns de seus compostos com propriedade antimicrobiana como flavonóides, alcalóides, taninos e saponinas têm sido objetos de interesse para o tratamento de vários tipos de infecções humanas (VERDI et al., 2005; SANTOS et al., 2010).

Cowan (1999) relatou baseado em trabalhos encontrados na literatura, que a atividade antimicrobiana dos flavonóides, possivelmente, é devida à habilidade deste grupo de se complexar com proteínas solúveis e extracelulares e também com a parede de células bacterianas.

O mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos explica-se por três hipóteses. A primeira pressupõe os taninos inibindo enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; a segunda inclui a ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e a terceira fundamenta-se na complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

A capacidade das saponinas de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas celulares podem alterar a permeabilidade das mesmas ou até mesmo levar a sua destruição (SCHENKEL et al., 2001).

Os alcalóides são compostos complexos, de natureza básica, definidos pela função amina, que confere aos seus constituintes, propriedades químicas que estão relacionadas a uma toxicidade elevada e uma atividade farmacológica notável. Compostos isolados e extratos de plantas ricas em alcalóides, já demonstram atividade antimicrobiana em vários estudos (BRUNETON, 1999).

Deve-se levar em consideração a resistência microbiana, apontada como um problema de saúde pública de nível mundial, implicando na procura de novas substâncias com mecanismos de ação distintos, para que se possa formular um produto seguro, eficaz e de menor custo. Por conseguinte, torna-se justificável a execução desse trabalho, pois possibilitará o estudo da viabilidade do emprego de extratos de plantas encontradas no cerrado do sul de Minas Gerais como possíveis agentes antimicrobianos através das avaliações antibacterianas, antifúngicas e tóxicas. Este estudo contribuirá sobremaneira para pesquisas nacionais e internacionais que visam à bioprospecção de novos bioativos vegetais, seguros do ponto de vista clínico, e que apresentem potenciais como futuros candidatos a fármacos para emprego em esquemas terapêuticos antimicrobianos.

## 1. 1 Objetivos gerais

Avaliar e comparar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas encontradas no cerrado do sul de Minas Gerais sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e leveduras.

Avaliar o potencial citotóxico dos extratos sobre cultura celular eucariótica.

Determinar o perfil fitoquímicos dos extratos para justificar possível atividade antimicrobiana.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Coleta e identificação dos vegetais

As coletas dos espécimes vegetais foram realizadas nas cidades de Pouso Alegre -MG (*Bidens pilosa*), Alfenas-MG (*Eugenia pyriformis* e *Plinia cauliflora*), Areado-MG (*Heliconia rostrata*) e Alterosa-MG (*Annona crassiflora*).

Os exemplares de *B. pilosa* (Picão preto) foram coletados em janeiro de 2011, no Bairro Jatobá, na cidade de Pouso Alegre – MG (22° 27 '75" S , 18° 45' 90" W).

A coleta das amostras de caule, folhas e frutos de exemplares adultos de *E. pyriformis* (Uvaia) foi realizada na zona rural do município de Alfenas – MG (21° 25' 44" S e 45° 56' 49" W) em janeiro de 2011.

Amostras de folha, caule e fruto de exemplares adultos de *Plinia cauliflora* (Jabuticaba) foram coletadas em janeiro de 2011, na cidade de Alfenas-MG (21° 25' 44" S, 45° 56' 49" W).

As coletas das folhas, flores, pseudocaule e rizoma de *Heliconia rostrata* (Bananeira de Jardim) foram realizadas na Chácara Cabo Verde, município de Areado-MG, (21° 24'39,44" S e 46° 08' 53,81"W) em janeiro de 2011.

A coleta de amostras do fruto, caule e folha de *Annona crassiflora* (Marolo) foi realizada no município de Alterosa, no distrito de Divino Espírito Santo (21° 8' 50.18"S e 46° 5' 13.06"W) em março de 2011.

As amostras de *Bidens pilosa*, *Eugenia pyriformis*, *Plinia cauliflora*, *Heliconia rostrata* e *Annona crassiflora* foram identificadas pelo Professor Dr. Marcelo Polo e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) recebendo os números de exsicatas 1745, 1459, 1637, 1636 e 1401 respectivamente.

### 2.2 Preparo dos extratos das plantas

As partes frescas das plantas (folhas, flores, raízes, caules e frutos) foram limpas e cortadas manualmente. Foram preparados extratos hidroetanólicos na proporção de 20% p/v utilizando álcool etílico a 70% em um liquidificador doméstico.

Os extratos preparados foram macerados por 7 dias e mantidos ao abrigo da luz, com agitação diária. Após maceração, foram filtrados em filtro de nylon e posteriormente em filtro de papel de filtro tipo xarope. Após a filtração, os extratos foram submetidos à concentração em rota-evaporador à pressão negativa de 500 mmHg e 60°C. Posteriormente os mesmos foram distribuídos em frascos com 5 mL, congelados e liofilizados. No momento do uso foram pesados e ressuspensos em água destilada para obtenção de concentração de 100 mg/mL. Antes do uso, os extratos foram submetidos à esterilização por filtração em filtro de 0,45µm Millipore (SILVA et al., 2010).

### 2.3 Linhagens microbianas utilizadas

Leveduras: *Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601; Bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; Bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Serratia marcescens* LMI-UNIFAL, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 *Enterobacter cloacae* LMI-UNIFAL. Micobacterias: *Mycobacterium bovis* (cepa BCG) ATCC 27289 e *Mycobacterium tuberculosis* (H37) ATCC 27294.

### 2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

Os testes microbiológicos foram feitos no Laboratório de Microbiologia, da UNIFAL-MG. A ação antimicrobiana foi avaliada por difusão em Agar segundo algumas modificações propostas na metodologia definida nos documento M7A6 (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2003) para bactérias, M24A2 para Micobacteria e M44A2 (CLSI, 2009) para fungos. Foram perfurados poços de 4 mm de diâmetro na superfície do meio de cultura com auxílio de um tubo metálico. Para as bactérias foi utilizado o Ágar Mueller Hinton Difco® e para as leveduras o Ágar Mueller Hinton Difco® adicionado de 2% de glicose. Foi preparada uma suspensão de microrganismos em solução de NaCl a 0,9% (solução salina) com

turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland, que equivale a aproximadamente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, e as mesmas foram inoculadas na superfície do meio de cultura. Os extratos foram colocados nos poços num volume de 40  $\mu$ L, juntamente com os controles positivo (solução de clorexidina a 0,12%) e negativo (água destilada). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi feita a leitura dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano com o auxílio de uma régua.

## 2.5 Avaliação da atividade antimicobacteriana dos extratos

A atividade sobre *M. bovis* e *M. tuberculosis* (H37) foi determinada pela técnica de difusão em meio Agar Middlebrook 7H10 Difco® adicionado de Middlebrook OADC Enrichment®. Os extratos vegetais, a 100 mg/mL, num volume de 10  $\mu$ L, foram colocados em discos de papel de filtro tipo xarope de 10 mm de diâmetro e secos a 37°C. O Agar Middlebrook 7H10 Difco® foi inoculado com uma suspensão de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (H37) com turvação correspondente ao tubo 0,5 da Escala de Mac Farland com auxílio de pérolas de vidro para desagregação das colônias. Foi utilizado como controle positivo solução de Rifampicina 30  $\mu$ g e como controle negativo, água destilada (Figura 06). As culturas foram incubadas a 37°C por 28 dias.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para todos os extratos frente a todos os microrganismos, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo conforme metodologia proposta no documento M27A3 (CLSI, 2008) a partir da concentração de 50 mg/mL até 0,010 mg/mL. Para *M. bovis* e *M. tuberculosis* foi determinada a CIM em diluição no Agar Middlebrook 7H10 Difco® nas concentrações de 50 mg/ml, 25mg/mL e 12,5 mg/mL.



FIGURA 06 - Teste de difusão. Controle positivo (rifampicina) e negativo (água destilada) do cultivo de *M. bovis*

Fonte: o autor

## 2.6 Avaliação da Atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular

A citotoxicidade foi avaliada através do método que se baseia na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em um composto colorido denominado formazan. Neste teste foram semeadas  $1 \times 10^4$  (células derivadas de larvas de mosquito *Aedes albopictus*) por poço, em placas de 96 poços Corning contendo meio de cultura L-15, acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Após 24 h de incubação a temperatura ambiente, o meio de cultivo foi removido e adicionado à cultura 0,1 mL de meio L-15 contendo 1% de soro fetal bovino com diluições decrescentes dos extratos (5mg/mL a 0,039 mg/mL). As microplacas foram incubadas a temperatura ambiente por 48h. Após esse período acrescentou-se 10  $\mu$ L de MTT a uma concentração de 5mg/mL e incubou-se por 4 h a temperatura ambiente para a incorporação do MTT e formação dos cristais de formazan (Figura 11). Posteriormente houve remoção cuidadosa do meio de cultura e solubilização dos cristais de formazan pela adição de 100  $\mu$ L de dimetil sulfóxido (DMSO). A análise espectrofotométrica foi realizada em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 600 nm. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada utilizando a fórmula  $[(A-B) / A \times 100]$ , onde A e B são valores das

densidades ópticas das células controle e tratadas, respectivamente (Figuras 09 e 10). A concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) foi estimada a partir de curvas de concentração-efeito após análise de regressão linear (ARAUJO, et. al., 2008). Os testes foram realizados em duplicata juntamente com o controle da viabilidade celular.

## **2.7 Avaliação do perfil fitoquímico dos extratos**

Na triagem fitoquímica foram pesquisados os seguintes grupos de princípios ativos: flavonóides, pela técnica de reação de Shinoda e reação com hidróxidos alcalinos; taninos, pelo método de precipitação com sais de ferro, acetato de chumbo, alcalóides, gelatina e acetato de cobre; alcalóides, pelo método de precipitação com os reativos de Mayer, Bertrand, Dragendorff e Bouchardat; saponinas, pela agitação do extrato aquoso com formação de espuma persistente e antraquinonas pela reação de Borntrager direta (COSTA, 1982).

## **2.8 Determinação do índice de seletividade dos extratos**

O índice de seletividade dos extratos foi calculado avaliando-se a razão entre a relação entre a  $CC_{50}$  e a CIM (KLEYMANN & HANS-OTTO WERLING, 2004). Valores superiores a 1 foram considerados promissores para a seleção do extratos para estudos posteriores.

## **2.9 Análise estatística**

Os dados foram tratados estatisticamente por análise de variância (ANAVA) e teste de Scott-Knott a 5% de significância, utilizando-se o Software Sisvar versão 5.3, 2010.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

##### 3.1.1 *Bidens pilosa*

O extrato do caule apresentou atividade frente a quatro microrganismos: *S. aureus*, *M. luteus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. O maior halo de inibição, em valor absoluto, foi verificado para *M. luteus*. Os extratos da flor e folha inibiram o crescimento de dez microrganismos e o maior halo de inibição, em valor absoluto, foi verificado para *S. cerevisiae*. O extrato da folha de *Bidens pilosa* apresentou a mais expressiva média de halos de inibição de crescimento frente aos microrganismos utilizados ( $p < 0.05$ ). Os maiores halos de inibição foram observados frente a *S. aureus*, *M. luteus*, *S. typhimurium*, *B. cereus*, *E. coli*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. O extrato da folha não apresentou atividade frente a *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. faecalis*. O menor halo de inibição de crescimento foi verificada para *S. marcescens*. O extrato do caule não apresentou atividade sobre bactérias Gram negativas. Os menores halos de inibição foram verificados para *C. albicans* e *S. cerevisiae*. O extrato da flor não apresentou atividade frente a *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. bovis* e *M. tuberculosis*. De acordo com os resultados apresentados na tabela 01 podemos observar que o extrato da raiz de *B. pilosa* não inibiu o crescimento dos microrganismos testados.

Motsei et al., (2003) e Deba et al., (2008), não especificando a origem do extrato, demonstraram que *B. pilosa* possui atividade antifúngica; resultado semelhante ao deste trabalho, no entanto as leveduras testadas não apresentaram sensibilidade ao extrato da raiz de *B. pilosa*. Rojas et al., (2006) também não especificando a origem do extrato, demonstraram que *B. pilosa* possui atividade inibitória do crescimento sobre *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus*, resultado semelhante ao deste trabalho, verificando que as mesmas bactérias só não foram sensíveis ao extrato da raiz de *B. pilosa*. Quanto à determinação da CIM verificamos que variou de 1,56 mg/mL até 25 mg/mL (Figura 07). *S. aureus* mostrou-se o mais sensível ao extrato de flor cuja CIM foi de 1,56 mg/mL (Tabela 01). Nos ensaios fitoquímicos, o extrato de raiz apresentou em sua composição tanino e saponina. Os extratos do

caule apresentaram alcalóide, tanino e saponina. Os extratos da flor e folha apresentaram alcalóide, flavonóide, tanino e saponina (Quadro 01). Resultados semelhantes aos de Oliveira et al.(2004) e Martins et al. (2000), não especificando a origem do extrato, encontraram flavonóides e taninos, respectivamente. Considerando a riqueza de constituintes presentes nestes extratos, a atividade antimicrobiana pode estar relacionada à presença de compostos como tanino, saponina, flavonóide e alcalóides encontrados, uma vez que estes compostos têm comprovada ação antimicrobiana.

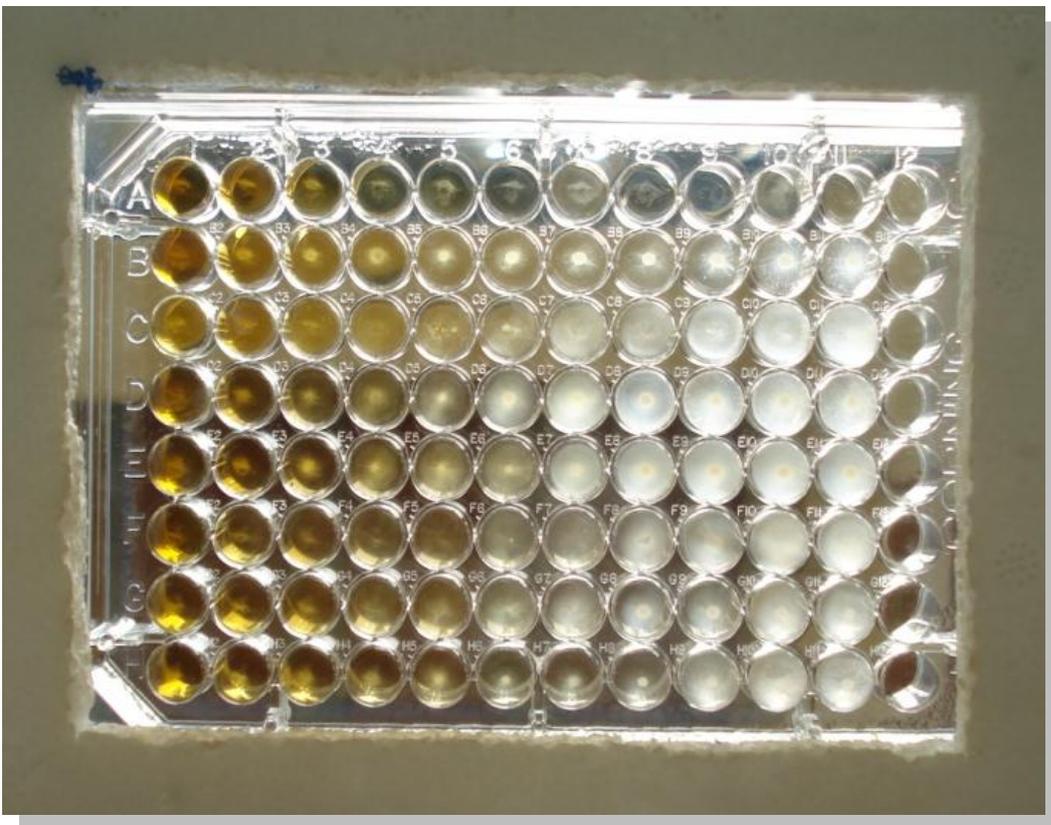


FIGURA 07 - Determinação da CIM de extratos de Flor de *B. pilosa*  
Fonte: o autor

### 3.1.2 *Eugenia pyriformis* Cambess.

De acordo com os resultados apresentados nos tabela 01 podemos observar que o extrato da folha de *E. pyriformis* inibiu o crescimento de todos os microrganismos, com exceção de *M. bovis* e *M. tuberculosis*. O maior diâmetro de halo de inibição, em valor absoluto, foi verificado para *M. luteus*. O diâmetro dos halos de inibição foi equiparado entre as bactérias Gram positivas e Gram negativas. Também hoveram halos de inibição frente às leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*. O extrato do caule inibiu o crescimento de dez microrganismos (67%). O maior diâmetro do halo de inibição foi verificado para *M. luteus*, enquanto para *S. marcescens* e *P. aeruginosa* foram observados os menores diâmetros. O extrato do fruto inibiu o crescimento de nove microrganismos (60%). O extrato não apresentou atividade frente a *P. mirabilis*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

O extrato da semente inibiu o crescimento de 13 (87%) dos 15 microrganismos. O extrato não apresentou atividade frente a *S. marcescens*. O maior diâmetro de halo de inibição foi verificado para *M. luteus* (Figura 08). O extrato apresentou atividade antifúngica frente a *S. cerevisiae* e *C. albicans*. No nosso trabalho, o extrato do fruto de *E. pyriformis* apresentou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis* e *S. aureus* e *P. aeruginosa*, diferentemente de Stieven et al., (2009), que encontrou atividade frente a *E.coli* e não encontrou atividade frente a *P. aeruginosa*. Esta diferença nos resultados pode estar relacionada à origem dos extratos testados, pois a linhagem ATCC utilizada foi a mesma.

Os extratos da folha apresentaram em sua composição alcalóide, flavonóide, tanino e saponina. Os extratos de caule apresentaram tanino e saponina. Os extratos de semente apresentaram alcalóide, tanino e saponina (Quadro 01). Resultados deste trabalho são semelhantes aos de Armstrong (2011) que encontrou flavonóide, tanino e saponina nos extratos. Considerando à presença de compostos como tanino, saponina, flavonóide e alcalóides, que possuem ação antimicrobiana comprovada, conclui-se que a atividade antimicrobiana dos extratos pode estar relacionada a presença destes compostos. Com relação a CIM, os valores variaram de 12,50 a 50 mg/mL.

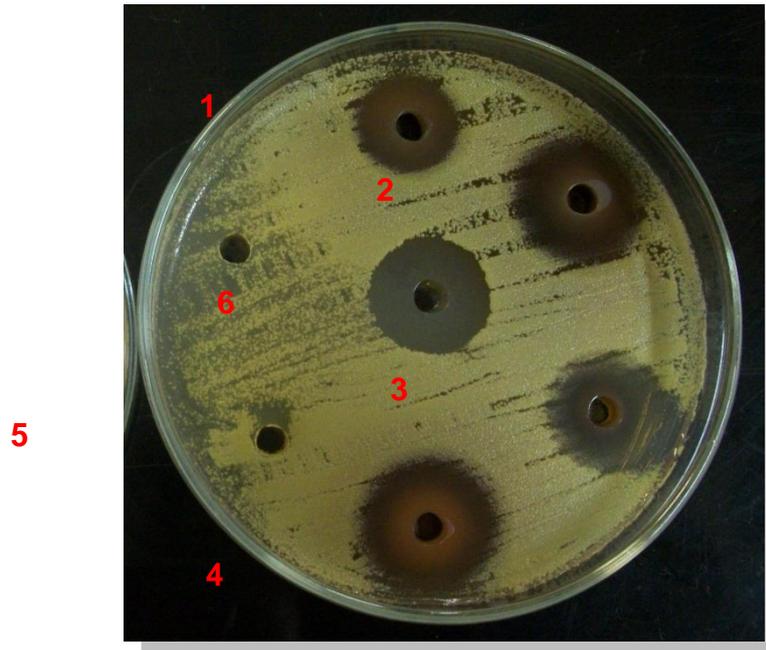


FIGURA 08 - Formação de halos de inibição do crescimento pelos extratos da 1 - folha, 2 - caule, 3 - fruto e 4 - semente de *Eugenia pyriformis* (uvaia). Ausência de halo de inibição frente ao controle negativo 5 – água destilada e o halo de inibição do controle positivo 6 - clorexidina 0,12% frente a *M. luteus*.

Fonte: o autor

### 3.1.3 *Annona crassiflora*

Na tabela 01 podemos observar que o extrato da folha de *A. crassiflora* inibiu o crescimento de seis (40%) dos 15 microrganismos testados: *S. aureus*, *M. luteus*, *P. mirabilis*, *B. subtilis*, *E. faecalis* e *B. cereus*. Comparando o tamanho dos halos de inibição, em valores absolutos, podemos concluir que as bactérias Gram positivas apresentaram maiores índices de sensibilidade que as Gram negativas. O extrato não apresentou atividade antimicobacteriana e nem sobre as leveduras. O extrato do caule inibiu o crescimento de sete (47%) dos 15 microrganismos testados. O extrato não apresentou atividade frente aos microrganismos *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. cerevisiae* e *M. bovis* e *M. tuberculosis*. O extrato da polpa inibiu o crescimento de cinco (33%) dos 15 microrganismos.

O extrato da semente não inibiu o crescimento de nenhum dos microrganismos testados. O extrato da casca do fruto inibiu o crescimento de sete

dos 15 microrganismos. O extrato não apresentou atividade frente a *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *M. bovis* e *M. tuberculosis*. O extrato da casca teve maior atividade frente às bactérias Gram positivas. Silva et al (2001) realizaram experimentos com extratos da folha de *A. crassiflora* investigando sua atividade sobre 52 linhagens de *C. albicans*, de origem clínica, as quais se mostraram sensíveis ao mesmo. No nosso trabalho os extratos avaliados não apresentaram atividade inibitória de crescimento sobre *C. albicans*. Esta diferença de resultados pode ser explicada, provavelmente, pela técnica de obtenção do extrato, origem da planta ou pela diversidade das linhagens isoladas de espécimes clínicos.

Com relação à concentração inibitória mínima, os valores variaram de 1,56 a 50 mg/mL.

Os extratos de casca do fruto apresentaram em sua composição alcalóide e tanino. Os extratos do caule apresentaram em sua composição tanino. Os extratos da polpa do fruto apresentaram saponina, enquanto os extratos da folha apresentaram flavonóide e alcalóide (Quadro 01). Resultados semelhantes foram encontrados por Gonçalves et al., (2009) que encontrou alcalóide na triagem fitoquímica. Como estes compostos possuem atividade antimicrobiana, os resultados obtidos podem estar relacionados a presença destes.

#### 3.1.4 *Plinia cauliflora*

Com exceção de *M. bovis* e *M. tuberculosis* todos os microrganismos testados foram sensíveis aos extratos de *P. cauliflora*, porém, *C. albicans* foi sensível apenas ao extrato da folha. Dentre os microrganismos testados, *M. luteus* mostrou maior halo de inibição, em valor absoluto, quando comparado aos outros microrganismos. Nos estudos de Macedo et al. (2009), o extrato das folhas apresentou ação antimicrobiana sobre cinco linhagens de *Streptococcus* spp., resultado semelhante ao deste trabalho cujo extrato da folha foi ativo sobre todos os microrganismos Gram positivos com valores de CIM entre 6,25 mg/mL e 50 mg/mL.

Nos extratos da casca do fruto foram encontrados alcalóide e saponina. Nos extratos da folha foram encontrados flavonóide, tanino e saponina e nos extratos do caule, tanino e saponina (Quadro 01). No estudo fitoquímico realizado por

Reynertson (2006), não especificando a origem do extrato, foi encontrado tanino em sua composição, resultado semelhante ao deste trabalho. A atividade antimicrobiana de *P.cauliflora* pode estar relacionada a presença de flavonóide, alcalóide, saponina e tanino, que possuem atividade antimicrobiana comprovada.

### 3.1.5 *Heliconia rostrata*

Os resultados obtidos mostram que os extratos de *H. rostrata* não inibiram o crescimento dos microrganismos utilizados, conforme descrito na tabela 01. De acordo com o quadro 01, os extratos do caule apresentaram em sua composição tanino e saponina. Os extratos da flor apresentaram saponina. Os extratos da folha apresentaram flavonóide e tanino e os extratos do rizoma apresentaram flavonóides. Não foi encontrado na literatura estudos sobre a composição fitoquímica dos extratos e de atividade antimicrobiana de *Heliconia rostrata* para comparar com os nossos. Por não haver inibição do crescimento podemos supor que as substancias encontradas estejam em baixa concentração ou os compostos ativos não sejam solúveis no líquido extrator apesar de muitos autores sugerirem o uso de etanol a 70% como liquido extrator para vegetais. Muitos resultados negativos podem também ser influenciados por fatores externos intrínsecos ao processo de extração como a degradação dos compostos com atividade antimicrobiana durante o processo de extração. Outro ponto a ser considerado é a influência de fatores externos na produção de metabólitos secundários, como disponibilidade de nutrientes, interações com pragas, solo, ciclo circadiano, sazonalidade, vida pós-colheita e umidade. Apesar de alguns extratos não apresentarem atividade antimicrobiana nos testes de difusão em agar, os mesmos foram submetidos à determinação da CIM uma vez que pode ocorrer discrepâncias entre resultados obtidos por estas metodologias, havendo alteração dos resultados quando o ensaio é realizado em meio líquido.

De um modo geral, os extratos hidroetanólicos das plantas testadas apresentaram atividade frente às bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras, no entanto, os valores de CIM foram superiores a 1000 µg/mL. De acordo com Fabry et al., (1998); Dall'Angol et al., (2003) e Tanaka et al., (2005) os extratos de plantas são considerados com potencial inibitório promissor se demonstram

atividade antimicrobiana em concentrações de até 100 µg/mL, atividade inibitória moderada de 100-500 µg/mL, atividade fraca de 500-1000 µg/mL e inativos maiores que 1000 µg/mL. Portanto, de acordo com este padrão estabelecido, os extratos hidroetanólicos testados não foram efetivos. Contudo novos testes de avaliação com extratos obtidos com outros solventes deverão ser realizados. Sabe-se que a constituição química de um extrato é decorrente dos métodos e reagentes químicos utilizados para a sua obtenção, e que geralmente os componentes ativos se encontram em baixas concentrações e num extrato bruto estes podem estar mais diluídos (CECHINEL FILHO, 2000). Como existem alguns resultados diferentes dos relatados na literatura podemos concluir que vários fatores podem ter influenciado o estudo, desde condições climáticas e localização geográfica da espécie, até a difusão do extrato utilizado no experimento bem como a variação genética das linhagens microbianas estudadas. É notória a necessidade de se padronizar e aprofundar as diferentes metodologias de avaliação, com o intuito de corroborar e assegurar a confiabilidade de resultados obtidos em ensaios antimicrobianos com extratos vegetais.

Sugere-se o desenvolvimento de novas pesquisas utilizando outros métodos de difusão do extrato vegetal, bem como a utilização de extratos obtidos com outros solventes além de outras linhagens bacterianas e fúngicas, aliados a ensaios de toxicidade.

Dentre os extratos avaliados pelo método de difusão em agar, o extrato da folha de *Bidens pilosa* apresentou a mais expressiva média de halos de inibição de crescimento frente aos microrganismos utilizados, seguido dos extratos da flor de *Bidens pilosa*, da folha de *E. pyriformis* e *P. cauliflora* e semente de *E. pyriformis* que apresentaram estatisticamente a mesma média de formação de halos inibitórios. Dos microrganismos avaliados, as bactérias Gram positivas *M. luteus* e *S. aureus* apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade ( $p > 0.05$ ). As bactérias Gram negativas *E. coli*, *E. cloacae*, *S. marcescens* e *P. aeruginosa* também apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade frente aos extratos ( $p > 0.05$ ). O perfil de sensibilidade dos fungos *C. albicans* e *S. cerevisiae* foram comparáveis entre si e entre as bactérias Gram positivas *B. subtilis*, *E. faecalis* e Gram negativa *S. typhimurium* ( $p > 0.05$ ). Dos microrganismos que apresentaram alguma sensibilidade a qualquer um dos extratos, *M. bovis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *E. cloacae* e *E. coli* foram estatisticamente, igualmente os menos sensíveis. Apenas os extratos de

folha de *B. pilosa* apresentou igualdade, estatisticamente significativa, da média de efetividade inibitória quando comparado ao controle positivo que foi a solução de clorexidina.

### 3.2 Avaliação da Atividade citotóxica dos extratos sobre cultura celular

Conforme resultados descritos no quadro 01, os extratos de caule e flor de *H. rostrata*, folha e caule de *P. cauliflora*, semente de *A. crassiflora*, caule, flor e raiz de *B. pilosa* não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas sobre a cultura celular. A concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) variou nos extratos de 1,30 mg/mL a 9,56 mg/mL. A concentração citotóxica para 90% das células ( $CC_{90}$ ) variou nos extratos de 2,55 mg/mL a 19,00 mg/mL. Os valores de índice de seletividade (IS) para *A. crassiflora* caule e *B. pilosa* flor para *S. aureus* apresentaram valores superiores a 1, sendo, respectivamente, 3.76 e 1.86, apresentando potencial promissor para avaliações como candidatos a fármacos antimicrobianos em tratamento de infecções causadas por *S. aureus*).



FIGURA 09 - Células normais da linhagem C6/36.

Fonte: o autor.

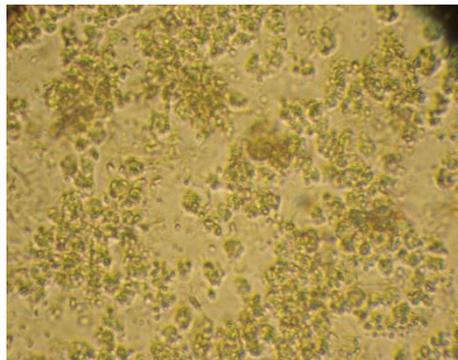


FIGURA 10 - Células alteradas da linhagem C6/36 pelos extratos vegetais de semente de *E. pyriformes* na concentração de 5mg/mL.

Fonte: o autor.

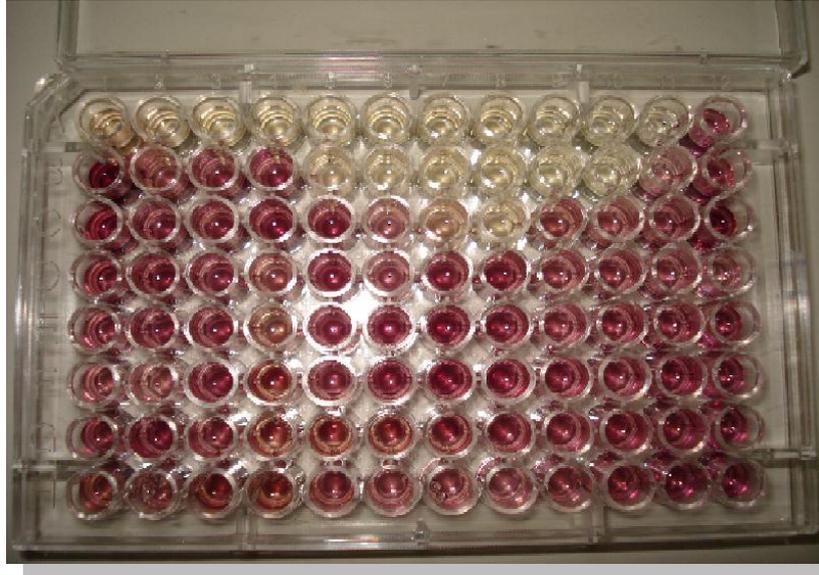


FIGURA 11 - Reação de MTT para avaliação da toxicidade dos extratos.  
Fonte: o autor.

Tabela 01- Avaliação de atividade antimicrobiana (por difusão em agar e microdiluição em caldo), citotoxicidade e índice de seletividade de extratos vegetais de plantas do cerrado do sul de Minas Gerais

Planta	<i>Heliconia rostrata</i>				<i>Plinia cauliflora</i>			<i>Annona crassiflora</i>					<i>Bidens pilosa</i>				<i>Eugenia pyriformis</i>				Controles			
	Parte	Ca	Fl	Fo	Riz	CF	Fo	Ca	CF	Ca	Se	Po	Fo	Ra	Ca	Fl	Fo	Fo	Ca	Fr	Se	Cl	Ri	Ag
Microorganismo/Teste		Resultados																						
<i>Bacillus cereus</i>	MH	0	0	0	0	14	14	9	15,3	10	0	9	13	0	0	17,3	18	15	11,5	12,3	14,7	13	----	0
	CIM	N	N	N	N	50	50	25	50	50	N	50	25	N	N	12,5	12,5	25	12,5	12,5	25	----	----	----
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	0,0412	0,1172	NA	0,0536	0,1544	NA	NA	0,2256	NA	0,3822	NA	0,1688	0,0504	----	----	----
<i>Bacillus subtilis</i>	MH	0	0	0	0	10	11,7	7,3	11,3	10,3	0	0	11,3	0	0	0	0	13,7	11,3	10,3	13	15,3	----	0
	CIM	N	N	N	N	50	50	50	50	25	N	N	50	N	N	N	N	25	25	50	50	----	----	----
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	0,0412	0,2344	NA	NA	0,0722	NA	NA	NA	NA	0,3824	NA	0,0422	0,0252	----	----	----
<i>Enterococcus faecalis</i>	MH	0	0	0	0	13,7	12,7	7,3	15	8,3	0	9	14,3	0	0	0	0	13,7	10	10,3	12	14	----	0
	CIM	N	N	N	N	50	50	25	25	25	N	50	25	N	N	N	N	50	50	50	50	----	----	----
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	0,0824	0,2344	NA	0,0536	0,1544	NA	NA	NA	NA	0,1912	NA	0,0422	0,0252	----	----	----
<i>Micrococcus luteus</i>	MH	0	0	0	0	16,3	18,3	18,3	19	15	0	13	13,7	0	15,7	23,3	23,7	18	14,7	19,3	18	20	----	0
	CIM	N	N	N	N	50	25	25	12,5	25	N	50	50	N	25	25	25	50	50	50	25	----	----	----
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	0,1648	0,2344	NA	0,0536	0,0772	NA	0,1564	0,1128	NA	0,1912	NA	0,0422	0,0504	----	----	----
<i>Staphylococcus aureus</i>	MH	0	0	0	0	15,3	16,7	13	18	12	0	16	12	0	14,3	22	26,3	12	11,3	12	13,7	16,3	----	0
	CIM	N	N	N	N	25	50	6,25	6,25	1,56	N	12,5	25	N	25	1,56	25	25	25	12,5	25	----	----	----
	IS	NA	NA	NA	NA	0,052	NA	NA	0,3296	3,76	NA	0,1072	0,1544	NA	0,1564	1,81	NA	0,3824	NA	0,1688	0,0504	----	----	----
<i>Enterobacter cloacae</i>	MH	0	0	0	0	7,3	10,3	8	0	0	0	0	0	0	0	10,3	12,7	12	0	12	10,3	13,7	----	0
	CIM	N	N	N	N	50	25	25	N	N	N	N	N	N	N	25	50	25	N	12,5	50	----	----	----
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1128	NA	0,3824	NA	0,1688	0,0252	----	----	----
<i>Escherichia coli</i>	MH	0	0	0	0	11,3	10,3	12,3	0	0	0	0	0	0	0	12	16,3	11,3	0	0	9,7	14	----	0
	CIM	N	N	N	N	25	25	50	N	N	N	N	N	N	N	25	25	12,5	N	N	N	----	----	----
	IS	NA	NA	NA	NA	0,052	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1128	NA	0,7648	NA	NA	0,0252	----	----	----
<i>Proteus mirabilis</i>	MH	0	0	0	0	8,3	13,7	10,3	16	10	0	12	13,3	0	0	9	11	13,4	11,3	0	11	6	----	0
	CIM	N	N	N	N	50	50	25	50	50	N	50	25	N	N	50	50	50	50	N	50	----	----	----
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	0,0412	0,1172	NA	0,0536	0,1544	NA	NA	0,0564	NA	0,1912	NA	NA	0,0252	----	----	----

Tabela 01- Continuação, Avaliação de atividade antimicrobiana (por difusão em agar e microdiluição em caldo), citotoxicidade e índice de seletividade de extratos vegetais de plantas do cerrado do sul de Minas Gerais

Planta	<i>Heliconia rostrata</i>				<i>Plinia cauliflora</i>			<i>Annona crassiflora</i>				<i>Bidens pilosa</i>			<i>Eugenia pyriformis</i>				Controles					
	Parte	Ca	Fl	Fo	Riz	CF	Fo	Ca	CF	Ca	Se	Po	Fo	Ra	Ca	Fl	Fo	Fo	Ca	Fr	Se	Cl	Ri	Ag
Resultados																								
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MH	0	0	0	0	9	13,7	9,7	0	0	0	0	0	0	0	0	10	8	9,7	10,3	12	-----	0	
	CIM	N	N	N	N	50	50	50	N	N	N	N	N	N	N	N	50	50	50	50	-----	-----	-----	
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1912	NA	0,0422	0,0252	-----	-----	-----	
<i>Salmonella typhimurium</i>	MH	0	0	0	0	7,3	7,7	8	8	7,3	0	0	0	0	16	24	10	14,3	10,3	12	12,3	-----	0	
	CIM	N	N	N	N	50	50	50	50	50	N	N	N	N	25	25	50	50	50	50	-----	-----	-----	
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	0,0412	0,1172	NA	NA	NA	NA	0,1128	NA	0,1912	NA	0,0422	0,0252	-----	-----	-----	
<i>Serratia Marcescens</i>	MH	0	0	0	0	10	8,7	8	0	0	0	0	0	0	11,7	10,7	10	8	8	0	3,7	-----	0	
	CIM	N	N	N	N	25	25	25	N	N	N	N	N	N	25	25	25	50	25	N	-----	-----	-----	
	IS	NA	NA	NA	NA	0,052	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1128	NA	0,3824	NA	0,0844	NA	-----	-----	-----	
<i>Mycobacterium bovis</i>	MH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-----	26,3	0
	CIM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-----	-----	-----
	IS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-----	-----	-----
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	MH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-----	26,3	0
	CIM	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-----	-----	-----
	IS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-----	-----	-----
<i>Candida albicans</i>	MH	0	0	0	0	0	11,7	0	0	0	0	0	0	13,3	24	28	10,3	10,3	0	15	15,3	-----	0	
	CIM	N	N	N	N	N	50	N	N	N	N	0	N	25	25	12,5	12,5	50	N	25	-----	-----	-----	
	IS	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1584	0,1128	NA	0,7648	NA	NA	0,0504	-----	-----	-----	
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	MH	0	0	0	0	11,5	8,3	8,7	0	0	0	0	0	13,3	26,7	29,3	12,3	0	0	14	18,7	-----	0	
	CIM	N	N	N	N	50	50	25	N	N	N	N	N	25	12,5	12,5	25	N	N	50	-----	-----	-----	
	IS	NA	NA	NA	NA	0,026	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1564	0,2256	NA	0,3824	NA	NA	0,0252	-----	-----	-----	
	CC <sub>50</sub>	NT	NT	1,4	2,15	1,3	NT	NT	2,06	5,86	NT	2,88	3,86	NT	3,91	2,82	NT	9,56	NT	2,11	1,26	-----	-----	-----
	CC <sub>90</sub>	NT	NT	2,6	6,9	2,55	NT	NT	9,38	10,77	NT	5,98	8,03	NT	7,27	5,41	NT	19	NT	4,25	3,44	-----	-----	-----

Legenda: MH: Média de halos; CIM: Concentração inibitória mínima; CC<sub>50</sub>: Concentração citotóxica para 50% das células; CC<sub>90</sub>: Concentração citotóxica para 90% das células; IS: Índice de seletividade (CC<sub>50</sub>/MIC); Ca: Caule; Fl: Flor; Fo: Folha; Riz: Rizoma; CF: Casca do fruto; Fr: Fruto; Se: Semente; Po: Polpa; Ra: Raiz; Cl: Clorexidina a 0,12%; Ri: Rifamicina 30µg; Ag: Água destilada; NT= Não tóxico nas concentrações utilizadas no experimento, NA: Não aplicável; N = valores não detectados nas concentrações testadas.

Quadro 01 - Determinação de compostos químicos dos extratos de *A. crassiflora*, *B. pilosa*, *E. pyriformis*, *H. rostrata* e *P. cauliflora*.

Planta	Extrato	Alcalóides	Antraquinonas	Flavonóides	Taninos	Saponinas
<i>Annona crassiflora</i>	Casca do fruto	+	-	-	+	-
	Caule	-	-	-	+	-
	Semente	-	-	-	-	-
	Polpa	+	-	-	-	+
	Folha	+	-	+	-	-
<i>Bidens pilosa</i>	Raiz	-	-	-	+	+
	Caule	+	-	-	+	+
	Flor	+	-	+	+	+
	Folha	+	-	+	+	+
<i>Eugenia pyriformis</i>	Folha	+	-	+	+	+
	Caule	-	-	-	+	+
	Fruto	-	-	-	-	-
	Semente	+	-	-	+	+
<i>Heliconia rostrata</i>	Caule	-	-	-	+	+
	Flor	-	-	-	-	+
	Folha	-	-	+	+	-
	Rizoma	-	-	+	-	-
<i>Plinia cauliflora</i>	Casca do fruto	+	-	-	-	+
	Folha	-	-	+	+	+
	Caule	-	-	-	+	+

+ : presença - : ausência

#### 4 CONCLUSÕES

Nas condições experimentais utilizadas para a avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos, concluiu-se que:

- Os extratos de folha de *P. cauliflora* e *E. pyriformes* foram efetivos contra bactérias Gram positiva, Gram negativa e leveduras.
- Os extratos testados não foram efetivos contra *Mycobacterium bovis* (amostra BCG) e *Mycobacterium tuberculosis* (H37).
- Os extratos de *H. rostrata* não foram efetivos contra nenhum dos microrganismos testados.
- Quanto à toxicidade, os extratos de caule e flor de *H. rostrata*, folha e caule de *P.cauliflora*, semente de *A. crassiflora* e caule, flor e raiz de *B. pilosa* não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas sobre a cultura celular.
- Saponina, alcalóide, flavonóide e tanino estavam presentes nos extratos.
- Antraquinona não foi encontrada em nenhum dos extratos.
- Extratos de caule de *A.crassiflora* e flor de *B. pilosa* para *S. aureus* apresentaram valores superiores a 1, sendo, respectivamente, 3,76 e 1,81, apresentando potencial para avaliações futuras como candidatos a fármacos antimicrobianos em tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAJO C, BOFFILLI MA, CAMPO J del, MÉNDEZ MA, GONZÁLEZ Y, MITJANS M, VINARDELL MP. In vitro study of the antioxidant and immunomodulatory activity of aqueous infusion of *Bidens pilosa*. **J Ethnopharmacol.** v.93, n.1-2, p.319-23, 2004.

ALVARENGA, A. L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira Plantas Medicas.**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 86-91, 2007.

ANDERSEN, O.; ANDERSEN, V. U. **As frutas silvestres brasileiras: uvaia.** Rio de Janeiro: Globo, p. 198-200, 1988.

ANDRADE, R. N. B. de; FERREIRA, A. G. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) – Myrtaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 118-125, 2000.

ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Infect Control**, v. 29, p. 256-225, 2001.

ARAÚJO, S. A. C. de.; TEIXEIRA, M. F. da S.; DANTAS, T. V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação in vitro da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, Ceará, 25-31, 2008.

ARMSTRONG, L. **Estudos morfoanatômico, fitoquímico e de atividades biológicas de folha e caule de *Eugenia pyriformis* Cambess., Myrtaceae.** Curitiba: Lorene Armstrong, 2011.

BOLDI, AM. Libraries from natural product-like scaffolds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.8, p.281-286, 2004.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Sér. Bot.**, Porto Alegre, v.63,n.2,p.263-277,jul./dez.2008.

BOTELHO,M.A.;NOGUEIRA,N.A.;BASTOS,G.M.;FONSECA,S.G.;LEMES,T.L.;MATO S,E.J. Antimicrobial activity of the essentialoil from *Lippia siloides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res.**40:349-56. 2007.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2 ed. Paris/London: Lavoisier Publishing / Intercept Ltd, 1999.

CALIXTO, JOÃO B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.

CHANG, J.S.; CHIANG, L.C.; CHEN, C.C.; LIU, L.T.; WANG, K.C.; LIN, C.C. Antileukemic Activity of *Bidens pilosa* L. var. minor (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. **Am.J.Chin.Med.**, v.29, p.303-312, 2001.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/Univali. **Química Nova**, v.23, p. 680, 2000.

CHIANG, L.C.; CHENG, H.Y.; LIU, M.C.; CHIANG, W.; LIN, C.C. *In vitro* antiherpes simplex viruses and anti-adenoviruses activity of twelve traditionally used medicinal plants in Taiwan. **Biol.Pharm.Bull**, v.26, p.1600-1604, 2003.

CHIANG Y-M, CHUANG D-Y, WANG S-Y, KUO Y-H, TSAI P-W, TSAI L-F. Metabolite profiling and chemopreventive bioactivity of plant extracts from *Bidens pilosa*. **J Ethnopharmacol**. v.95, n.1-3, p.409-19, 2004.

CHIEN S-C, YOUNG PH, HSU Y-J, CHEN C-H, TIEN Y-J, SHIU S-Y, LI T-H, YANG C-W, MARIMUTHU P, TSAI LF-L, YANG W-C. Anti-diabetic properties of three common *Bidens pilosa* variants in Taiwan. **Phytochemistry**. v.70, n.10, p.1246-54, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts**. Approved Guideline-Second Edition. M44-A2. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Sixth edition. M7-A6. Wayne, PA, USA: CLSI, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard – Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M24-A2**

**susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic Actinomycetes.** Approved Standard - Second Edition data 2008.

Conservação Internacional, 2005. **Hotspots revisitados.** Publicação on-line em PDF. Disponível em:  
[www.conservation.org.br/publicacoes/files/HotspotsRevisitados.pdf](http://www.conservation.org.br/publicacoes/files/HotspotsRevisitados.pdf). Acesso em: 03.Nov.2012.

CORTES-ROJAS, D.F. **Extratos secos padronizados de *Bidens pilosa* L.: desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade biológica.** Ribeirão Preto, 165. 2011.

COSTA, A. F. Isolamento e identificação dos constituintes vegetais. In: **Farmacognosia.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 3, cap. 20, p. 926-962. 1982.

COSTA, M. R. M. et al. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Revista Brasileira de Farmacognosia,** Curitiba, v. 14, n. 2B, p. 545-571, abr./jun. 2009.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.,** v.12, n.4, p.564-582, oct. 1999.

DALL' AGNOL R, FERRAZ A, BERNARDI AP, ALBRING D, NÖR C, SARMENTO L, LAMB L, HASS M, VON POSER G, SCHAPOVAL EES. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine,** v.10, p.511-516, 2003.

DEBA F, XUAN TD, YASUDA M, TAWADA S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* L. var. Radiata. **Food Control,** v.19, p.346-352, 2008.

DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. Tolerância à dessecação de sementes de *Eugenia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.42, n.2, p.265- 272, 2007.

FABRY W, OKEMO PO, ANSORG R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Jornal Ethnopharmacol,** v.60, p.79-84. 1998.

FARIAS, M.R.; SIMÕES, C.M.O.; et al. Espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina. In: SIMPÓSIOS DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1994, Fortaleza. **Resumos.** Fortaleza, p.125, 1994.

FERREIRA, M.F.M. **Análises Genéticas de *Annona crassiflora* (Annonaceae): implicações para conservação da espécie**- Lavras: UFLA, 127p. 2011.

FOGLIO MA, QUEIROGA CL, SOUSA IMO, RODRIGUES RAF. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos**: um modelo multidisciplinar. Construindo a história dos produtos naturais. Disponível em: [http://www.multiciencia.unicamp.br/art04\\_7.htm](http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm), Acesso em: set. 2011.

GEISSBERGER,P.;SEQUIN,U.; Constituents of *Bidens pilosa* L: Do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? **Acta Tropica**, v.48, n.4, p.251-261, fev. 1991.

GONÇALVES, M. A.; LARA, T. A.; PIMENTA L. P. S. Alcalóides oxaporfínicos da madeira de *Annona crassiflora* Mart. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29. 2009, Águas de Lindóia. **Anais**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2009.

HAMBURGER,M.;HOSTETTMAN,K. Bioactive and plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, p.3864-3874,1991.

HERBÁRIO. Disponível em: <[http://www.herbario.com.br /data herb16 /jaboticaba.htm](http://www.herbario.com.br/data/herb16/jaboticaba.htm)>. Acesso em 16 Ago. de 2012.

HERSCH-MARTINEZ P, LEANOS MIRANDA BE, SOLORZANO-SANTOS F. Antibacterial effects of commercial essential oils over locally prevalent pathogenic strains in Mexico. **Fitoterapia**, v.76, p.453-457, 2005.

HOAREAU,L.;DA SILVA EJ. Medicinal plants: a re-emerging health AID. **Eletronic Jornal Biotechnol.**, v.2, p.56-70, 1999.

KAN,M.R.;KIHARA,M.;OMOLOSO,A.D. Anti-microbial activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerilia papuana* and *Sigesbekia orientalis*. **Fitoterapia**, v.72, p.662-665, 2001.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira S.A.,798p.,1992.

KLEYMANN, G.;WERLING, H.O.A. Generally applicable, high-throughput screening-compatible assay to identify, evaluate, and optimize – Antimicrobial agents for drug therapy. **J Biomol Screen**, v.9, p.578-587, 2004.

KLINK, C.A.;MACHADO,R,B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, Montpellier, v.19, n.3, p.707-713, 2005.

KRITSKI,A.L.;VILLA,T.S.;TRAJMAN,A.;SILVA,J.R.L.;MEDRONHO,R.A.;RUFFINO - NETO,A.; Duas décadas de pesquisa em tuberculose no Brasil: estado da arte das publicações científicas. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.41, suppl.1, Sept. 2007.

LIMA, A. J. B. et al. Caracterização química do fruto jaboticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 58, n. 4, 2008.

MACEDO-COSTA,M.R.; ALBUQUERQUE,A.C.L., PEREIRA, A.V. et al. Efeito antimicrobiano do extrato da *Myrciaria cauliflora berg* e *Matricaria recutita* linn.sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista da Biologia e Farmácia**, v.04, n.01, 2010.

MARQUES, J.M. et al. **Estudo da variabilidade genética entre indivíduos de populações de *Heliconia bihai* e *Heliconia rostrata***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2000.

MENEZES, T.O.A.;ALVES,A.C.B.A.;VINEIRA,J.M.S.;MENEZES,S.A.F.;ALVES,B.P.; MENDONÇA,L.C.V. *In vitro* evaluation of the anti-fungii activity of essential oils and plant extracts present in the amazon region about the strain of *Candida albicans*. **Revista de Odontologia UNESP**. v.38, n.3, p.184-91, 2009.

MELO,D.L.B. **Dormência em semente de *Annona crassiflora* Mart**. 2005. 60f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras,MG. 2005.

MELO, G. B; SILVA, R. L; ANTONIOLLI, A. R; MELO, V. A; LIMA, S. O; SILVA, P. M; SILVA Jr, O. C. Efeitos do extrato aquoso da *Hyptis pectinata* sobre a regeneração hepática após hepatectomia parcial de 70%. Resultados preliminares. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v.16, Suppl.1, 2001.

MIRANDA, R.R.S. **Estudo fitoquímico e avaliação do potencial farmacológico de *Maytenus salicifolia* Reissek**. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG. Tese de doutorado, p.351, 2007.

MITTERMEIER, R.A., GIL, R.P., HOFFMAN, M., PILGRIM, J., BROOKS, T., MITTERMEIER, C.G., LAMOREUX, J. & FONSECA, G.A.B. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**, 2. ed. Boston: University of Chicago Press, 2005.

MOHANTY, S; COCK, I. E. Evaluation of the antibacterial activity and toxicity of *Myrciaria cauliflora* methanolic leaf and fruit extracts. **The Internet Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, 2009. Disponível em: <[http://www.ispub.com/journal/the\\_internet\\_journal\\_of\\_microbiology/volume\\_7\\_number\\_2\\_26/article/evaluation-of-the-antibacterial-activity-and-toxicity-of-myrciaria-cauliflora-methanolic-leaf-and-fruit-extracts.html](http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_microbiology/volume_7_number_2_26/article/evaluation-of-the-antibacterial-activity-and-toxicity-of-myrciaria-cauliflora-methanolic-leaf-and-fruit-extracts.html)>. Acesso em: 05 mai. 2011.

MORTON JF. Spanish needles (*Bidens pilosa* L.) as a wild food resource. **Economic Botany**, pp.173-173, 1962.

MOTSEI, M.L.; LINDSEY, K.L.; van STADEN, J.; JÄGER, A.K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **Jornal Ethnopharmacol.**, v.86, p.235-242, 2003.

MYERS, N., R.A. MITTERMEIER, C.G. MITTERMEIER, G.A.B. FONSECA & J. KENT. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403: 853-845. 2000.

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

NASCIMENTO, F. C. et al. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 319-322, 2003.

OLIVEIRA, F.Q.; ANDRADE-NETO, V.; KRETTLI, A.U.; BRANDAO, M.G.L. New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extrats correlated with polyacetylene and flavonoids. **Journal of Ethnopharmacol.**, v.93, p.39-42, 2004.

RABE, T.; van STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purpose. **Journal Ethnopharmacol.**, v.56, p.81-87, 1997.

RAJENDRAN, N.K.; RAMAKRISHNAN. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of crude extracts of medicinal plants against multi drug resistant pathogens. **Biyoloji Bilimleri Araptyrma Dergisi**, v.2, p.97-101, 2009.

RATTER, J.A.; RIBEIRO, J.F. & BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation

and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v.80: pp.223–230, 1997.

REITZ, P.; KLEIN, R.M. & REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura e Abastecimento, 525p.,1988.

REYNERTSON KA, WALLACE AM, ADACHI S, GIL RR, YANG H, BASILEMJ, D'ARMIENTO J, WEINSTEIN IB, KENNELLY EJ. Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **J Nat Prod.**, v.69, p.1228-30, 2006.

RIBEIRO,J.F.et al. **Araticum (*Annona crassiflora* Mart.)**. Jaboticabal: Embrapa Cerrados. 52p. 2000.

ROJAS, J. J. et al. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of nonnosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n.2, 2006.

SANO, E.E.; ROSA,R.; BRITO,J.L.S.; FERREIRA, L.G.; Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.43, n.1, p.153-156, jan. 2008.

SANTOS SC et al. Avaliação da Atividade Antibacteriana dos Extratos de *Avicenniaschaueriana*. Stapf&Leechm. ExMoldenke, Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 1. 2010.

SCALON, S. P. Q.; DELL'OLIO, P; FORNASIERI, J. L. Temperatura e embalagens na conservação pós-colheita de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess.- *Mirtaceae*. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1965-1968, 2004a.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Chichester, v.30, n.12, p.3875-3883,1991.

SCOTT AJ & KNOTT M. **Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance**. *Biometrics* 30: 507-512. 1974.

SCHENKEL,E.P.;GOSMANN,G.;PETROVICK,P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos .In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello,J.C.P.;Mentz,L.A.;Petrovick,P.R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**.3.ed.Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/

Editora da UFSC, Capítulo 15,p.301-332,2001.

SHEPHERD, G. Conhecimento de diversidade de plantas terrestres do Brasil. *In*: LEWINSOHN, T.M. & P.I. Prado. **Biodiversidade brasileira**. Síntese do estado atual do conhecimento. São Paulo. Contexto. 2002.

SILVA MV, COSTA TR, COSTA MR, FERREIRA EC, FERNANDES OFL, SANTOS SC, LIÃO LM, FERRI PH, PAULA JR, FERREIRA HD, SILVA MRR. Growth inhibition effect of Brazilian cerrado plant extracts on *Candida* species. **Pharm Biol.**, v.39, p.138-141, 2001.

SILVA, R. B., ALMEIDA,C. R. CHAVASCO,J.M.; CHAVASCO,J.K. Antimicrobial Activity Evaluation and MIC Determination of *Bixa Orellana* L Liophilized Hydroalcoholic Extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.2, p.171-174, abr.-mai., 2010.

SOUZA FILHO, A. P. S. Alelopatia em agroecossistemas. *In*: SOUZA FILHO, A. P. S.; ALVES, S. M. **Alelopatia**: princípios básicos e aspectos gerais. Belém: Embrapa, p. 155-204, 2002.

SOUZA, M.M.; BELLA CRUZ,A.;SCHUMACHER,M.B.;KRUEGER, M.R.O.;FREITAS,R.A.;BELLA CRUZ,R.C. Método de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. *In*: BRESOLIN,T.M.B.;CECHINEL FILHO,V. **Ciências Farmacêuticas**: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí:Ed Univali;239p.,2003.

SOUSA,M.P.;M.E.O.;MATOS,F.J.A.;MACHADO,M.I.L.;CRAVEIRO,A.A. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: UFC/Laboratório de Produtos Naturais, Edições. 416p, 1991.

STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Ecl. Quím.**, São Paulo, v.34, n.3, p.7–13, 2009.

SUFFREDINI,I.B.;SADER,H.S.;GONÇALVES,A.G.;REIS,A.O.;GALES,A.C.;VARELL A,A.D.;YOUNES,R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest., **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.**, v.37, p.379-384, 2004.

TANAKA JCA, SILVA CC, DIAS FILHO BD, NAKAMURA CV, CARVALHOJE, FOGLIO MA. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Quim Nova**, v.5, p.834-837, 2005.

THEODULOZ,C.,FRANCO,L.,FERRO,E.B.&SCHMEDA-HIRSCHMANN,G. Xantine oxidase inhibitory activity of Paraguayan *Myrtaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.24, p.179-183, 1988.

TORRES, A.C. et al. Efeito da sacarose, cinetina, isopentenil adenina e zeatina no desenvolvimento de embriões de *Heliconia rostrata in vitro*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 789-792, jul-set., 2005a.

TRABULSI,L.R.; ALTHERTUM,F. **Microbiologia** .4.ed. SãoPaulo: Atheneu, 2005.

TUROLLA,M.S. REIS.;NASCIMENTO,E.S.; Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.2, abr./jun., 2006.

VALDES, H. L.; LEYES, E. R.; REGO, H. P. L.; SANABIA, M. L. G. Método analítico para La cuantificación de taninos em El extracto acuoso de *Romerillo*. **Revista Cubana Plantas Medicas**, v.5, n.1, p.17-22, 2000.

VERDI LG, BRIGHENTE IMC, PIZZOLATTI MG. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspéctos químicos, econômicos e biológicos. **Quím. Nova**, v.28, p.85-94. 2005.

VIEIRA S. **Análise de variância. In: Introdução à bioestatística**. Rio de Janeiro: Campus. cap. 13, p. 141-156. 1991.