

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS – FARMANGUINHOS

Fabio Luiz Ribeiro Mendes

Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de
Eugenia brasiliensis

Rio de Janeiro

2019

Fabio Luiz Ribeiro Mendes

Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de
Eugenia brasiliensis

Dissertação submetida ao corpo docente do Curso de Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, de Farmanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Joseli Maria da Rocha Nogueira

2º Orientadora: Dra. Erika Martins de Carvalho

Rio de Janeiro

2019

M538a Mendes, Fabio Luiz Ribeiro

Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Eugenia brasiliensis*. / Fabio Luiz Ribeiro Mendes. – Rio de Janeiro, 2019.

xvi, 61 f. ; 30 cm.

Orientadoras: Joseli Maria da Rocha Nogueira e Erika Martins de Carvalho.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2019.

Bibliografia: f. 55-61

1. *Eugenia Brasiliensis*. 2. Bioatividade. 3. Fitoquímica. 4. Toxicidade. I. Título.

CDD 615.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese/dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fabio Luiz Ribeiro Mendes

Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Eugenia brasiliensis*

Dissertação apresentada, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, do Instituto de Tecnologia em Fármacos – Fundação Oswaldo Cruz

Aprovada em _____ de maio de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Joseli Maria da Rocha Nogueira
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (orientador)

Prof. Dr. Erika Martins de Carvalho
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (2º orientador)

Prof. Dr. Cláudia Regina Brandão Gomes
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ (interno)

Prof. Dr. Denise Borges dos Santos Dias
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ (Externo)

Prof. Dr. July Andrea Hernández Muñoz
Instituto de Tecnologia em Fármacos – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2019

Dedico este trabalho à minha família. Especialmente ao meu pai, que sempre apoiou incondicionalmente as minhas decisões, mesmo nem sempre estando de acordo. Sei que onde você estiver, sempre estará torcendo por mim... E a minha mãe Vera, que está sempre ao meu lado em todos os momentos difíceis que temos passado, me dando forças para ir em frente, com todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, aos Orixás e Guias que sempre estiveram e sempre estarão ao meu lado me fortalecendo e me ajudando nessa difícil jornada que é viver.

Agradeço especialmente a minha orientadora Dra. Joseli Nogueira, que nessa difícil caminhada foi muito mais que uma orientadora. Sem seu apoio esse trabalho não teria chegado ao final, posso afirmar hoje, que ganhei uma segunda mãe.

À minha orientadora Dra. Erika de Carvalho que me ajudou em partes complicadas do trabalho, nas quais eu não tinha total domínio e com sua calma me ajudou a chegar lá.

Ao amigo, Mestre Jaime Abrantes, pela incansável boa vontade, sempre me socorrendo em momentos difíceis, fazendo o impossível para ajudar esse trabalho chegar ao final.

À Dra. July Munhoz por suas explicações na parte fitoquímica inicial do trabalho e de como proceder no laboratório, bem como suas sugestões na qualificação.

À Dra. Simone Valverde por estar sempre acompanhando o trabalho com carinho, me ajudando na realização da pesquisa.

Ao Jardim Botânico do RJ, na pessoa do Dr. Marcus Nadruz, por sua parceria, permitindo nossas visitas, auxiliando na localização, identificação dos espécimens e durante as coletas.

Ao mestrado profissional pela extensão de prazo, na pessoa dos coordenadores Dr. Jorge Magalhães e principalmente à Dra. Mariana Conceição de Souza, que também aceitou ser suplente da minha banca. Obrigada pelo carinho e compreensão.

Às Doutoradas Cláudia Brandão e Denise Dias, presentes na banca de qualificação, por ajudarem a melhorar a qualidade do trabalho e por aceitarem retornar na minha defesa.

Ao colega Felipe Carvalho da Conceição do laboratório PN-2 de Farmanguinhos, pois sem sua ajuda teria sido quase impossível o término desse trabalho.

À todos os amigos dos laboratórios PN-2 (Farmanguinhos) e do Laboratório de Microbiologia do DCB (ENSP), por estarem sempre solícitos quando foi preciso.

À todos os professores do Curso de Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica de Farmanguinhos, por terem me ensinado o que era preciso pra contribuir com a execução deste trabalho. Vocês são os melhores.

À minha turma de mestrado, onde fiz grandes amigos.

À todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade,

Muito obrigado!

Não devemos nos questionar porque algumas
coisas nos acontecem e sim o que podemos
fazer com o tempo que nos é dado.

J. R. R. Tolkien
O Senhor dos Anéis

RESUMO

MENDES, F. L. R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Eugenia brasiliensis*. 2019. 73f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2019.

A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça crescente em infecções bacterianas, não só dificultando os tratamentos, mas aumentando a morbidade e mortalidade. Bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* são causas comuns de infecções resistentes à antibióticos. Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta para a escassez de novos medicamentos eficazes contra bactérias. Em contrapartida, fontes naturais como plantas, ainda pouco exploradas, podem possuir atividade antimicrobiana ainda por ser descoberta. Portanto, urge explorar esse potencial, especialmente, em casos promissores, como no gênero *Eugenia*, conhecido por apresentar ácidos triterpênicos, bioativos. Apesar de ser um gênero promissor nem todas suas espécies foram analisadas, levando-nos a escolha de uma espécie pouco estudada. Portanto, esse trabalho objetivou avaliar e comparar o potencial antibacteriano de extratos de folhas de *Eugenia brasiliensis*, obtidas por coletas sazonais e testar sua toxidez. As coletas foram realizadas trimestralmente no Jardim Botânico do RJ (JBRJ) e os extrato etanólicos preparados com o pó das folhas secas. Foram utilizadas cepas ATCC Gram positivas de *S.aureus*: 25923 (β Lactamase -) e 29213 (β Lactamase +), e duas Gram negativas, *E.coli* (28922) e *Pseudomonas aeruginosa* (27853). A técnica de escolha foi a microdiluição em placa de 96 poços, pois permite avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e posteriormente a concentração bactericida mínima (CBM). No extrato onde houve maior atividade antibacteriana foi realizado o teste de toxidez com o crustáceo *Artemia salina*. Os testes fitoquímicos foram realizados através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) e o solvente utilizado na extração foi o etanol. Foi possível através deste estudo detectar como metabólitos secundários: alcalóides, flavanóides, triterpenóides, esteroides e taninos. Através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), foi quantificada a presença dos ácidos triterpenicos, os quais são atribuídos a bioatividade antimicrobiana. Os resultados mostraram que o ácido oleanólico, betulínico e ursólico estão presentes em todas as estações do ano. Todavia, a melhor atividade antibacteriana (1 mg/mL) foi identificada nos extratos obtidos nos meses mais quentes (menores CIM para bactérias Gram positivas). A CBM foi compatível com a CIM indicando possível atividade bactericida dos extratos. A dose letal mediana (DL₅₀) do extrato do verão frente *A.salina* após 24h foi 2mg/mL. A pesquisa demonstrou atoxicidade dos extratos, atividade antibacteriana promissora para Gram positivos e existência de variação sazonal, sugerindo um bom potencial para *E.brasiliensis* e indicando que maiores estudos devem ser realizados.

ABSTRACT

Resistance to antimicrobials is a growing threat in bacterial infections, not only hindering treatments but also increasing morbidity and mortality. Bacteria like *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are common causes of infections resistant to antibiotics. In this context, the World Health Organization (WHO) warns of the scarcity of new drugs effective against bacteria. In contrast, natural sources such as plants, still underutilized, probably there is antimicrobial activity still to be discovered. Therefore, it is imperative to explore this potential, especially in promising cases, such as in the genus *Eugenia*, known to have triterpene, bioactive acids. Despite being a promising genus not all its species have already been analyzed, which led us to choose a species little studied. Therefore, this work aimed to evaluate and compare the antibacterial activity of leaves extracts of *Eugenia brasiliensis*, obtained by seasonal collections and test their toxicity. The collections were carried out quarterly in the Botanical Garden of RJ (JBRJ) and the ethanolic extract prepared with the dry leaves powder. Gram-positive ATCC strains of *S.aureus*: 25923 (β Lactamase -) and 29213 (β Lactamase +), and two Gram negative strains, *E.coli* (28922) and *Pseudomonas aeruginosa* (27853) were used. The technique of choice was the 96-well plate microdilution, since it allows evaluating the minimum inhibitory concentration (MIC) and later the minimum bactericidal concentration (MBC). In the extract with the highest antibacterial activity was used in the toxicity test carried out with the *Artemia salina* crustacean. Phytochemical tests were performed using the thin layer chromatography (TLC) technique and the solvent used in the extraction was ethanol. It was possible through this study to detect as secondary metabolites: alkaloids, flavonoids, triterpenoids, steroids and tannins. The presence of triterpenic acids, which are attributed to antimicrobial bioactivity, were quantified by The High Performance Liquid Chromatography with diode array detector (HPLC-DAD). The results showed that oleanolic, betulinic and ursolic acid are present in all seasons over the year. However, the best antibacterial activity (1 mg/mL) was identified in the extracts obtained in the warmer months (smaller MICs for Gram-positive bacteria). The MBC was compatible with the MIC indicating a possible bactericidal activity of the extracts. The median lethal dose (LD50) of the summer extract after *A.salina* after 24h was 2mg/ mL. The research demonstrated the toxicity of extracts, promising antibacterial activity for Gram positive and the existence of seasonal variation, suggesting a good potential for *E. brasiliensis* and indicating that further studies should be performed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de substâncias das principais famílias metabólicas.	13
Figura 2: Planta <i>Eugenia brasiliensis</i> e suas flores, folhas e frutos.	14
Figura 3- Espécime onde foram realizadas as coletas, localizado no JBRJ.	19
Figura 4- Processo de seleção das folhas saudáveis e limpeza.....	20
Figura 5- Extrato bruto preparado com 50g do pó das folhas secas e 1L de etanol P.A.....	21
Figura 6- Etapa de rotaevaporação dos extratos.....	22
Figura 7- Placa de 96 poços utilizada nos testes (Verão).....	32
Figura 8- Placas semeadas em duplicata para verificação da CBM (Verão).....	33
Figura 9- Placa de 96 poços utilizada nos testes (primavera).....	34
Figura 10- Placa semeada para comprovação da CBM (Primavera).....	36
Figura 11- Placa de 96 poços utilizada nos testes (Outono).....	37
Figura 12- Placa semeada para comprovação da CMB (outono).....	38
Figura 13- Placa de 96 poços utilizada nos testes (Inverno).	39
Figura 14 - a - Fundo da Placa de petri semeada para comprovação da CBM (Inverno); b – Evidenciação de crescimento bacteriano indicativo de <i>E.coli</i>	41
Figura 15 - Teste de toxicidade Com <i>Artemia salina</i>	46
Figura 16 - Placas de CCD confirmando presença de triterpenoides e esteroides.	49
Figura 17- Cromatograma do extrato de <i>E.brasiliensis</i> obtido no verão.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	47
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classes de antimicrobianos, alvo e mecanismo de ação.	11
Tabela 2- Relação dos micro-organismos utilizados nos ensaios microbiológicos.....	23
Tabela 3- Condições utilizadas para prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas de <i>E. brasiliensis</i>	28
Tabela 4- Peso e rendimento durante os processos de prospecção.....	30
Tabela 5 - Inibição bacteriana a partir do extrato das folhas coletadas no Verão.	42
Tabela 6- Inibição bacteriana a partir do extrato das folhas coletadas na Primavera.....	42
Tabela 7- Inibição bacteriana a partir do extrato das folhas coletadas no Outono.....	42
Tabela 8- Inibição bacteriana a partir do extrato das folhas coletadas no Inverno	43
Tabela 9- Resultado das condições utilizadas para prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas de <i>E. brasiliensis</i>	49
Tabela 10- Percentual de ácidos triterpênicos	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AB - Ácido Betulínico
- AO - Ácido Oleanólico
- AU - Ácido Ursólico
- ATCC - American Type Culture Collection
- BAAR - Bacilos álcool-ácido resistentes
- BHI - Infusão de cérebro e coração
- CBM - Concentração Bactericida mínima
- CCD - cromatografia em camada delgada
- CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças
- CIM - Concentração Inibitória Mínima
- CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
- CLED- Cisteína Lactose Eletrólitos Deficientes
- DAD - Detector de arranjo de diodos
- DL₅₀ – Dose letal mediana
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- JBRJ - Jardim Botânico do Rio de Janeiro
- MRSA - Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- PBP - Penicillin binding protein
- PRSP - Penicillin-Resistant *Streptococcus pneumoniae*
- SUS - Sistema Único de Saúde
- UBS - Unidades básicas de saúde
- VRE - Vancomycin-Resistant *Enterococci*
- VRSA - Vancomycin-Resistant *S. aureus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISAO DA LITERATURA	3
2.1. PLANTAS MEDICINAIS	3
2.2. INFECÇÕES MICROBIANAS E RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS	5
2.3. MECANISMOS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA	9
2.4. PRINCIPAIS CLASSES DE ANTIMICROBIANOS.....	10
2.5. ANÁLISE FITOQUÍMICA	12
2.6. FAMÍLIA MYRTACEAE	13
2.7. ÁCIDOS TRITERPÊNICOS	15
3. JUSTIFICATIVA	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. OBJETIVO GERAL	17
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5.1. MÉTODOS GERAIS	18
5.1.1. Coleta, transporte e processamento inicial de <i>Eugenia brasiliensis</i>	18
5.1.2. Obtenção dos extratos de <i>Eugenia brasiliensis</i>	20
5.1.3. Preparo das cepas bacterianas	22
5.1.4 Preparo do inoculo.....	23
5.1.5. Microdiluição em caldo	24
5.1.6. Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i>	26
5.1.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD).....	26
5.1.7.1. Preparo dos padrões: Ácido Betulínico (AB), Oleanoico (AO) e Ursólico (AU):.....	27
5.1.7.2. Determinação do teor dos ácidos triterpênicos (AB, AO, AU) nos extratos brutos de <i>Eugenia brasiliensis</i> :	27
5.1.8. Prospecção fitoquímica.....	28
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1. RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE <i>EUGENIA BRASILEINSIS</i>	30
6.2.1. ATIVIDADE REFERENTE A COLETA REALIZADA NO VERÃO (2017).....	31
6.2.1.1 - Microdiluição em caldo e concentração inibitória mínima (CIM)	31

6.2.1.2 - Concentração Bactericida mínima (CBM) - Verão	33
6.2.2. ATIVIDADE REFERENTE A COLETA REALIZADA NA PRIMAVERA (2017).....	33
6.2.2.1 - Microdiluição em caldo e concentração inibitória mínima (CIM)	33
6.2.2.2 - Concentração Bactericida mínima (CBM) - Primavera.....	35
6.2.3. ATIVIDADE REFERENTE A COLETA REALIZADA NO OUTONO (2018).....	36
6.2.3.1 - Microdiluição em caldo e concentração inibitória mínima (CIM)	36
6.2.3.2 - Concentração Bactericida mínima (CBM) - Outono.....	38
6.2.4. ATIVIDADE REFERENTE A COLETA REALIZADA NO INVERNO (2018).....	39
6.2.4.1 - Microdiluição em caldo e concentração inibitória mínima (CIM)	39
6.2.4.2 - Concentração Bactericida mínima (CBM).....	40
6.3. TESTE DE TOXICIDADE	45
6.4. ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS DE <i>EUGENIA BRASILIENSIS</i>	47
6.4.1. Análise fitoquímica.....	47
6.4.2. Análise do Extrato obtido no Verão por CLAE-UV-DAD	51
7. PERSPECTIVAS.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

Desde que a humanidade começou a pensar em formas para curar as doenças, ela buscou auxílio na natureza, o que acabou gerando a chamada "medicina tradicional", baseada nas teorias, crenças e experiências de diversas culturas. Ela surgiu antes da medicina moderna, com base muitas vezes no empirismo, congregando todas as informações, habilidades e práticas utilizadas na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de doenças, bem como na manutenção da saúde (WHO, 2013; GEWEHR et al., 2017).

Em todo o mundo, a aplicação de conhecimentos da medicina tradicional está presente na assistência à saúde, muitas vezes, assumindo um papel essencial. Esse conjunto de práticas populares, que acompanha a história da humanidade, é empregado na manutenção da saúde, na prevenção e no tratamento de doenças. Por outro lado, muitas vezes a medicina alopata perde terreno no preço agregado e na eficácia para doenças que antes se mantinham em controle e hoje extrapolam os tratamentos por diversos mecanismos, como é o caso das infecções bacterianas (WHO, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), nos países em desenvolvimento, grande parte da população depende da medicina tradicional para atenção primária a saúde, além disso, uma parcela significativa da população mundial confia nos produtos à base de plantas medicinais para o tratamento de suas doenças, ou utiliza a medicina tradicional. Vários autores apontam para o fato de que quando há segurança e eficácia, a medicina tradicional é capaz de garantir amplo acesso aos cuidados de saúde, para aqueles ao qual a medicina convencional não está acessível (SILVEIRA, BANDEIRA, ARRAIS, 2008; WHO, 2013).

As plantas medicinais são um dos principais recursos da medicina tradicional e, no Brasil, fazem parte das Práticas Integrativas e Complementares do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2012). A diversidade étnica e cultural, aliada à maior biodiversidade do mundo, justifica a riqueza do conhecimento tradicional sobre plantas medicinais no Brasil. Além da importância para o enfrentamento das desigualdades no acesso aos serviços de saúde, o desenvolvimento do setor de plantas medicinais e fitoterápicos no país representa

importante fonte para obtenção de novas plantas medicinais de interesse clínico (BRASIL, 2006).

Analisando as várias possibilidades de pesquisa com fins medicinais em plantas de nossa biodiversidade, ressalta-se a urgência no desenvolvimento de novos antimicrobianos capazes de combater agentes etiológicos resistentes aos tratamentos atualmente disponíveis (WHO, 2013).

Desta forma, várias pesquisas já vêm sendo desenvolvidas e direcionadas para a busca de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e outros produtos naturais, para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos. As variações referentes à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores, que vão desde a forma e local de cultivo, método de pesquisa, até a técnica de verificação de sensibilidade antimicrobiana empregada. Portanto faz-se necessário uma sistematização e também uma padronização das pesquisas e testes nesse campo (OSTROSKY et al., 2008; DE LIMA et al., 2011).

Tomando por base as várias espécies vegetais da biodiversidade brasileira, as pesquisas de atividade antimicrobiana propostas na literatura e o uso já descrito da Família Myrtaceae, principalmente do gênero *Eugenia* na medicina tradicional, foi selecionada a espécie *Eugenia brasiliensis* para este projeto. Cabe ressaltar que apesar de haverem relatos de outras espécies de *Eugenia* apresentando essa atividade, há poucos trabalhos sobre essa espécie que, portanto, possui um grande potencial ainda a ser explorado (ALMEIDA, FARIA, SILVA, 2012; COSTA, 2015; QUEIROZ et al., 2015).

2. REVISAO DA LITERATURA

2.1. PLANTAS MEDICINAIS

O Sistema Único de Saúde (SUS) incentiva o uso das plantas medicinais e seus derivados, através de programas municipais de Atenção Básica de Saúde onde a população possui poucos recursos financeiros para compra de medicamentos alopáticos (BRASIL, 2006). Um destes programas, o *Farmácia Viva*, promove o acesso da população às plantas medicinais, atuando desde a produção à assistência farmacêutica com fitoterápicos e opera em municípios onde o acesso aos fármacos é limitado. No Rio de Janeiro existe um grande estímulo à exploração de plantas locais com efeito medicinal indicado pelo conhecimento tradicional (REIS et al., 2004).

Apesar de todo o empenho do SUS para estímulo do uso de fitoterápicos e derivados vegetais, existe uma legislação para proteger o patrimônio brasileiro e que por muitas vezes se torna uma barreira dificultando os estudos, pesquisas e desenvolvimento nesta área (BRASIL, 2004). Junto a este fato, encontra-se a falta de interação entre a pesquisa acadêmica e a indústria, que não permite melhorar e acelerar os processos de produção dos fitoterápicos ou fitofármacos (SIMÕES, SCHENKEL, 2002).

Nos últimos anos a utilização de fitoterápicos pela população brasileira tem aumentado de forma expressiva, dois fatores poderiam explicar este aumento. O primeiro seriam os avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes. O segundo é a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde (BRUNING, MOSEGUI, VIANNA, 2012). Somando-se a essa convergência, tem sido observado, que além da utilização dos medicamentos alopáticos, a população que busca atendimento nas unidades básicas de saúde (UBS) concomitantemente também acaba utilizando plantas medicinais, muitas vezes desconhecendo a possível existência de efeitos tóxicos, além de não ter entendimento integral quanto à sua ação terapêutica, forma mais correta de cultivo, de preparo, quanto de cada planta pode ser indicada e em quais casos são contra-indicadas. Esse último item apresenta importância especial, já que ocorre uma

crença popular que os fitoterápicos por serem naturais, não exercem nenhum efeito prejudicial à saúde (RODRIGUES, 2011; BRUNING, MOSEGUI, VIANNA, 2012).

Ainda dentro deste segmento, é importante ressaltar, que vários fatores como por exemplo clima, solo, maneira de cultivo, estações entre outras podem alterar os metabólitos secundários das plantas, além da possibilidade de ocorrer adulterações e contaminações, o que aponta para a necessidade de uma análise química detalhada de plantas destinadas ao uso terapêutico. Todas essas possíveis variações, exigem uma incessante pesquisa e acompanhamento de todos os possíveis fatores, acarretando a necessidade de estudos que visem também detectar as condições e épocas para cultivo e/ou coleta que conduzam a uma matéria-prima vegetal com concentrações desejáveis de princípios ativos, e também um rigoroso controle de qualidade realizado por meio de técnicas analíticas modernas, para garantir constância na composição de metabólitos secundários (os quais na maioria das vezes são os responsáveis pelos efeitos terapêuticos) no preparo do fitoterápico em escala industrial (GOBBO-NETO, LOPES, 2007).

A maior parte da utilização atual dos fitoterápicos ocorre por automedicação e não considera estudos de sua potencialidade tóxica, ainda mais, quando utilizado juntamente com medicamentos da medicina alopata. Outro possível problema pode estar associado ao fato da utilização das plantas medicinais por indivíduos de idades extremas, durante a gravidez e por portadores de doenças crônicas que interferem no metabolismo (SILVEIRA, BANDEIRA, ARRAIS, 2008). O Sistema Nacional de Informações Toxicológicas (SINITOX), informou que no ano de 2016, foram registrados no Brasil 90 casos de intoxicação humana por uso de plantas (SINITOX, 2016).

Uma metodologia simples para avaliar a toxicidade de um extrato vegetal, inclusive usada atualmente também para avaliar a toxicidade de nanopartículas é o ensaio biológico com *Artemia salina* Leach (Anostraceae) (RAJABI et al., 2015; ABRANTES, 2017).

Artemia salina é um microcrustáceo, muito sensível à presença de substâncias potencialmente tóxicas (MCLAUGHLIN, CHANG, SMITH, 1993). De acordo com Meyer, e colaboradores, (1982), existe uma relação entre a toxicidade e a concentração letal mediana (DL₅₀) de extratos vegetais sobre a *Artemia salina*, sendo que, quando são

encontrados valores de DL₅₀ maiores que 1000 µg/mL e não é observada a morte de mais de 50% destes crustáceos, estes extratos não são considerados tóxicos.

Estudos realizados em Cuba também indicam a utilização do teste da *A. salina* para prever a toxicidade *in vivo*, de extratos de plantas, apresentando uma boa correlação com ensaios mais complexos realizados em roedores (PARRA et al., 2001), tendo sido considerado como um teste eficiente, rápido, de baixo custo e que requer uma quantidade pequena de amostra (PIMENTA et al., 2003), esse método segue o princípio dos 3Rs (redução, refinamento e quando possível a substituição) recomendado para pesquisas científicas e indicado como meta prioritária nos dias atuais (FLECKNELL, 2002). Além disso, *Artemia salina* é uma espécie de fácil manipulação em laboratório e de baixo custo econômico (CALOW, 1993).

Segundo Abrantes (2017), o bioensaio com *Artemia salina* proporciona uma vantagem no controle de qualidade e na padronização de produtos de origem botânica, podendo ser utilizado para monitorar a atividade de produtos naturais bioativos. Em linhas gerais, este teste de toxicidade está baseado na premissa de que substâncias bioativas são quase sempre tóxicas em altas doses. Portanto, a verificação da letalidade em um organismo animal simples pode ser utilizada para seleção de extratos vegetais (Moreira et al., 2013)

2.2. INFECÇÕES MICROBIANAS E RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS.

Ao nascer entramos em contato com diferentes micro-organismos presentes no ambiente externo, gerando nossa microbiota comensal (FERNANDES, 2000). Essa microbiota pode variar em função da idade, sexo, pH, temperatura, chegando a participar da vida do indivíduo em momentos distintos de maneiras específicas dependendo de fatores diversos, intrínsecos e extrínsecos (SILVA, 1999).

Diferentes infecções podem ocorrer por micro-organismos invasores ou pela própria microbiota do indivíduo em decorrência de desequilíbrios, baixa imunidade, superpopulação de determinada espécie ou por estarem fora do seu habitat normal. Em condições normais os membros da microbiota podem ser extremamente benéficos existindo como mutualistas, protegendo o hospedeiro, competindo pelos nichos onde se encontram e pelos nutrientes, de forma mais eficiente que os micro-organismos externos, o que inibe e dificulta, muitas vezes a colonização destes últimos. Além disso podem produzir nutrientes importantes (síntese de vitamina K e B) e também contribuir para o desenvolvimento do sistema imunológico. Toda nossa relação harmônica ou não com micro-organismos dependerá também de características inerentes a eles próprios (NOGUEIRA, MIGUEL, 2010).

Segundo Fernandes (2000) e Frota e colaboradores (2015) podemos usar uma classificação simples para a maioria das bactérias de importância clínica, dividindo-as em três grupos distintos com base na composição de sua parede e caracterizando-as após a realização de métodos de coloração clássicos: Bactérias Gram-positivas, quando existe uma camada espessa de peptidoglicano na sua parede e após a coloração de Gram assumem coloração violeta; Bactérias Gram-negativas, quando a camada de peptidoglicano é delgada, mas apresentam uma porção externa de lipopolissacarídeo e lipoproteínas, assumindo coloração rosada a vermelha quando submetidas ao método de Gram; e as bactérias Álcool-ácido resistentes, conhecidas como BAAR (Bacilos álcool-ácido resistentes) cuja parede possui lipídeos complexos (ácidos micólicos) que conseguem reter o corante primário mesmo depois de submetidas a descoloração pelo álcool-ácido no método de Ziehl Neelsen. Existem ainda outros grupos bacterianos que não seguem esse critério de classificação pela coloração, os espirilos que são muito delgados e os micoplasmas que além de muito pequenos não possuem parede (NOGUEIRA, MIGUEL, 2010).

Desde a descoberta do primeiro antimicrobiano por Fleming em 1928 e seu primeiro uso em humanos em 1940 (JBPML, 2009), houve uma preocupação constante com a resposta bacteriana as substâncias que causavam sua inibição ou morte. O uso excessivo de penicilina após a Segunda Guerra Mundial resultou no aparecimento das primeiras cepas de

bactérias Gram-positivas não susceptíveis a antibióticos penicilínicos, conhecidos como penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* (PRSP), e igualmente para os antibióticos lançados no mercado nos anos seguintes, aos poucos começaram a ocorrer resistência em cepas bacterianas, devido a mecanismos de seleção, troca de informações e ao uso desregrado que ocorre até os dias atuais. Algumas bactérias que inicialmente eram combatidas facilmente com penicilina, como o *Staphylococcus aureus*, começaram a expressar enzimas β -lactamases o que confere uma maior resistência a antibióticos de β -lactâmicos e a partir deste momento desenvolveram vários mecanismos, chegando algumas cepas a apresentar atualmente resistência a todas as drogas de uso comercial (SILVEIRA, 2006).

Uma das últimas linhas de defesa contra a ameaça do *S. aureus* surgiu a partir da descoberta do antibiótico vancomicina em 1956 que demonstrou excelente desempenho frente às cepas resistentes à meticilina, conhecidos por MRSA (“methicillin-resistant” *S. aureus*), causadores de problemas como infecções hospitalares. Esta supremacia começou a sofrer abalos com o aparecimento das primeiras cepas de *Enterococcus* resistentes à vancomicina, conhecidos por VRE (“Vancomycin-Resistant” *Enterococci*). O temor de que genes causadores de resistência à vancomicina presentes nos VRE fossem transmitidos para MRSA foi confirmado, e em 2002 nos Estados Unidos, foi descrito o primeiro caso de resistência total do *Staphylococcus aureus* à vancomicina, sendo conhecidos atualmente como VRSA (“vancomycin-resistant” *S. aureus*) (SILVEIRA, 2006).

No caso das bactérias Gram negativas, principalmente o grupo das enterobactérias, os mecanismos de resistência podem variar desde a deficiência de porinas até a produção de enzimas capazes de inativar a ação de drogas antimicrobianas (ABRANTES, NOGUEIRA, 2017), como por exemplo as beta-lactamases já escritas para *S.aureus*. Essa enzima propicia um importante mecanismo de resistência a β -lactâmicos, pois tem a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico do antimicrobiano pela quebra da ligação amida, o que leva a perda da capacidade deste em inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999).

Dentre os fármacos antimicrobianos, a categoria dos β -lactâmicos são os mais utilizados, seu mecanismo de ação atua na parede celular inibindo enzimas chamadas

penicillin binding protein (PBP). Os *S. aureus* possuem três mecanismos distintos de resistência à meticilina:

a) hiperprodução de beta-lactamases;

b) modificações na capacidade de ligação das PBPs;

c) presença de uma proteína ligadora de penicilina (PBP protein binding penicilin) alterada denominada PBP 2^a que é determinada pela presença do gene *mecA*;

Este último, designado para resistência à meticilina, impede a terapia com qualquer um dos antibióticos β lactâmicos atualmente disponíveis, e pode prever resistência a várias classes de antibióticos além dos β -lactâmicos. (Souza, Reis, Pimenta, 2007; Moon et al., 2007; Aarestrup et al., 2001).

Atualmente mais de 35 enzimas beta-lactamases distintas já foram descritas, incluindo as carbapenemases, que atribuem às bactérias resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, aumentando as taxas de mortalidade e gerando um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo (ABRANTES, NOGUEIRA, 2017).

No que se refere a um mecanismo responsável pela multirresistência em BAAR a única explicação amplamente aceita está na ocorrência natural de várias mutações no genoma bacteriano durante o processo de replicação e na seleção natural de cepas resistentes (QUIROS-ROLDAN et al., 2001).

O uso indiscriminado de antimicrobianos, por automedicação, tempo de uso inadequado, utilização irregular ou excesso de prescrições também contribui para aumento global da resistência bacteriana, o que leva a uma escassez na atualidade de antibióticos capazes de conter muitas infecções dessa etiologia. Esse fato reforça a necessidade de lançamento de novas substâncias com essa atividade (BRASIL, 2010).

De fato, o uso abusivo de antibióticos até para tratamento de infecções virais, como caxumba, sarampo e gripe, e febres de etiologia desconhecida que não respondem a antibioticoterapia, além de inútil, também promove o surgimento da resistência, já que bactérias pertencentes a microbiota, acabam entrando em contato com essas substâncias. Diante deste cenário alarmante, fármacos que hoje lideram as listas dos mais vendidos

correm o risco de se tornarem inúteis ao longo do tempo, devido ao aumento da resistência bacteriana. Desta forma, a comunidade médica e científica vem procurando compreender os fenômenos responsáveis pelos mecanismos adaptados de resistência, de forma a criar alternativas e novas estratégias para o combate a bactérias resistentes (SILVEIRA, 2006).

2.3. MECANISMOS DA RESISTÊNCIA BACTERIANA

Segundo o CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças – Atlanta - EUA), desde a década de 50 já existem casos de resistência bacteriana. Os micro-organismos resistentes são denominados deste modo quando são resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos (MOTA et al., 2005). Por ser a resistência um fenômeno complexo, esta envolve inúmeros fatores desde o micro-organismo até a imunidade do paciente (MOTA et al., 2005).

Segundo Antonio e colaboradores (2009) e Mota e colaboradores (2005) uma cepa bacteriana pode se tornar resistente a determinado antibiótico sem a necessidade de contato prévio com a droga. Esse tipo de resistência está associada a mecanismos genéticos do micro-organismo, havendo três caminhos pelos quais isso pode acontecer: A resistência inerente ou intrínseca, quando alguns micro-organismos naturalmente possuem genes que lhes conferem resistência a determinado antibiótico, ou mesmo devido a uma característica intrínseca, como a falta de um sítio de ligação para um dado antibiótico; A mutação genética espontânea ou recombinações, que podem resultar na evolução e multiplicação de um mutante resistente; E a transferência de material genético, quando bactérias podem adquirir carga genética externa conferindo resistência pelos mecanismos de transformação (onde a bactéria adquire DNA livre que contém genes de resistência e o incorpora no seu próprio genoma), transdução (a bactéria atua como hospedeiro de um vírus, bacteriófago, o qual transmite genes de resistência durante seu ciclo reprodutivo), conjugação (tipo de reprodução bacteriana em que ocorre transmissão de elementos de resistência) e por transposons (que são segmentos móveis especializados de DNA e que podem estar

inseridos aleatoriamente em plasmídeos e/ou cromossomos bacterianos e ser transferidos entre bactérias de mesma espécie ou entre bactérias de diferentes cepas ou espécies).

2.4. PRINCIPAIS CLASSES DE ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos são na atualidade compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (QUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Existem vários métodos para testar *in vitro*, a suscetibilidade de um micro-organismo a determinado antimicrobiano. Um dos mais utilizados é o teste de difusão em disco, onde discos com concentrações conhecidas de um determinado fármaco são colocados em placas de culturas, havendo então, difusão do antimicrobiano para o meio. Relaciona-se então o diâmetro de inibição do crescimento com a concentração do fármaco em questão. De acordo com zona de inibição, pode-se concluir se a bactéria é sensível àquele antimicrobiano. Essas práticas são padronizadas e sua qualidade é posta em prova por instituições que testam a qualidade de exames diagnósticos (COCKERILL, 2015; CLSI, 2018). Outro método que, inclusive, permite avaliar a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o micro-organismo (CIM) é o método da verificação da sensibilidade por diluição em caldo, que envolve a preparação de diluições seriadas e logarítmicas do produto potencialmente antimicrobiano em meio de cultura líquido semeado com a bactérias teste (NOGUEIRA, MIGUEL, 2010).

Segundo Júnior (2015) os antibióticos comercializados hoje podem ser de origem natural ou semissintética como: β -lactâmicos, tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas, lincosamidas, rifamicinas entre outros, no entanto também existem os de origem totalmente sintética como: sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Os mecanismos de ação dos antimicrobianos são definidos pelo modo como afetam a bactéria. Podem inibir a síntese da parede celular; alterar a permeabilidade celular; inibir a síntese proteica ou mesmo a síntese de DNA e RNA (SILVA, 1999).

Guimarães, Momesso e Pupo (2010) organizaram uma tabela (Tabela 1) dos antimicrobianos, seus alvos e mecanismos de ação de maneira a facilitar a compreensão de cada uma das classes.

Tabela 1 - Classes de antimicrobianos, alvo e mecanismo de ação.

Antibióticos	Alvo	Mecanismo de ação
β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, monobactamas)	Enzima transpeptidase	Inibição da formação de ligação cruzada entre cadeias de peptidoglicano, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
β-lactâmicos (oxapeninas, sulfoxapeninas)	Enzima β-lactamase	Inibição da enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β-lactâmicos.
Macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas (dalfopristina e quinupristina), cloranfenicol, oxazolidinonas (linezolida)	Subunidade 50S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Aminoglicosídeos, tetraciclina	Subunidade 30S ribossômica	Inibição da síntese proteica bacteriana.
Glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina)	Dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptidoglicano	Complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana.
Peptídeos não ribossomais (bacitracina, gramicidina C, polimixina B)	Membrana plasmática	Afetam permeabilidade da membrana bacteriana por facilitarem o movimento descontrolado de íons através da membrana.
Lipopeptídeos (daptomicina)	Membrana plasmática	Afeta permeabilidade da membrana bacteriana e bloqueia síntese de ácido lipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram positivo.
Rifampicina	RNA polimerase dependente de DNA	Inibição da síntese de RNA.
Fluoroquinolonas	Enzima DNA girase	Bloqueio da replicação e reparo do DNA.
Sulfonamidas	Enzima di-hidropteroato sintetase	Bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico, importante para síntese de ácidos nucleicos.

Fonte: GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010.

Antibióticos naturais, na grande maioria das vezes, exibem estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento de alvos macromoleculares em micro-organismos patogênicos. Com base nesta premissa, pesquisadores de todo o mundo tem voltado sua atenção nos últimos anos, para fontes naturais ainda pouco exploradas, pois antimicrobianos obtidos de novos ecossistemas estão frequentemente associados à diversidade química encontrada nestes ecossistemas (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010).

Czelusniak e colaboradores (2012) observaram que há uma relação entre intensidade de luz e produção de metabólitos, pois todas as substâncias produzidas pelas plantas estão envolvidas com a fotossíntese, o que causa conseqüentemente, alterações anatômicas,

fisiológicas e químicas. Esta produção pode apresentar alterações significativas com relação às variações na intensidade de luz, tendo maior produção em pleno sol. Outro fator importante na variação de produção de metabólitos ocorre em função do órgão da planta pesquisada. Os mesmos autores indicam as folhas jovens, por serem as principais responsáveis pela fotossíntese, com isso devem ser as primeiras a serem avaliadas nesses estudos.

O conhecimento sobre os fatores que podem alterar a composição química de um fitoterápico e em que partes da planta são encontrados maiores teores de metabólitos, é importantíssimo, favorecendo sua produtividade e qualidade e tornando o produto final mais viável economicamente. Os metabólitos podem variar em quantidade e teor, de acordo com alterações sazonais, circadianas, intra e interplanta, idade e desenvolvimento da planta, considerando também o desenvolvimento foliar, surgimento de novos órgãos, processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos. Além disso, temperatura, altitude, índice pluviométrico, radiação UV, composição da poluição atmosférica, disponibilidade de nutrientes e água no solo, herbivoria e ataque de patógenos também podem modificar esses metabólitos (CZELUSNIAK et al., 2012).

2.5. ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os testes fitoquímicos são essenciais para identificar classes de compostos e na descoberta de novos constituintes químicos de espécies vegetais que poderão ter uso terapêutico. Estes podem ser realizados para evidenciar distintas classes de compostos orgânicos, e são aplicáveis em diversos tipos de extratos de todas as partes da planta. Os Metabólitos secundários contribuem para os aromas, as cores dos alimentos e contra pestes e doenças, sustentando a sobrevivência das plantas até em condições ambientais desfavoráveis. Portanto, esses metabólitos podem favorecer todos os seres vivos com suas propriedades terapêuticas na cura das mais diversas patologias, pois são uma excelente fonte de substâncias biologicamente ativas (SILVA et al., 2018).

A classificação dos metabólitos secundários é definida de acordo com sua rota biossintética, possuindo assim três grandes famílias desses compostos: os fenólicos, os terpênicos (incluindo os esteroides) e os alcalóides (TORRES, 2014). Na Figura 1, é possível observar, exemplos de substâncias destas famílias: a quercetina, que é um composto fenólico da classe dos flavonoides, ácido betulínico, que é um composto terpênico e a cafeína que é um alcaloide.

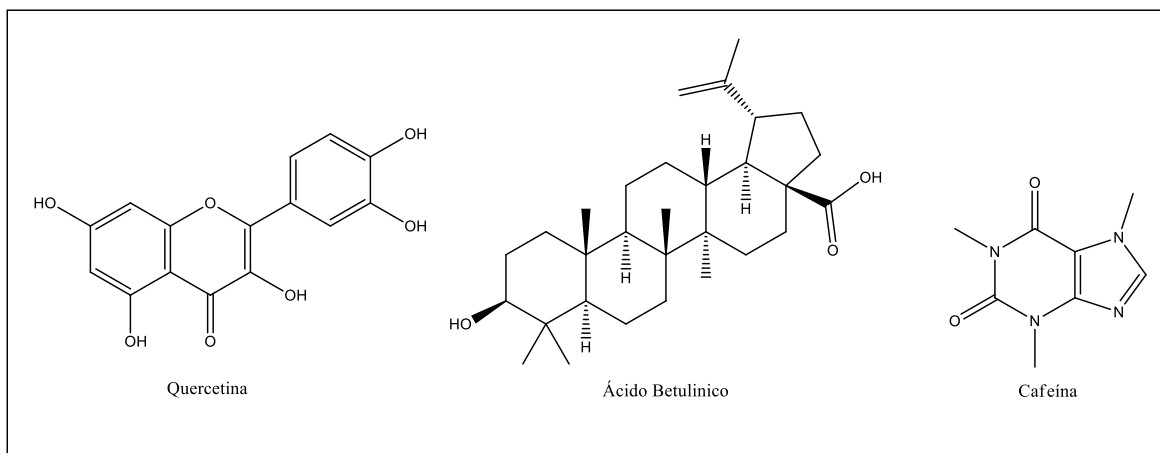


Figura 1 - Exemplos de substâncias das principais famílias metabólicas.

Ao se realizar qualquer pesquisa fitoquímica, deve-se considerar os fatores ambientais envolvidos no momento da coleta da planta, como sazonalidade, clima, tipo de solo e temperatura do ar. De acordo com Gobbo-Neto e colaboradores (2007) a produção de metabólitos secundários pela planta ocorre como resposta a fatores químicos e biológicos da interação planta com o ambiente. Este fato pode explicar diferentes resultados de extratos da mesma espécie, coletados em locais e períodos diferentes.

2.6. FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae é composta de cerca de 100 gêneros, com aproximadamente três mil espécies, sendo a maior família da ordem Myrtales, com dois centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo o mundo. A família é dividida em duas subfamílias: Myrtoideae e Leptospermoideae. São todas plantas tropicais ou subtropicais, mas no Brasil há somente cerca de mil espécies. Aqui, todos os representantes

nativos pertencem à subfamília Myrtoideae, a qual é constituída araçá, *Martierea* (cambucá), *Campomanesia* (guabiroba), *Paivaea* (cambuci), *Syzigium* e apenas uma tribo, Myrteae, subdividida em três subtribos: Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae. No Brasil, os gêneros mais importantes da família Myrtoideae são *Psidium* (goiabeira), *Myrciaria* (cravoda-índia) e *Eugenia*, ao qual pertence à espécie em estudo neste trabalho. Na América do Sul, o gênero *Eugenia* distribui-se desde o Brasil até o norte e nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai. Muitas espécies do gênero *Eugenia* são apreciadas por seus frutos e usadas como alimento (BENFATI et al., 2010).

O gênero *Eugenia* compreende cerca de 400 espécies, sendo um dos maiores da família Myrtaceae (FISCHER et al., 2005). Segundo Auricchio e Bacchi (2003) as plantas do gênero *Eugenia* consistem em árvores ou arbustos verdes durante o ano todo. O fruto é esférico, geralmente comestível, sendo uma baga de até três centímetros de diâmetro, coroado pelo cálice e achatado nas extremidades.

A espécie *Eugenia brasiliensis* Lamarck (Figura 2), é conhecida popularmente como Grumixama, Grumixameira, Grumixaba, Itapoiroti e Cumbixaba. Na medicina popular, o uso da espécie na forma de infusão das folhas, foi relatado para o tratamento de artrite, reumatismo e como diurético. Os frutos maduros são usados como alimento e para a preparação de bebidas fermentadas. Devido ao seu alto teor de taninos, o que lhe confere ação adstringente, as cascas eram usadas na indústria de couro, como tanantes (BENFATI et al., 2010).



Figura 2: Planta *Eugenia brasiliensis* e suas flores, folhas e frutos.

Fonte: <http://sosabelhassemferrao.com.br/site/grumixama-eugenia-brasiliensis>

Poucos relatos sobre compostos químicos e atividades farmacológicas foram registrados na literatura para a espécie *Eugenia brasiliensis*, todavia segundo estudos preliminares de Magina e colaboradores (2009), a atividade antimicrobiana do gênero *Eugenia*, foi demonstrada, a partir do óleo essencial extraído das folhas da *E. brasiliensis* Lam. nas espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O que sugeriu que maiores estudos associados a sensibilidade bacteriana deveriam ser realizados com essa espécie.

Na família Myrtaceae, os ácidos triterpênicos se destacam tanto química quanto biologicamente, sendo utilizados, portanto, como marcadores químicos e biológicos. O ácido betulínico, um dos ácidos triterpenos, de ocorrência no gênero *Eugenia*, exibe uma variedade de propriedades e tem se mostrado de grande valor para a pesquisa farmacêutica (MOGHADDAM, AHMAD, SAMZADEH-KERMANI, 2012).

2.7. ÁCIDOS TRITERPÊNICOS

Vários produtos naturais, usados como alimentos e também com aplicação medicinal, apresentam ácidos triterpênicos em sua constituição química. Os ácidos triterpênicos mono-hidroxilados (oleanólico, ursólico e betulínico) já foram muito relatados sobre seu amplo espectro de atividades biológicas, onde se destacam as atividades: anti-inflamatória, antivirótica, antimicrobiana, antiparasitária, hepatoprotetora., atividade cardiotônica, sedativa, tônica, analgésica, anti-hiperlipidêmica, envolvimento com inibição de substâncias tóxicas do sistema imunológico, atividade cicatrizante *in vivo*, antileishmania *in vitro*, ações: hepatoprotetora, hipolipidêmica, antiaterosclerótica, hipocolesterolemiantes, tripanossomicida, imunomoduladora, anti-HIV, antiúlcera gástrica, gastroprotetora, hipoglicêmica, antiosteoporótica, antidiabética, anticoncepcional, atividade *in vitro* contra melanoma, hepatoma, carcinomas de cérvix, cérebro, leucemia, carcinomas de pulmão, ovário, cólon, pâncreas, rim, mama e atividade antiplasmódica *in vitro*. Estes ácidos apresentam baixa ou nenhuma toxicidade, sendo, inclusive, utilizados como aditivos em bebidas, alimentos e em cosméticos (FRIGHETTO, 2005; SANTOS, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana tem sido uma ameaça crescente e cada vez mais frequente em infecções provocadas por micro-organismos. Além de dificultar e encarecer os tratamentos, muitas vezes a resistência antimicrobiana os impossibilita, o que implica maior sofrimento para os pacientes e aumento da mortalidade. Bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e principalmente *Staphylococcus aureus* são causas comuns de infecções hospitalares e na comunidade, de forma que o impacto de seus arsenais de resistência é severo. Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde alerta para a escassez de novas classes de medicamentos contra bactérias (WHO, 2014). Como já pontuado, fontes naturais como plantas de nossa biodiversidade, ainda pouco exploradas, poderão possuir atividade antimicrobiana ainda por ser descoberta e possibilitar, a partir de pesquisas biológicas e químicas a detecção de novos compostos relevantes. Portanto, urge explorar o potencial antibacteriano de produtos vegetais, especialmente, em casos promissores, como o de *E. brasiliensis*, especialmente quando consideramos as atividades biológicas dos ácidos triterpênicos, comumente encontrados nesse gênero, como os ácidos betulínico, oleanólico e ursólico.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar e comparar o potencial antibacteriano de extratos de folhas de *Eugenia brasiliensis*, obtidas por coletas sazonais.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar se extratos obtidos das folhas de *Eugenia brasiliensis* por metodologia hidroalcoólica são capazes de inibir cepas bacterianas padrão.
- Definir a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de cada extrato de *E. brasiliensis* obtido, frente a cada cepa bacteriana ATCC testada.
- Comparar a CIM e a CBM dos extratos de *Eugenia brasiliensis* nas diferentes estações do ano;
- Avaliar a toxicidade dos extratos nas concentrações em que houve atividade antimicrobiana.
- Identificar o(s) componente(s) majoritário(s) presente(s) nos extratos que apresentarem maior bioatividade;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MÉTODOS GERAIS

Os testes de atividade biológica foram realizados na Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ), no Departamento de Ciências Biológicas (DCB) Laboratório de Microbiologia, e os testes fitoquímicos realizados no Laboratório de Produtos Naturais (PN-2) em Farmanguinhos, ambos situados na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

5.1.1. Coleta, transporte e processamento inicial de *Eugenia brasiliensis*

A coleta do material vegetal, foi autorizada e iniciada no final de 2017, tendo sido realizada sazonalmente após pelo menos 2 dias de estiagem, no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ) que se situa na rua Jardim Botânico, 1008. O espécimen de escolha para nosso estudo, *Eugenia brasiliensis* Lam. (FIGURA 3) está registrado no herbário do JBRJ (RB 01194107) e localizado no canteiro 18E (22°58'04.4"S 43°13'37.3"W). A primeira coleta ocorreu na primavera, no dia 18 de dezembro de 2017 as 10:00 horas e temperatura 27°C, a segunda coleta foi realizada durante o verão, no dia 19 de janeiro de 2018 as 12:00 horas e temperatura 32°C, a terceira coleta foi realizada durante o outono, no dia 13 junho de 2018 as 16:00 horas e temperatura 29°C e a quarta coleta foi realizada no inverno, no dia 30 de agosto de 2018 as 8:40 horas e temperatura 25°C.



Figura 3- Espécime onde foram realizadas as coletas, localizado no JBRJ.

As folhas foram coletadas por todo o espécimen utilizando tesoura de poda. Em seguida, foi realizada a mondagem, destacando as folhas dos galhos e selecionando-se as mais saudáveis. Após a coleta o material foi ensacado e imediatamente transportado ao Laboratório de Microbiologia do DCB - ENSP – Fiocruz, onde as folhas foram limpas com papel toalha (FIGURA 4), pesadas e secas em estufa com temperatura de aproximadamente 40°C. O tempo de secagem foi de 48 a 72 horas e logo em seguida o material novamente pesado para cálculo de rendimento e pulverizado em moinho de facas por um tempo de cinco segundos por três ciclos, seguindo as recomendações de Abrantes (2017).



Foto: Joseli Nogueira

Figura 4- Processo de seleção das folhas saudáveis e limpeza.

A primeira coleta obteve um total de 116,34g de folhas, que após secagem na estufa resultou em um total de 67,93g (41,61% \cong teor de água), enquanto a segunda coleta com folhas frescas apresentava o total de 137,28g e após processo de secagem na estufa resultou um total de 83,49g (39,18% \cong teor de água), a terceira coleta apresentou um total de 159,07g e após secagem na estufa resultou em 99,95g (37,14% \cong teor de água) e a quarta coleta apresentou um total de 99,85g e após secagem na estufa resultou em 75,03 (24,85% \cong teor de água).

5.1.2. Obtenção dos extratos de *Eugenia brasiliensis*

O extrato alcoólico foi preparado com 50g do pó resultante das folhas secas, adicionado de 1L de etanol P.A 99,9% Emsure MERCK® e mantido em frasco estéril por sete dias (FIGURA 5).

O restante do material foi armazenado para estudos posteriores. Esse procedimento foi realizado seguindo as recomendações de Cechinel Filho e Yunes (1998).



Foto: Fabio Mendes

Figura 5- Extrato bruto preparado com 50g do pó das folhas secas e 1L de etanol P.A

Após uma semana de armazenamento, os extratos foram levados ao rotaevaporador BUCHI® (FIGURA 6) para a remoção dos solventes voláteis e submetidos a evaporação até a secura. Os mesmos foram armazenados posteriormente em dessecador para garantir total ausência de solvente seguindo as recomendações de Abrantes (2017).



Figura 6- Etapa de rotaevaporação dos extratos

O rendimento em cada etapa, considerando as folhas desde a coleta, secagem e realização do extrato foram determinadas, calculando-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula $Re = (ExS / PFs) \times 100$, utilizada por Rodrigues e colaboradores 2011: Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); ExS = Peso do extrato seco (g); Pff = Peso das folhas secas (g).

Após este processo houve a ressuspensão com solução hidroalcoólica a 50%, este extrato é similar às tinturas realizadas popularmente, onde se misturam as partes ativas das plantas às bebidas alcoólicas (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998).

5.1.3. Preparo das cepas bacterianas

No presente estudo foram utilizadas cepas bacterianas ATCC (*American Type Culture Collection*) esses micro-organismos são estáveis e padronizados com relação a seu

fenótipo bioquímico e ao seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. As bactérias utilizadas foram duas cepas Gram positivas de *S.aureus*, uma não produtora da enzima β -lactamase (ATCC25923), e outra com essa particularidade (ATCC29213), e duas Gram negativas, uma cepa de *E. coli* que é uma das Enterobacteriaceae mais conhecidas e usada muitas vezes como um indicador de contaminação fecal, e uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria reconhecidamente resistente a vários antimicrobianos comerciais.

Tabela 2- Relação dos micro-organismos utilizados nos ensaios microbiológicos

NOME CIENTÍFICO	GRAM	REGISTRO DA CEPA
<i>Staphylococcus aureus</i>	positivo	ATCC 25923
<i>Staphylococcus aureus</i>	positivo	ATCC 29213
<i>Escherichia coli</i>	negativo	ATCC 28922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	ATCC 27853

5.1.4 Preparo do inóculo

As cepas bacterianas se encontravam criopreservadas no Laboratório de Microbiologia do DCB/ENSP – FIOCRUZ.

De forma asséptica, uma alíquota da bactéria preservada em glicerol foi retirada, com o auxílio da alça de inoculação, e transferida para um tubo de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura BHI previamente esterilizado. Posteriormente, incubou-se a cultura em estufa bacteriológica à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas observando a presença de turvação indicativa de viabilidade bacteriana na fase Log (NOGUEIRA, MIGUEL, 2010).

A partir deste crescimento, as cepas ATCC foram então repicadas para meios indicadores para confirmação de sua pureza e confirmação bioquímica seguindo as recomendações de Abrantes (2017).

O inóculo foi preparado seguindo a escala de turvação correspondente ao crescimento bacteriano em caldo, tubo 0,5 da escala de padrão de turbidez de Mc Farland, sendo então utilizado um tubo de solução fisiológica estéril (salina) acrescido do micro-organismo ATCC e verificação comparativa com o padrão de turbidez. A padronização foi então confirmada com auxílio de um turbidímetro (NOGUEIRA, MIGUEL, 2010).

5.1.5. Microdiluição em caldo

A técnica da microdiluição em caldo foi a metodologia de escolha para as nossas análises, pois nessa técnica é possível realizar a avaliação da CIM (OSTROSKY et al., 2008).

Para realização desta metodologia foi necessário preparar e esterilizar por autoclavação o meio de cultura BHI (infuso de cérebro e coração).

O meio de cultura BHI é indicado para o cultivo de qualquer micro-organismo que requeira um meio líquido. Este meio é vendido comercialmente, e deve ser preparado na proporção de 3,7g do pó para 100mL de água recém destilada. O pó bem dissolvido por agitação na água deve ser então autoclavado por 15 minutos a 121°C (ZIMBRO et al., 2003; PROLAB, 2014).

Após a autoclavação foi realizado o teste de esterilidade para verificar se não há contaminação. Nesse teste observa-se se há turvação do meio de cultura após incubação em estufa a 36°C por 18 horas.

O teste de viabilidade (verificação da condição nutricional do meio para crescimento das cepas bacterianas) é feito na própria placa e funciona como um controle positivo de crescimento de cada cepa em separado, seguindo as recomendações de Abrantes (2017).

Para testar a atividade do extrato através da técnica de microdiluição em caldo usamos uma placa de poliestireno estéril de 96 poços, onde foi inicialmente adicionado

asépticamente 100 µL de caldo BHI em todos os poços onde a pesquisa do extrato seria realizada.

A diluição de cada extrato nas cavidades foi realizada em duplicata, iniciada a partir de 2mg/mL (WEBSTER et al., 2008) e reduzida pela metade no respectivo poço abaixo de forma sucessiva, seguindo as recomendações de Abrantes (2017), ou seja, além dos 100µL de caldo BHI, foi adicionado também no primeiro poço 100 µL do extrato, na concentração inicial de 2mg/mL, e nos poços seguintes foram feitas diluições seriadas, de maneira que foi retirado 100 µL de cada poço anterior com a mistura extrato + BHI e foi adicionado ao poço seguinte reduzindo assim a concentração do poço posterior pela metade e desprezando 100 µL no último poço de cada coluna.

Nos poços com o caldo BHI + extrato foram adicionados 10 µL do inóculo bacteriano na concentração correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland. Todo o teste foi realizado em duplicata, inclusive os controles. Após esse processo a placa foi colocada na estufa a 35°C por 24 horas (COCKERILL, 2010).

Foram realizados controles para garantir a qualidade e confiabilidade do teste: controle do meio BHI, onde somente o meio foi depositado nos poços para confirmar sua esterilidade e da placa utilizada; O controle de crescimento (pool de cepas + BHI) para verificar a capacidade do meio em permitir o crescimento bacteriano; O controle do solvente (álcool a 50%), com o meio BHI e o inóculo, que foi realizado a fim de demonstrar que não havia inibição do crescimento bacteriano por ação do solvente, o que poderia gerar dúvidas no resultado do teste, causando um falso positivo para atividade do extrato. O controle negativo (extrato + BHI) e o controle de inibição, onde foram adicionados ao meio e as cepas, o antimicrobiano ciprofloxacino (ciprofloxacino + BHI + inóculo) (OSTROSKY et al., 2008).

A concentração anterior àquela onde houve turvação correspondente ao crescimento bacteriano, foi denominada como Concentração Inibitória Mínima (CIM), e os resultados anotados para futura análise (COCKERILL, 2010).

Os valores referentes a CBM (Concentração Bactericida Mínima) seguindo metodologia adaptada de Magina e colaboradores (2009) foram obtidos por meio de

repique para meio de cultura sólido e rico, do conteúdo dos poços com o extrato + cepa bacteriana, que não apresentaram crescimento bacteriano (turbidez) na placa de microdiluição.

Sendo considerada CBM a menor concentração que não apresentou crescimento no meio de cultura sólido, após incubação. Caso haja inibição bacteriana no meio líquido com o extrato, mas crescimento no meio sólido sem o extrato, a concentração correspondente será considerada bacteriostática (CB) (BARON, FINEGOLD, 1990).

Para efeito de confirmação nos casos duvidosos, já que o extrato vegetal pode algumas vezes apresentar alguma turbidez, o que dificulta a leitura visual e altera os resultados de leitura, foi também semeado em placa, o material proveniente dos poços onde se observou uma ligeira diminuição da turbidez, mas não foi possível definir a CIM dentro das concentrações escolhidas para nossos experimentos.

5.1.6. Teste de toxicidade com *Artemia salina*.

Para esse estudo foi utilizado o material proveniente do extrato obtido na estação do ano onde houve a melhor resposta de CIM (verão).

Seguindo a metodologia descrita por Meyer e colaboradores (1982), que avalia a toxicidade de princípios ativos de plantas com base na letalidade de *Artemia salina*, 10 unidades de larvas jovens deste crustáceo, mantidas em salina, foram separadas em recipientes com diferentes concentrações (3mg/mL, 2mg/mL, 1mg/mL, 0,5mg/mL e 0,25mg/mL) de extrato (análise realizada em duplicata) e como controle do solvente foram adicionados 10 unidades da larva a etanol PA a 50%, após 24 horas foi realizada a contagem dos animais vivos e calculado a DL₅₀ (quantidade de extrato necessária para matar 50% dos crustáceos em 24 horas).

5.1.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV-DAD)

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada no extrato de maior atividade antimicrobiana, em um cromatógrafo da marca Shimadzu® (Tóquio, Japão) modelo LC-20AD Nexera XR, equipado com detector de arranjo de diodos (DAD) com faixa de varredura de 190-800 nm e alça de injeção de 20 µL.

A Fase móvel utilizou os solventes acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido fosfórico (0,05%) (B), o fluxo foi mantido em 1,0 mL/min e a detecção realizada em 210 nm. Uma coluna Supelcosil LC-18 DB 5 µm (250 mm x 4,6 mm) foi utilizada para a separação dos analitos. A temperatura da coluna de separação cromatográfica foi mantida a 60°C e o volume de injeção utilizado foi de 20 µL. A fase móvel foi então aplicada com o seguinte gradiente de eluição: 0-5min, 75% A; 5-15min, 75-80% A; 15-20min 80-80% A; 20-30min 80-75% A (FONSECA et al., 2010).

5.1.7.1. Preparo dos padrões: Ácido Betulínico (AB), Oleanoico (AO) e Ursólico (AU):

A uma determinada quantidade de amostra foi adicionado metanol, de forma a se obter uma concentração igual a 1,0 mg/mL. O frasco contendo a amostra foi agitado com auxílio de vortex e levado a banho ultrassônico por 5 minutos. A solução resultante foi filtrada em membrana PVDF de 0,22 µm e transferida para um novo frasco.

5.1.7.2. Determinação do teor dos ácidos triterpênicos (AB, AO, AU) nos extratos brutos de *Eugenia brasiliensis*:

O desenvolvimento do método analítico para a determinação dos ácidos triterpênicos iniciou-se com a definição do comprimento de onda a ser utilizado, através da varredura no espectro do ultravioleta, mostrando que o extrato absorve fortemente em 205 nm. Além disso, investigou-se a composição mais adequada da fase móvel, comparando-se os sistemas compostos por metanol:água e acetonitrila:água com tampão e sem tampão de ácido fosfórico em diferentes proporções.

A uma determinada massa de amostra foi adicionada metanol, de forma a se obter uma concentração igual a 10 mg/mL. O frasco contendo a amostra foi agitado com auxílio

de vortex e levado a banho ultrassônico por 5 minutos. A solução resultante foi filtrada em membrana PVDF de 0,22 µm e transferida para um novo frasco.

5.1.8. Prospecção fitoquímica

Considerando o método e o solvente utilizados para a extração dos princípios ativos (maceração com etanol), Pandey (2014) indica que os metabolitos secundários presentes no extrato devem ser taninos, polifénóis, flavonoides, esteroides e alcaloides (PANDEY, 2014). Assim, os testes fitoquímicos e cromatográficos realizados visaram a confirmação da presença destes metabólitos.

Os testes fitoquímicos foram realizados segundo metodologia proposta por Matos (1997). Os extratos obtidos foram submetidos aos testes de: fenóis, taninos, flavonóides, catequinas, saponinas, alcalóides, esteroides e triterpenóides. Todos os testes acima citados foram realizados em todos os extratos etanólicos. Os testes para identificação de metabólitos secundários, utilizando cromatografia em camada delgada (CCD), foram realizados segundo os métodos descritos por Barbosa e colaboradores (2001) no Manual para Análise Fitoquímica e Cromatografia de Extratos Vegetais. Para realização das CCDs foram utilizadas cromatoplasmas Kieselgel GF254 (20 × 20 cm, 1 mm de espessura). Os extratos etanólicos foram redissolvidos e aplicados sobre as placas a 1cm da borda inferior. Para melhor prospecção dos constituintes fitoquímicos, diferentes fases móveis foram utilizadas na CCD e estão descritos na Tabela 3. Após a eluição da placa, as placas foram secas, reveladas e o fator de retenção (Rf) das manchas calculado.

Tabela 3- Condições utilizadas para prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas de *E.brasiliensis*

Classe metabólica	Padrão	Fase móvel	Agente Revelador	Coloração padrão
Alcalóides	Pilocarpina	Tolueno:EtOAc:Dietilamina	Dragendorff	Laranja-marrom
Taninos	Geranilina	EtOAc:HCOOH:H ₂ O	FeCl ₃ , 1%	Azul

		(100:11:27, v/v/v)	em MeOH	
Flavonoides	Tilirosídeo e Rutina	EtOAc:HCOOH: CH ₃ COOH:H ₂ O (100:11:11:27,v/v/v/v)	NP/PEG e observação na luz UV 365nm	Amarelo/verde/laranja
Triterpenoides	Ácido betulínico, oleanólico, ursólico	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃ :EtOAc (8:2, v/v)	Anisaldeído Sulfúrico e aquecimento	Violeta
Esteróides	colesterol	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃ :EtOAc (8:2, v/v)	Anisaldeído Sulfúrico e aquecimento	Roxo-vinho

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha do material vegetal se restringiu às folhas, por ser esta a porção onde ocorre a maior parte do transporte de gases e fotossíntese, e onde há mais chance de serem encontrados metabólitos interessantes para prospecção de atividade biológica (CZELUSNIAK et al., 2012), mas também seguindo o uso tradicional (QUEIROZ et al., 2015). Testes prévios realizados por nosso grupo de pesquisa indicaram que seus extratos poderiam possuir atividade antimicrobiana, além de ser a parte da planta com maior frequência de renovação e por consequência, mantendo assim maior conservação do espécime coletado (LÓPEZ, 2006).

6.1. Rendimento dos extratos de *Eugenia brasiliensis*

Usando o cálculo descrito na metodologia, foi possível quantificar a o rendimento do extrato (Tabela 4).

Tabela 4- Peso e rendimento durante os processos de prospecção

Peso (rendimento)	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Fresco total	116,34g	137,28g	145,37g	98,85g
Seco total	67,93g	83,49g	78,26g	74,03g
Seco utilizado	50g/1000mL	50g/1000mL	50g/1000mL	50g/1000mL
Rendimento	6,4%	6 %	6,06 %	6,98 %

Foi possível observar, que apesar do peso total das folhas frescas obtidas na coleta do inverno ter sido menor que nas outras estações, seu peso seco total não ficou muito diferente das outras coletas anteriores. Além disso, apesar de termos retirado a mesma quantidade em gramas para realização do extrato (50g/1000mL), essa foi a estação onde obtivemos maior rendimento no extrato obtido. Esses resultados, vão de encontro com os

obtidos por Soletti (2015) onde o rendimento dos seus vegetais foi menor no inverno. De qualquer forma, observa-se que neste quesito, independente do vegetal, a sazonalidade pode levar à variação no rendimento após processamento.

6.2. Atividade antimicrobiana do extrato bruto de *Eugenia brasiliensis* nas diferentes estações do ano.

A pesquisa da atividade antibacteriana de cada extrato bruto, foi realizada para as diferentes estações do ano frente a 4 cepas bacterianas (2 cepas de *S.aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*).

A escolha por utilizar duas cepas de *S.aures* foi baseada no fato de que uma das cepas ATCC (29213), possui uma enzima, que propicia um importante mecanismo de resistência a antibióticos β -lactâmicos, pois ela hidrolisa o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amídica, o que leva a perda da capacidade do antimicrobiano em inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999).

6.2.1. Atividade referente a coleta realizada no Verão (2017)

6.2.1.1 - Microdiluição em caldo e concentração inibitória mínima (CIM)

O extrato obtido das folhas de *Eugenia brasiliensis* referente a coleta ocorrida na época do verão, apresentou bioatividade em todas as cepas bacterianas Gram positivas e Gram negativas que foram testadas.

Como pode ser observado na Figura 7, apenas na cepa de *Pseudomonas aeruginosa* não houve evidência de inibição total até a concentração pesquisada, porém é possível visualizar uma diminuição gradativa da turvação nos poços com maiores concentrações do extrato, indicando alguma sensibilidade do micro-organismo ao extrato (cavidades A, B, C 1 e 2), o que sugere a possibilidade de que maiores concentrações do extrato possam vir a inibir totalmente essa bactéria.

Ainda considerando a ação do extrato obtido nas folhas coletadas no verão sobre as cepas Gram negativas, foi possível verificar CIM de 2mg/mL para a cepa de *E. coli*, o que segundo Webster e colaboradores (2008) é uma excelente concentração inibitória.

De forma ainda mais promissora foi possível verificar neste experimento, que ambas as cepas de *S.aureus* apresentaram CIM de 1mg/mL o que torna o extrato do verão bastante propício para inibir essas bactérias Gram positivas, já que quanto maior a CIM melhor a atividade inibidora.

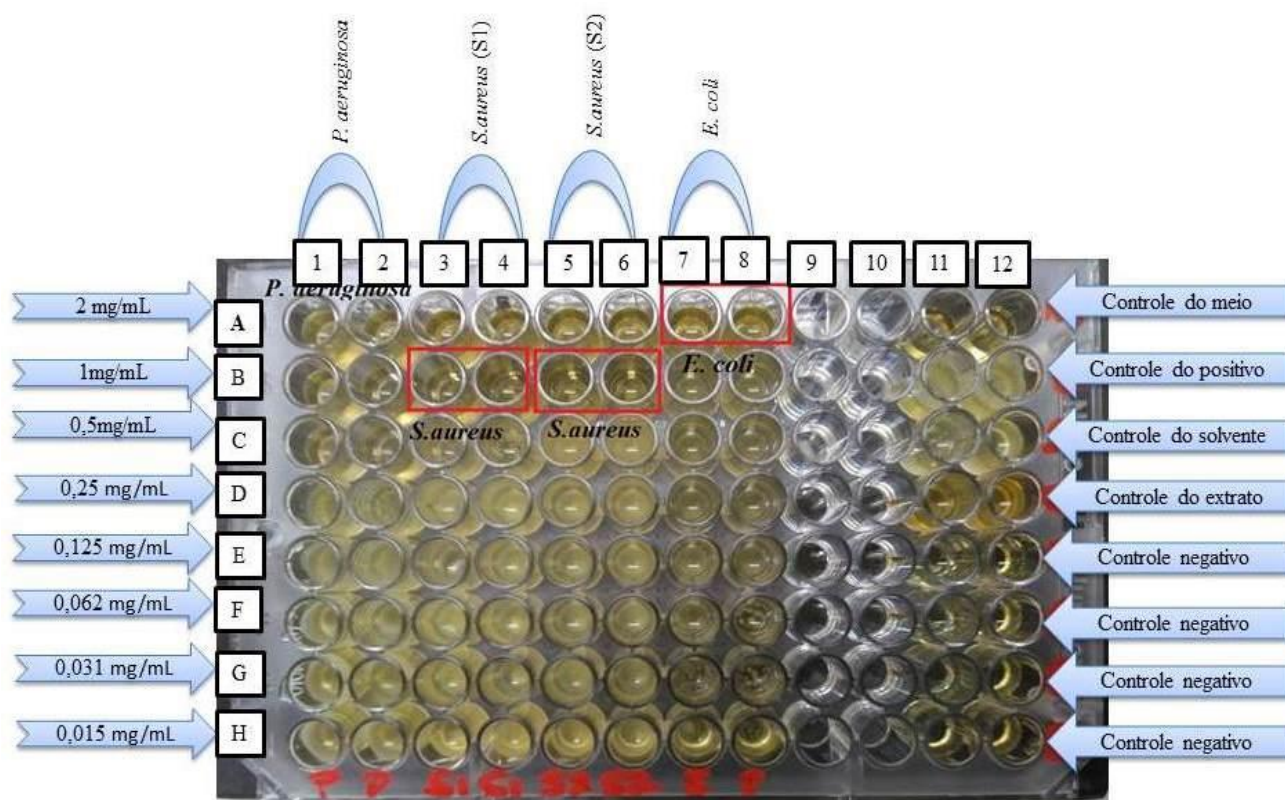


Figura 7- Placa de 96 poços utilizada nos testes (Verão)

Fonte: Fabio Mendes

Nos controles também foram obtidas respostas satisfatórias (colunas 11 e 12 da placa de 96 poços), demonstrando a validade do teste, onde o controle do meio de cultura se mostrou sem contaminantes (colunas 11/12 - linha A), os controles da viabilidade do meio (colunas 11/12 - linha B) e do solvente (colunas 11/12 - linha C) apresentaram o crescimento esperado, o que prova que o meio e as cepas apresentavam viabilidade e que o solvente não inibiu o crescimento bacteriano. No controle do extrato (colunas 11/12 - linha D) não houve crescimento provando assim que não estava contaminado, e nos controles das cepas com ciprofloxacino (colunas 11/12 - linhas E, F, G, H) em uma concentração de 0,04 mg/mL não houve crescimento algum.

6.2.1.2 - Concentração Bactericida mínima (CBM) - Verão

O material proveniente dos poços com extrato mais as cepas ATCC Gram positivas e Gram negativas, cujas concentrações não apresentaram crescimento bacteriano semeados no meio de cultura rico Cistina Lactose Eletrólitos Deficientes (CLED), não apresentaram crescimento de colônias. A ausência de crescimento após incubação deste material comprovou o efeito bactericida do extrato na mesma CIM obtida na diluição em caldo, conforme observa-se na figura 8. onde podem ser observados os campos semeados de: *S.aureus* não produtora beta-lactamase (S1) (A); *S.aureus* produtora beta-lactamase (S2) (B) e *E. coli* (C).

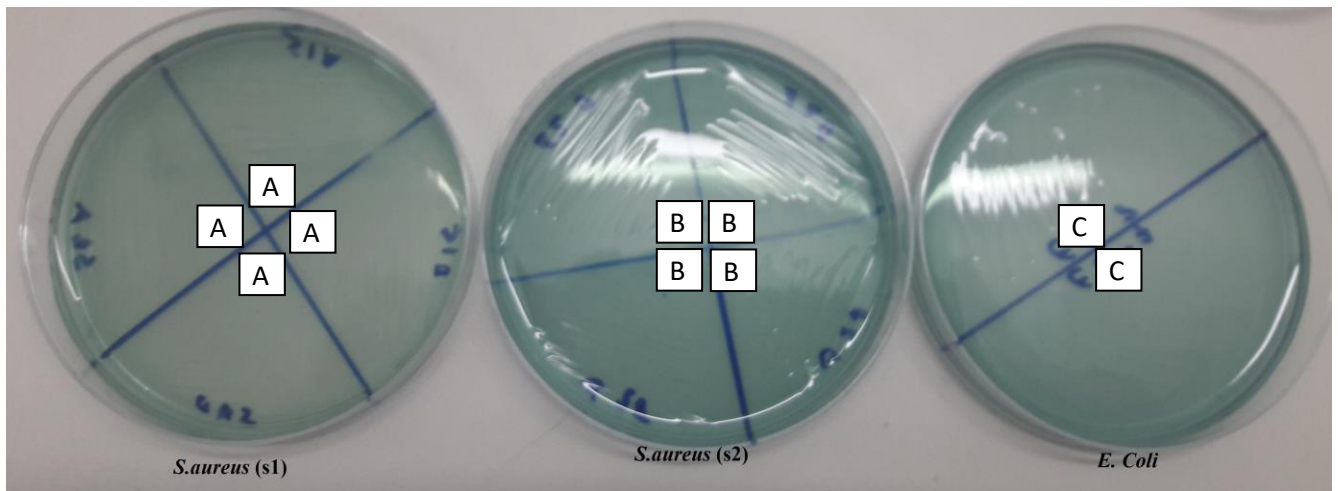


Figura 8- Placas semeadas em duplicata para verificação da CBM (Verão).

Fonte: Fabio Mendes

Legenda:

A: *S.aureus*

B: *S.aureus* produtor de β -Lactamase

C: *E.coli*

6.2.2. Atividade referente a coleta realizada na Primavera (2017).

6.2.2.1 - Microdiluição em caldo e concentração inibitória mínima (CIM)

O extrato referente a coleta ocorrida na época da primavera, também demonstrou atividade em todas as cepas testadas e mais uma vez, apenas na cepa de *P. aeruginosa* não houve evidência da CIM. Todavia, como na estação anterior, foi possível visualizar atividade intermediária do extrato no micro-organismo (Figura 9, cavidades A, B, C 1 e 2) devido a diminuição na turbidez do mesmo, o que corresponde a alguma forma de inibição parcial.

Igualmente ao extrato obtido na estação verão, a cepa de *E.coli* foi inibida com uma CIM de 2mg/mL. Por outro lado, nas cepas de *S.aureus* houve um aumento na CIM, 2mg/mL, significando que nessa estação o extrato é menos ativo nestes micro-organismos (Figura 9).

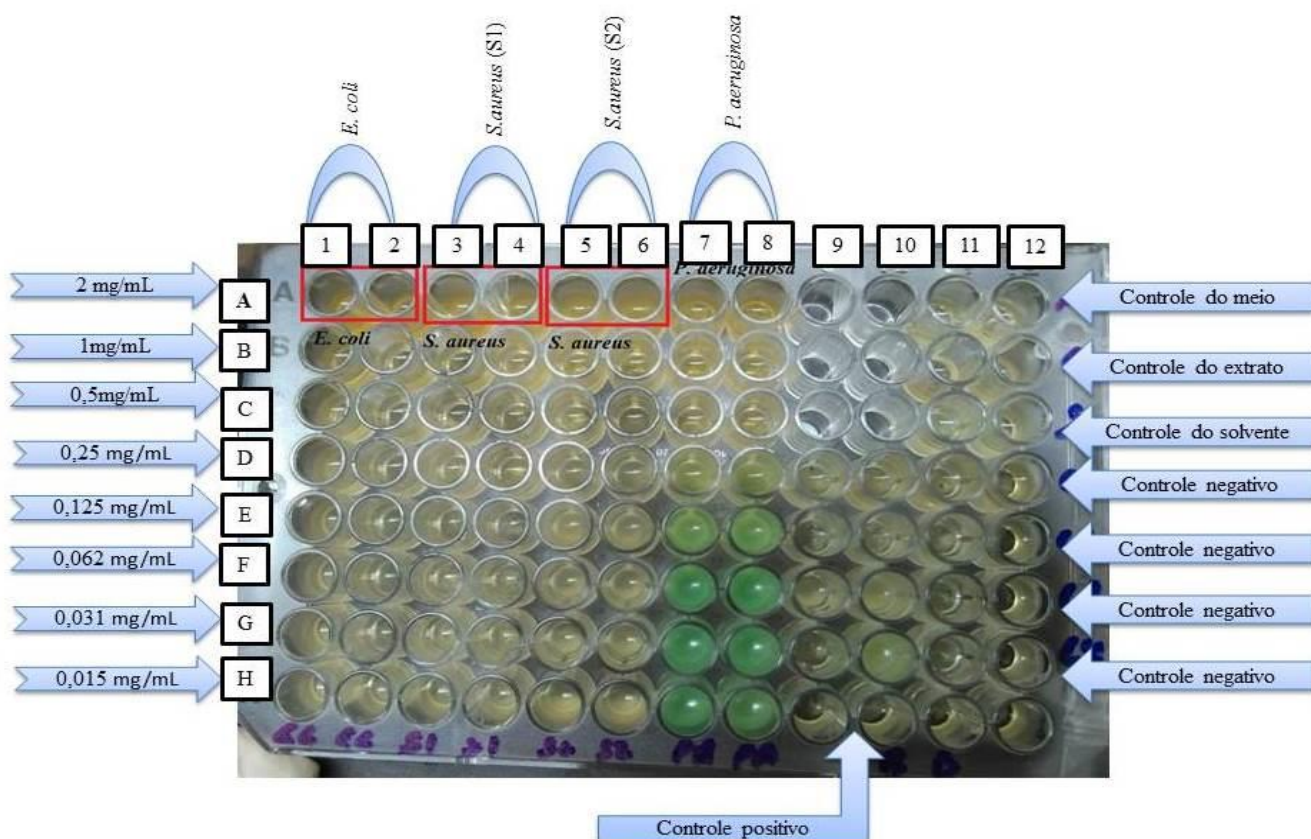


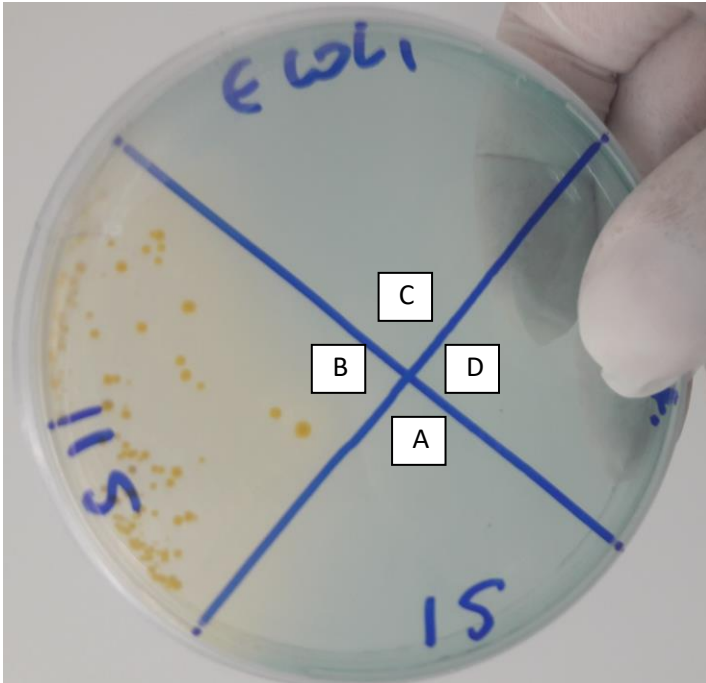
Figura 9- Placa de 96 poços utilizada nos testes (primavera).
 Fonte: Fabio Mendes

Nos controles novamente foram obtidas respostas satisfatórias (colunas 11 / 12 da placa de 96 poços), demonstrando a validade do teste, onde o controle do meio de cultura se mostrou sem contaminantes (colunas 11/12 - linha A), os controles do extrato se mostraram sem contaminantes (colunas 11/12 - linha B) e o controle do solvente a fim de evidenciar

que o mesmo não interfere no crescimento das cepas (colunas 11/12 - linha C) apresentou o crescimento esperado, o que prova que o meio, extrato e o solvente apresentavam viabilidade e que o solvente não inibiu o crescimento bacteriano. No controle do meio (colunas 9/10 - linha D/ E/ F/ G) houve crescimento provando assim a viabilidade do meio e de crescimento das cepas, e nos controles das cepas com ciprofloxacino (colunas 11/12 - linhas D/ E/ F/ G) em uma concentração de 0,04 mg/mL não houve crescimento algum.

6.2.2.2 - Concentração Bactericida mínima (CBM) - Primavera

Nesta ocasião o teste em duplicidade foi realizado em duas placas iguais separadas para minimizar possíveis erros. De forma positiva, ambas comprovaram o mesmo resultado onde, após a retirada e semeadura em meio sólido rico, do material dos poços da microdiluição em caldo onde observou-se a CIM, foi possível, após incubação, verificar ausência de crescimento tanto na cepa de *E. coli* como na cepa de *S.aureus* não produtora beta-lactamase (S1), comprovando mais uma vez o efeito bactericida do extrato. No entanto, na cepa produtora de beta-lactamase (S2) foi possível evidenciar crescimento (figura 10) demonstrando assim, que a presença desta enzima foi efetiva contra o extrato, o que pode sugerir a forma de atividade do mesmo. No entanto se fazem necessários mais estudos a fim de revelar como o extrato atua nos micro-organismos, e quais são os mecanismos de resistência bacterianos que podem interferir nessa atividade, já que bactérias podem apresentar diferentes formas de burlar atividade antimicrobiana, atuando separadas ou em conjunto (FERNANDES, et al. 2009, STRATEVA; YORDANOV, 2009).



Legenda:

A: *S.aureus*

B: *S.aureus* produtor de β -Lactamase

C: *E.coli*

D: *P.aeruginosa*

Figura 10- Placa semeada para comprovação da CBM (Primavera).

Fonte: Fabio Mendes

6.2.3. Atividade referente a coleta realizada no Outono (2018).

6.2.3.1 - Microdiluição em caldo e concentração inibitória mínima (CIM)

O extrato referente as folhas coletadas no outono, também demonstrou atividade em todas as cepas testadas. Mais uma vez apenas na cepa de *Pseudomonas aeruginosa* não houve evidencia da CIM, mas observou-se atividade intermediária do extrato no micro-organismo (Figura 6, cavidades A / B, 7 / 8).

De forma estável entre as estações, a menor concentração de extrato que inibiu a cepa de *E.coli* testada foi 2mg/mL.

Mais uma vez foi possível observar uma mudança positiva no potencial inibidor do extrato das folhas de *E.brasiliensis* frente as cepas de *S.aureus*, já que detectamos uma CIM de 1mg/mL, demonstrando mais uma vez que sazonalidade interfere nesse material como é possível conferir na figura 11.

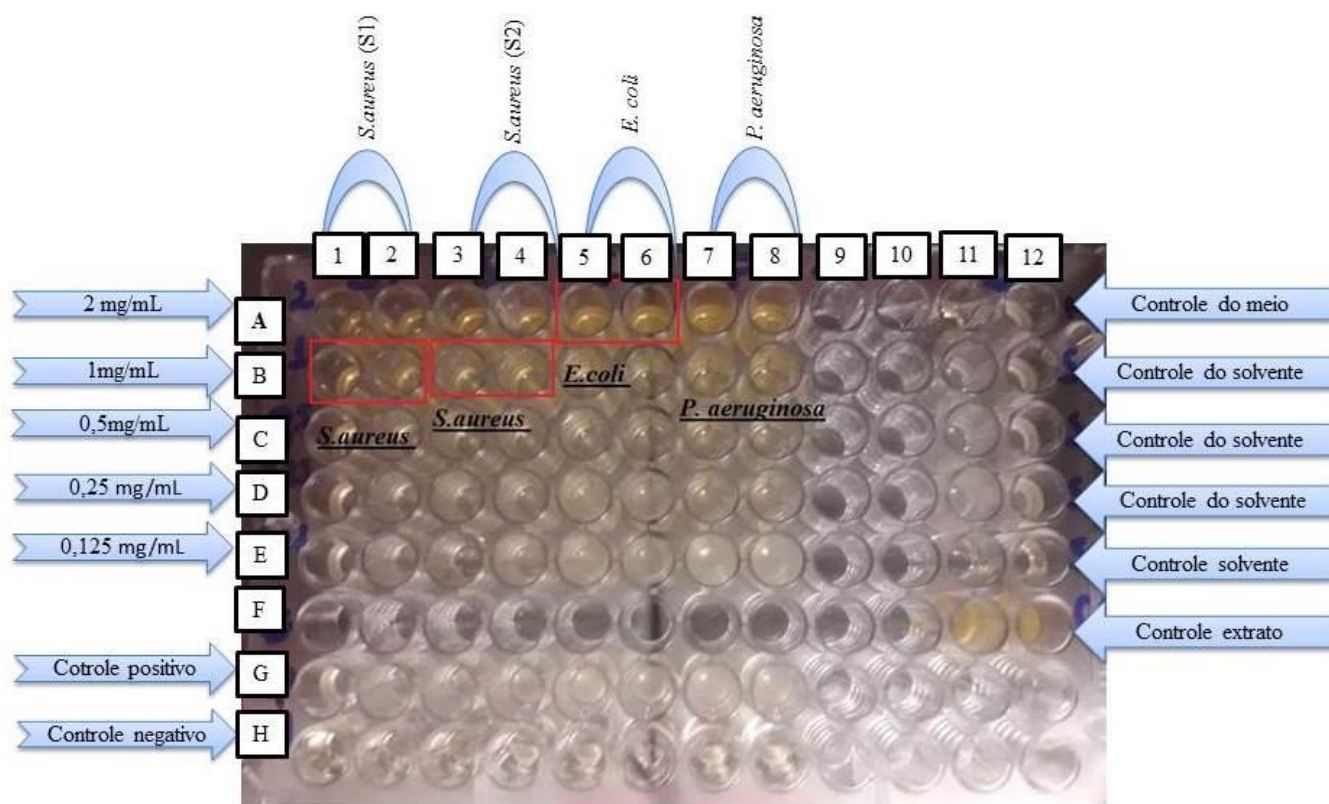


Figura 11- Placa de 96 poços utilizada nos testes (Outono).

Fonte: Fabio Mendes

Nos controles também foram obtidas respostas satisfatórias (colunas 11 e 12 da placa de 96 poços), demonstrando a validade do teste. O controle do meio de cultura se mostrou sem contaminantes (colunas 11/12 - linha A) e os do solvente (colunas 11/12 - linha B/C/D/E) apresentaram o crescimento esperado, o que prova que o meio e as cepas apresentavam viabilidade e que o solvente não inibiu o crescimento bacteriano. No controle do extrato (colunas 11/12 - linha F) não houve crescimento provando assim que não estava contaminado, e nos controles das cepas com ciprofloxacino (colunas 1/2 *S. aureus* (S1), 3/4 *S. aureus* (S2), 5/6 *E. coli*, 7/8 *P. aeruginosa* - linha H) em uma concentração de 0,04 mg/mL não houve crescimento algum. Nos controles positivos (colunas 1/2 *S. aureus* (S1), 3/4 *S. aureus* (S2), 5/6 *E. coli*, 7/8 *P. aeruginosa* - linha G) houve o crescimento esperado.

6.2.3.2 - Concentração Bactericida mínima (CBM) - Outono

Após a semeadura e incubação do material proveniente dos poços correspondentes a CIM do extrato do outono, não houve crescimento em nenhuma das amostras, comprovando mais uma vez o efeito bactericida do extrato.

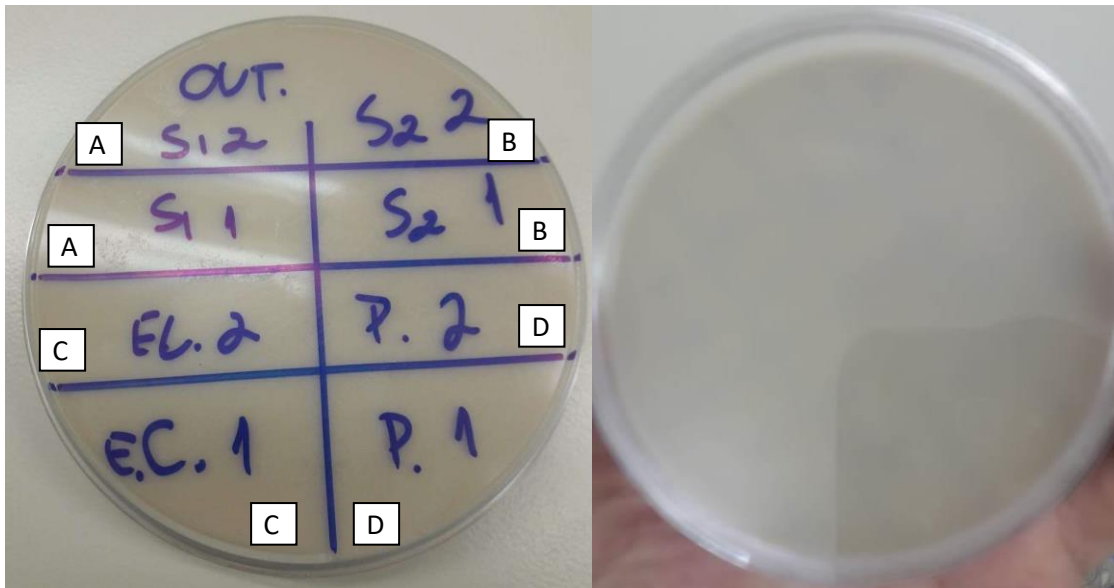


Figura 12- Placa semeada para comprovação da CMB (outono)

Fonte: Fabio Mendes

Legenda:

A: *S.aureus*

B: *S.aureus* produtor de β -Lactamase

C: *E.coli*

D: *P.aeruginosa*

É importante reforçar que esta prova demonstrou o efeito bactericida do extrato na concentração 1mg/mL tanto nas cepas de *S.aureus* sensíveis aos antimicrobianos beta lactâmicos, quanto nas produtoras de beta-lactamases.

O mesmo pode ser observado no caso das cepas Gram negativas de *E.coli* e na concentração de 2mg/mL, o que evidencia uma atividade antibacteriana do extrato bastante promissora nesta estação.

6.2.4. Atividade referente a coleta realizada no Inverno (2018).

6.2.4.1 - Microdiluição em caldo e concentração inibitória mínima (CIM)

O extrato referente a coleta ocorrida na época do inverno também demonstrou atividade em todas as cepas testadas. Todavia, tanto na cepa de *Pseudomonas aeruginosa* como na de *E.coli* não houve evidencia da CIM, porém é possível visualizar atividade intermediária do extrato nos micro-organismos (Figura 13 - cavidades linha A, colunas 5, 6, 7, 8).

Nas cepas de *S.aureus* observamos uma CIM de 2mg/mL em relação ao extrato, como é possível verificar na figura 7.

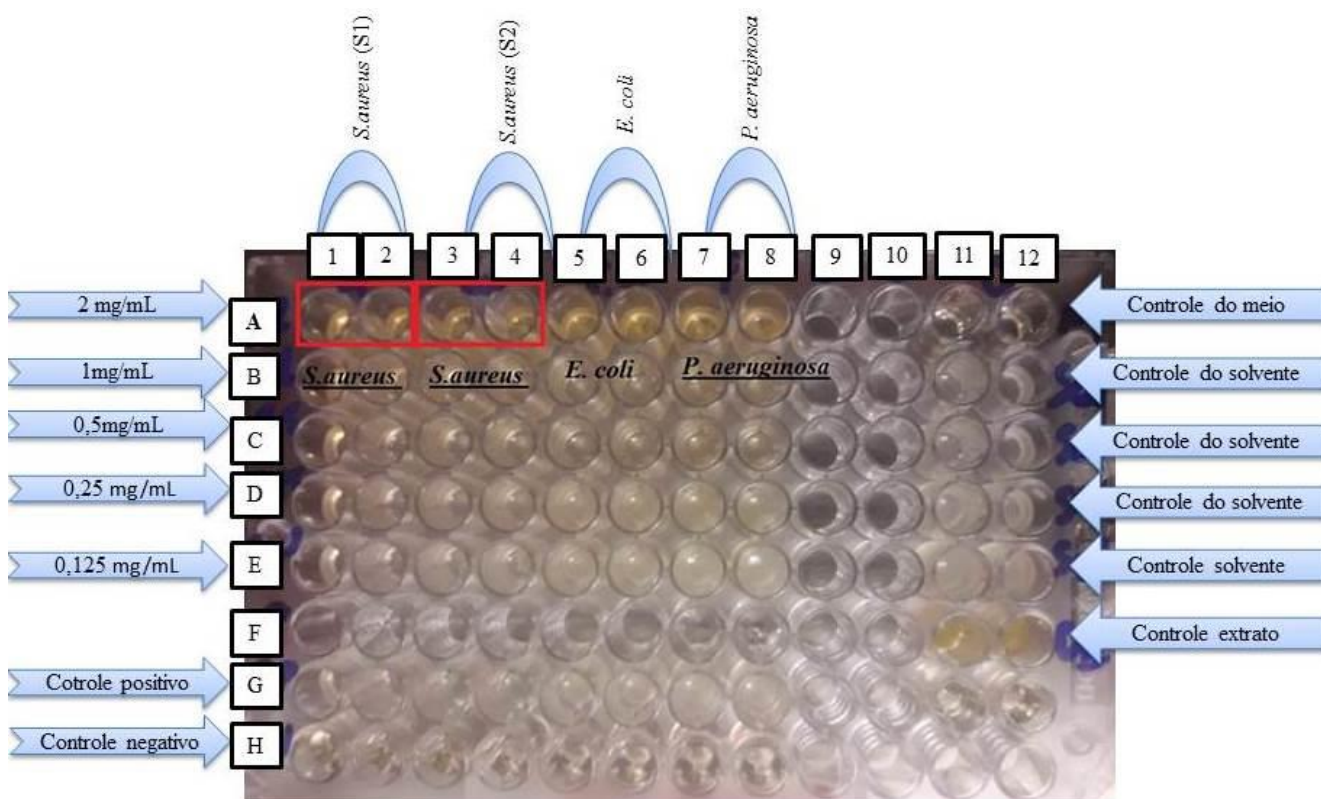


Figura 13- Placa de 96 poços utilizada nos testes (Inverno).
Fonte: Fabio Mendes

Nos controles mais uma vez foram obtidas respostas satisfatórias (colunas 11 e 12 da placa), demonstrando a validade do teste, onde o controle do meio de cultura se mostrou sem contaminantes (colunas 11/12 - linha A), do solvente (colunas 11/12 - linha B/C/D/E) apresentaram o crescimento esperado, o que prova que o meio e as cepas apresentavam viabilidade e que o solvente não inibiu o crescimento bacteriano. No controle do extrato (colunas 11/12 - linha F) não houve crescimento, provando assim que não estava contaminado. Nos controles das cepas com ciprofloxacino (colunas 1/2 *S. aureus* (S1), 3/4 *S.aureus* (S2), 5/6 *E.coli*, 7/8 *P.aeruginosa* - linha H) em uma concentração de 0,04mg/mL não houve crescimento algum. Nos controles positivos (colunas 1/2 *S. aureus* (S1), 3/4 *S.aureus* (S2), 5/6 *E.coli*, 7/8 *P.aeruginosa* - linha G), houve o crescimento esperado.

6.2.4.2 - Concentração Bactericida mínima (CBM)

Na pesquisa da CMB referente ao extrato obtido no inverno, o material proveniente dos poços com extrato + cepas ATCC Gram positivas e Gram negativas, cujas concentrações não apresentaram crescimento bacteriano e/ou crescimento reduzido, foram semeados em meio sólido rico. A partir do material dos poços da microdiluição em caldo, foi possível, após incubação, verificar ausência de crescimento em ambas as cepas de *S.aureus*, comprovando mais uma vez o efeito bactericida do extrato.

Curiosamente, a semeadura feita em placa, a partir dos poços da microdiluição em caldo do inverno onde a CIM não pôde ser observada, mas houve alteração na turvação do crescimento em caldo, demonstrou ausência de crescimento da *E.coli* na concentração de 2mg/mL (Figura 14).

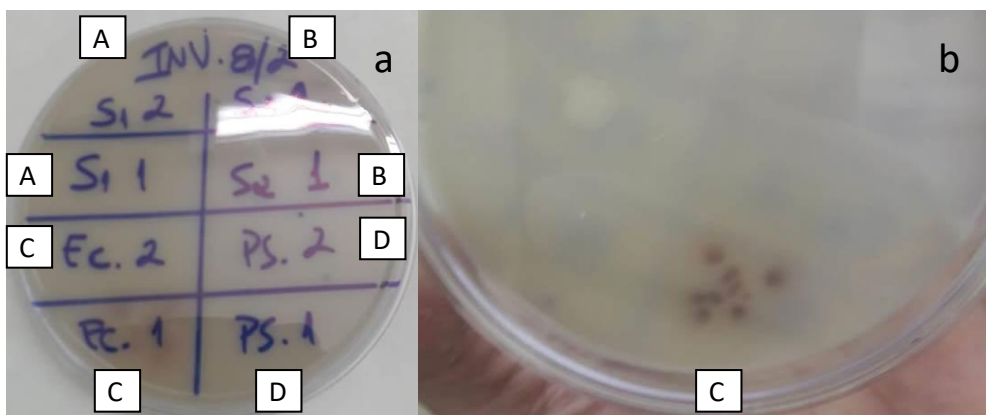


Figura 14 - a - Fundo da Placa de petri semeada para comprovação da CBM (Inverno); b – Evidenciação de crescimento bacteriano indicativo de *E.coli*

Fonte: Fabio Mendes

Legenda:

A: *S.aureus*

B: *S.aureus* produtor de β -Lactamase

C: *E.coli*

D: *P.aeruginosa*

Segundo o trabalho de Siebert e colaboradores (2015) se faz necessário uma verificação sazonal e também do lugar da coleta do material vegetal utilizado, pois podem ocorrer variações significativas por conta dessas duas variantes. Nos trabalhos dos autores citados, em alguns testes, as amostras coletadas no verão e no outono, apresentaram melhores atividades, já em outros espécimes foi a época do inverno que apresentou uma melhor atividade, portanto a análise sazonal do material realizada do presente estudo se mostrou de grande importância, pois nossos achados corroboram esses estudos, já que foi possível detectar uma menor CIM em relação às cepas de *S.aureus* no verão e outono (CIM=1mg/mL) do que na primavera e inverno (CIM=2mg/mL), provando que a sazonalidade influencia na bioatividade desta planta.

Seguindo essa idéia, foi possível observar neste trabalho, uma resposta de atividade antimicrobiana semelhante entre as estações do verão e outono e também entre o inverno e a primavera. É possível ainda observar que nas duas primeiras, houve uma melhor atividade do extrato, corroborando com o trabalho de Siebert e colaboradores (2015), que também obtiveram nessas mesmas estações, as melhores respostas.

Segundo Evans (1996) as variações de temperatura influenciam no desenvolvimento do vegetal, afetando a produção de metabólitos secundários, que parecem aumentar em temperaturas mais elevadas. Isso pode explicar em parte a melhor atividade antibacteriana verificada nos extratos de *E. brasiliensis* obtidos a partir de folhas coletadas no verão e outono (Tabela 5 e Tabela 7).

A redução da atividade principalmente nos meses mais frios (Tabela 6 e 8), pode ser explicada pelo acionamento de um mecanismo natural que pode degradar os metabólitos secundários, direcionando os compostos químicos do vegetal para a manutenção do seu metabolismo primário (TAIZ, ZEIGER, 2004).

Tabela 5 - Inibição bacteriana a partir do extrato das folhas coletadas no Verão.

Concentração - mg/mL	<i>S.aureus</i> (S1)	<i>S.aureus</i> (S2)	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
2	+	+	+	-
1	+	+	-	-
0,5	-	-	-	-

(S1) - *S.aureus* não produtora beta-lactamase.
(S2) - *S.aureus* cepa produtora de beta-lactamase
+ : inibiu totalmente a bactéria
- : não houve inibição total da bactéria

Tabela 6- Inibição bacteriana a partir do extrato das folhas coletadas na Primavera

Concentração - mg/mL	<i>S.aureus</i> (S1)	<i>S.aureus</i> (S2)	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
2	+	+	+	-
1	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-

(S1) - *S.aureus* não produtora beta-lactamase.
(S2) - *S.aureus* cepa produtora de beta-lactamase
+ : inibiu totalmente a bactéria
- : não houve inibição total da bactéria

Tabela 7- Inibição bacteriana a partir do extrato das folhas coletadas no Outono

Concentração -mg/mL	<i>S.aureus</i> (S1)	<i>S.aureus</i> (S2)	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
2	+	+	+	-
1	+	+	-	-

0,5	-	-	-	-
-----	---	---	---	---

(S1) - *S.aureus* não produtora beta-lactamase.
(S2) - *S.aureus* cepa produtora de beta-lactamase
+ : inibiu totalmente a bactéria
- : não houve inibição total da bactéria

Tabela 8- Inibição bacteriana a partir do extrato das folhas coletadas no Inverno

Concentração - mg/mL	<i>S.aureus</i> (S1)	<i>S.aureus</i> (S2)	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
2	+	+	-	-
1	-	-	-	-
0,5	-	-	-	-

(S1) - *S.aureus* não produtora beta-lactamase.
(S2) - *S.aureus* cepa produtora de beta-lactamase
+ : inibiu totalmente a bactéria
- : não houve inibição total da bactéria

Foi possível verificar que extrato de *Eugenia brasiliensis* obteve melhor ação sobre as cepas Gram positivas em relação às cepas Gram negativas testadas nesse trabalho, indicando assim um possível norte para futuras pesquisas desta planta contra bactérias Gram positivas. A bactéria *Staphylococcus aureus*, testada nesse trabalho, é um micro-organismo que está sempre envolvido em infecções hospitalares e é considerado um dos principais patógenos causadores de diversas infecções nos ambientes hospitalares, podendo atuar desde infecções traumáticas até septicemias (OLIVEIRA et al, 1998), sua resistência aos antimicrobianos tem sido um fator de alerta constante, e em nosso estudo, o extrato obtido nas estações do verão e outono inibiu esse micro-organismo com uma concentração de apenas 1 mg/mL (Tabela 4 e 6), tornando a utilização deste extrato como potencial antimicrobiano para esta espécie bacteriana, bastante promissora.

Outro fator importante observado é que durante a verificação da CBM do extrato da primavera nas cepas de *S.aureus* estudadas, apenas houve inibição (atividade bactericida), no crescimento em placa com meio sólido, da cepa não produtora de beta-lactamase, sendo possível observar o crescimento no meio sólido da cepa que produzia a enzima beta-lactamase (figura 10). Esse achado sugere uma atividade bacteriostática para essa cepa, já que no teste da microdiluição houve inibição do crescimento do inóculo no poço referente a

concentração de 2 mg/mL da cepa de *S.aureus* produtora de beta-lactamases. Esse resultado sugere que sejam necessários mais testes para elucidar o mecanismo de atuação do extrato testado, pois segundo Williams (1999), como as cepas produtoras beta-lactamases hidrolisam o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, isso leva a perda da capacidade do antimicrobiano em inibir a síntese da parede celular bacteriana, o que sugere que o potencial antimicrobiano do extrato deva agir também na parede bacteriana.

Apesar de não haver na literatura uma concordância entre os pesquisadores quanto ao padrão que deve ser estipulado para avaliação da concentração ideal de um extrato na inibição microbiana, alguns autores determinaram em seus trabalhos que valores de CIM devem ser definidos como inibição forte ou fraca dependendo da concentração do extrato. Holetz e colaboradores (2002), por exemplo, consideram ativas somente CIM iguais ou menores de 0,5 mg/mL, já Aligiannis e colaboradores (2001) consideram como uma CIM extremamente forte a obtenção de valores entre 0.28–1.27 mg/mL. Webster e colaboradores (2008) já consideram como ideal concentrações a partir de 2mg/mL. Apesar de todos esses autores justificarem suas escolhas, é importante considerar também que além da atividade pontual do extrato deve-se considerar possíveis sinergismos com outras drogas, o que não inviabiliza concentrações maiores como as obtidas por Michelin e colaboradores (2005) que apesar de encontrarem CIMs acima de 180 mg/mL consideraram seus resultados promissores.

Também não existe um consenso sobre o nível aceitável para extratos de materiais vegetais quando comparados com antibióticos padrões. Alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos conhecidos desde que se trabalhe com uma fração já determinada (MENDES et al. 2010), o que não é o nosso caso já que estamos obtendo o extrato bruto.

Não foi observada atividade de completa inibição dos extratos contra a cepa de *P.aeruginosa* em nenhuma estação do ano, isso pode ser em parte explicado pelo fato de que *P. aeruginosa* é considerado um patógeno nosocomial problemático unicamente por conta da sua resistência natural à muitas classes de drogas, além de possuir grande facilidade de adquirir resistência por meio de trocas inter e extra espécie ou por mutações. Segundo os autores citados, *P. aeruginosa* demonstra praticamente todos os mecanismos

enzimáticos e mutacionais conhecidos de resistência bacteriana, além de possuir uma baixa permeabilidade de sua membrana externa (1/100 da permeabilidade da membrana externa de *E. coli*), várias bombas de efluxo expressadas e β - lactamase AmpC cromossômica natural da espécie (conhecida como cefalosporinase) (FERNANDES, et al. 2009, STRATEVA; YORDANOV, 2009).

De forma geral, foi possível observar que os extratos de *E. brasiliensis*, apresentaram ação mais efetiva contra as bactérias Gram-positivas do que contra as Gram negativas. Segundo Miranda e colaboradores (2015), isso ocorre provavelmente devido a estrutura celular diferenciada das bactérias Gram-negativas, já que estas possuem uma parede celular composta de peptidoglicano e uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos, o que lhes conferem maior proteção contra as substâncias ambientais, extratos de plantas e antibióticos (ASKARI et al., 2012). Assim como em nossa pesquisa, vários autores também reportam melhores resultados, em estudos com extratos de plantas, contra as bactérias Gram-positivas (KUBDE et al., 2010; KHAN et al., 2011; ALI et al., 2011; ASKARI et al., 2012; SILVA et al., 2013; ROCHA, 2013; ROY et al., 2013; ARAUJO et al., 2014).

Pesquisas semelhantes sugerem que o sucesso na extração de substâncias ativas do material vegetal está diretamente associado ao solvente utilizado no processo de extração (MIRANDA et al, 2015). Segundo Alo e colaboradores (2012), o etanol, utilizado em nosso estudo, é um solvente muito melhor que a água, para a extração das substâncias ativas de plantas, tendo juntamente com Cowan (1999), relatado que as substâncias ativas identificadas a partir de plantas contra micro-organismos são geralmente compostos aromáticos ou orgânicos saturados, e que estes compostos são mais facilmente obtidos através da extração inicial com etanol ou metanol.

6.3. Teste de toxicidade

O teste de toxicidade realizado com *Artemia salina* é considerado um teste barato de fácil aplicabilidade e confiável sendo amplamente utilizado para testar de forma rápida a

toxicidade de vários produtos como exemplo antitumorais, antifúngicos, anestésicos, inseticidas e bactericidas (SIQUEIRA et al., 1998).

Como explicado na metodologia, o extrato referente a estação do ano onde houve maior atividade antimicrobiana (Verão), foi testado em duplicata para toxicidade através desta técnica. A avaliação realizada (Figura 15) indicou após 24 horas, uma dose letal mediana (DL_{50}) do extrato de Verão frente *A.salina* de 2mg/mL. Não houve atividade com o solvente utilizado. Meyer e colaboradores (1982) definiram em seus estudos, que amostras com $DL_{50} \leq 0.03\text{mg/mL}$ e doses $\geq 1\text{mg/mL}$ deveriam ser consideradas atóxicas.

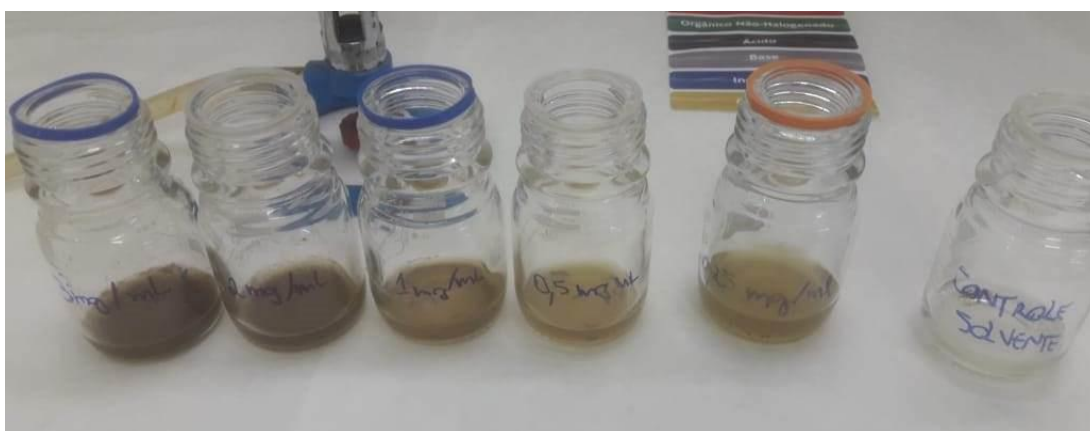


Figura 15 - Teste de toxicidade Com *Artemia salina*.

Considerando então as indicações de Meyer e colaboradores (1982), podemos classificar o extrato deste estudo (estação do verão onde foram observados melhores CIM), como atóxico, pois seu DL_{50} se encontra na concentração de 2 mg/mL como pode ser observado no Gráfico 1.

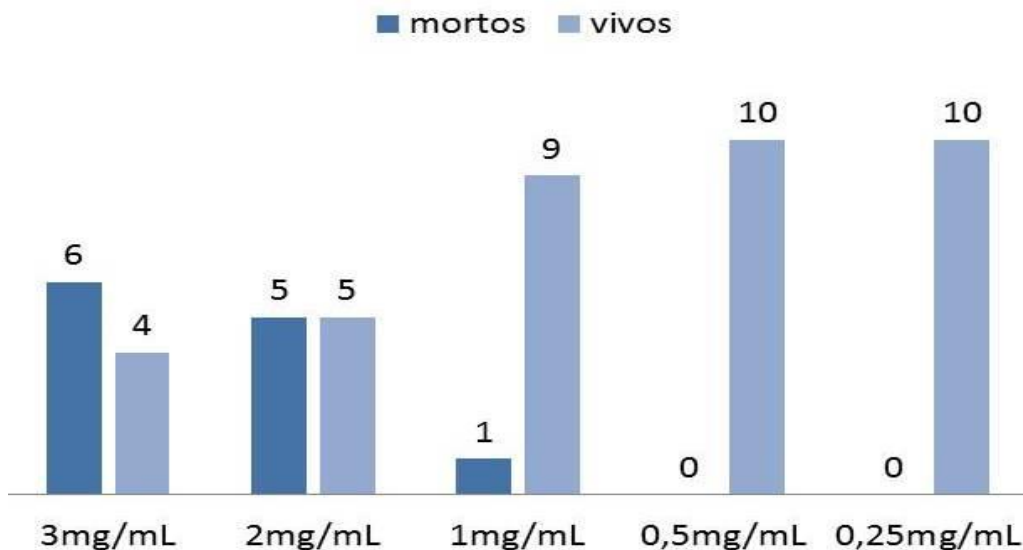


Gráfico 1- Teste de toxicidade com *Artemia salina*

No gráfico 1 é possível observar que a concentração que obteve a DL_{50} é justamente 2mg/mL concentração que aparece como resultado nos testes de CIM tanto das cepas de *S.aureus* (resultados das estações com CIM mais fracas, primavera e inverno), quanto de *E. coli*, ainda é possível observar também que na concentração de 1mg/mL que é considerado por Meyer e colaboradores (1982) o limite para ser considerado atóxico também é o resultado das CIM das cepas de *S.aureus* com melhores resultados (verão e outono), apenas houve morte de uma unidade do crustáceo demonstrando que o extrato praticamente não afetou nessa dose os organismos testados.

6.4. Análise química dos Extratos de *Eugenia brasiliensis*

6.4.1. Análise fitoquímica

Os extratos etanólicos obtidos foram submetidos a testes fitoquímicos, baseados em precipitação e coloração dos extratos diluídos em solução e reativos específicos para cada teste conforme metodologia proposta por Matos (1997). Os extratos etanólicos das 4 estações do ano das folhas da *Eugenia Brasiliensis* coletadas no período de dezembro de

2017 a agosto de 2018 no Jardim Botânico do Rio de Janeiro apresentaram positividade para alcalóides, flavonóides, triterpenóides, esteróides e taninos.

Alguns trabalhos realizados com a fitoquímica do gênero *Eugenia* também relatam a presença de terpenóides, alcalóides, esteróides e algumas acetogeninas e ciclopeptídeos, corroborando nossos resultados. Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que *Eugenia florida* e *Eugenia uniflora* apresentaram constituintes semelhantes aos da *Eugenia brasiliensis* (ABRANTES, 2017; QUEIROZ et al., 2015).

Abrantes (2017) que trabalhou com o gênero *Eugenia* em sua dissertação de mestrado, corroborando com nossos achados, obteve triterpenos e taninos em sua prospecção fitoquímica. Todavia evidenciou a presença de saponinas não detectadas nesta pesquisa. Além disso sua análise não confirmou os fitoconstituintes alcalóides, flavonoides e nem esteróides. Segundo Matos (1997) os resultados negativos não excluem a presença dos compostos relacionados, pois a metodologia aplicada pode ser diferente e por isso não ter detectado de maneira eficaz essas substâncias. Outra possibilidade aventada é que a quantidade deste composto estava muito reduzida no extrato utilizado (MATOS, 1997). Além disso a espécie pesquisada por Abrantes (1917) foi diferente da analisada neste estudo e também não houve realização de testes sazonais, o que pode dificultar a detecção.

Magina e colaboradores (2012) investigaram extratos brutos hidroalcoolicos de folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) coletados em Santa Catarina no Brasil e detectaram majoritariamente a presença de triterpenóides e flavonoides. O isolamento dos metabolitos principais levou a identificação dos seguintes compostos: α -amirina e β -amirina (em uma mistura), betulina, ácido 29-hidroxi-oleanólico, quercetina, catequina e galocatequina. Enquanto, Frighetto e colaboradores, em extratos brutos etanólicos das folhas da *E. brasiliensis* coletadas nas cercanias do campus da Universidade Estadual de Campinas identificaram a presença do ácido ursólico como composto triterpenico, já nossas pesquisas identificaram Ácido Betulínico, Ácido Ursólico e o Ácido Oleanólico sendo esse último em maior proporção que os demais.

Os testes em CCD realizados com o extrato das folhas *E. brasiliensis* utilizaram diferentes sistemas de solventes e reveladores (tabela 9). Eles confirmaram a presença de

triterpenoides e esteroides (figura 15). Os extratos apresentaram coloração e fator de retenção (Rf) semelhante aos padrões utilizados. No caso do teste para triterpenoides foram utilizados os ácidos oleanólico (0,29), ursólico (0,28) e betulínico (0,41). O resultado sugere a presença dos dois primeiros. No caso de esteroides foi utilizado como padrão colesterol, rf (0,50).

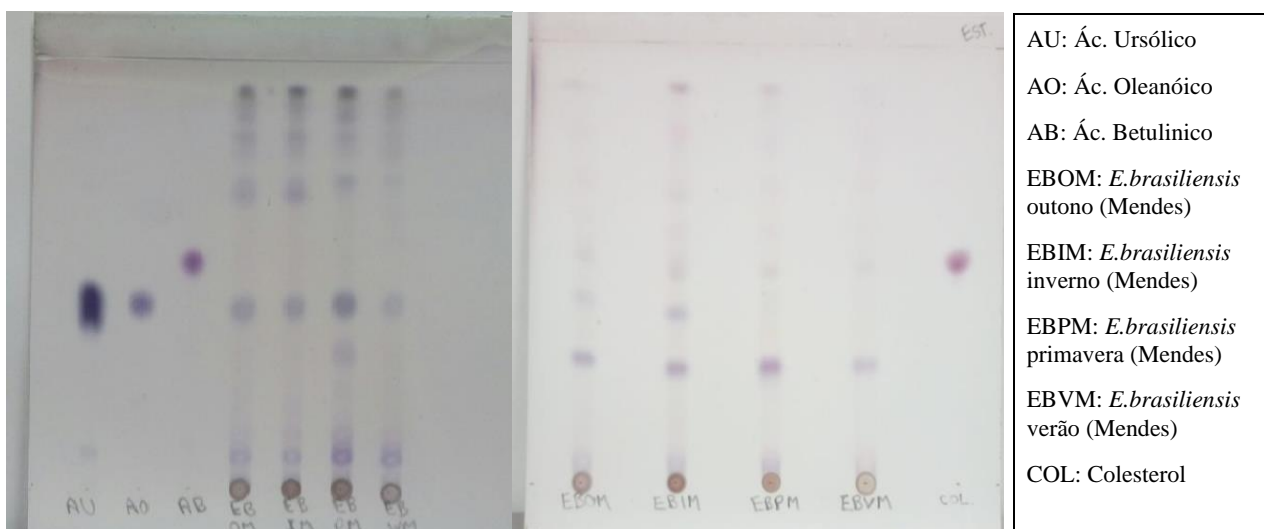


Figura 16 - Placas de CCD confirmando presença de triterpenoides e esteroides.

Tabela 9 – Resultado das condições utilizadas para prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos das folhas de *E. brasiliensis*

Classe metabólica	Padrão	Fase móvel	Agente Revelador	Coloração padrão	Resultado
Alcalóides	Pilocarpina	Tolueno:EtOAc:Dietilamina	Dragendorff	Laranja-marrom	<u>Negativo</u>
Taninos	Geranilina	EtOAc:HCOOH:H ₂ O (100:11:27, v/v/v)	FeCl ₃ , 1% em MeOH	Azul	<u>Negativo</u>
Flavonoides	Tilirosídeo e Rutina	EtOAc:HCOOH: CH ₃ COOH:H ₂ O	NP/PEG e observação na luz UV	Amarelo/verde/laranja	<u>Negativo</u>

(100:11:11:27,v/v/v/v)

365 nm

Triterpenoides	Ácido betulínico, oleanólico, ursólico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3:\text{EtOAc}$ (8:2, v/v)	Anisaldeído Sulfúrico e aqueciment o	Violeta	<u>Positivo</u>
Esteróides	colesterol	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3:\text{EtOAc}$ (8:2, v/v)	Anisaldeído Sulfúrico e aqueciment o	Roxo-vinho	<u>Positivo</u>

6.4.2. Análise do Extrato obtido no Verão por CLAE-UV-DAD

A fase móvel composta por acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico (0,05%) mostrou ser a mais adequada, apresentando pico bem resolvido e tempo de retenção de 12 min para o Ácido Betulínico (AB), 14 min para o Ácido Ursólico (AU) e 13,6 min para o Ácido Oleanólico (AO), como demonstrado na Figura 16.

Abaixo um exemplo do cromatograma dos extratos de *E. brasiliensis* o pico 12 em aproximadamente 12,7 min é referente ao ácido betulínico, o pico 13 em 13,9 min é referente ao ácido oleanólico e o pico 14 em 14,9 min ao ácido ursólico.

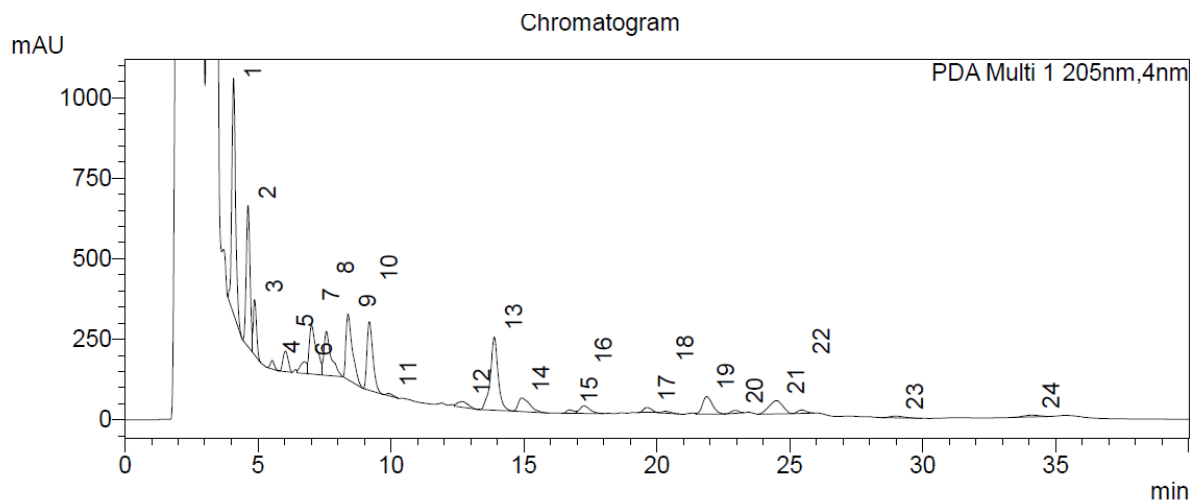


Figura 17- Cromatograma do extrato de *E.brasiliensis* obtido no verão.

A análise através de CLAE-UV-DAD, desenvolvida por Fonseca e colaboradores (2010), possibilitou a obtenção do perfil químico dos extratos etanólicos de folhas de *E. brasiliensis* coletadas nas quatro estações do ano. Esse resultado corrobora com os achados de Míguas (2018), que indicam a importância técnica desse tipo de análise para a determinação da impressão digital de cada vegetal.

As análises por CLAE-UV realizadas em triplicata (FONSECA et al., 2010), revelaram que os ácidos triterpênicos estão presentes em todas as estações do ano, sendo o ácido oleanólico, o triterpeno majoritário encontrado nos extratos analisados (Tabela 9). Esse achado ratifica o que já havia sido sugerido por Queiroz e colaboradores (2015) que apontam esse ácido como um dos marcadores taxonômicos para esta família.

Tabela 10 - Percentual de ácidos triterpênicos

Ácido triterpênico	Estação do ano			
	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Ácido Betulínico	1,3%	1,2%	0,9%	0,7%
Ácido Oleanólico	12,1%	10,8%	11,1%	10,5%
Ácido Ursólico	3,3%	1,3%	2,4%	2,8%

7. CONCLUSÕES

- Os extratos testados apresentaram diferentes níveis de atividade antimicrobiana contra as cepas testadas, porém a maior atividade ocorreu nas bactérias Gram positivas *S.aureus* e a menor na cepa Gram negativa de *P.aeruginosa*.
- A CIM encontrada nas cepas de *S.aureus* variou entre os extratos obtidos das diferentes estações, com uma melhor resposta nas estações verão e outono, comprovando assim que estudos sazonais quando se referem a produtos naturais, são de extrema relevância para futuras pesquisas.
- Considerando os resultados da CIM/CBM, o extrato apresentou atividade bactericida para a maioria das cepas testadas, todavia nas cepas de *S.aureus* produtoras de β -lactamases a atividade observada foi bacteriostática, sugerindo como possível alvo a parede bacteriana.
- O teste de toxicidade da *Artemia salina* utilizado no presente estudo, indicou baixo potencial tóxico do extrato onde houve maior atividade, sugerindo que este deve ser melhor pesquisado com o objetivo de ser utilizado no futuro como um possível antimicrobiano alternativo.
- Os testes fitoquímicos e a CLAE-DAD identificaram a presença de ácidos triterpenicos, que segundo dados da literatura apresentam atividade antimicrobiana, sendo esses ácidos então os possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana presente no extrato de *E. brasiliensis*.

Como foi possível observar nesse estudo, existem diferentes estratégias de resistência em diferentes cepas bacterianas, sendo inadmissível na atual conjuntura, definir um antimicrobiano para uso em qualquer infecção sem distinguir o micro-organismo e sua resposta a cada antimicrobiano. As plantas possuem um excelente potencial para essas pesquisas e provavelmente o futuro se voltará para seu uso em diferentes formulações. O que faz necessário é que se estabeleça com brevidade, os mecanismos de ação de cada extrato, observando suas variações sazonais e definindo como eles afetam os micro-organismos.

7. PERSPECTIVAS

- Testar o extrato de *E. brasiliensis* em conjunto com outras substâncias como o clavulanato de potássio e comparar com outros antimicrobianos que utilizam a mesma associação como a amoxicilina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M. et al. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Ant. Ag. Chemoth.**, v.45, p.2054-2059, 2001.
- ABRANTES, J. A. Avaliação da atividade antimicrobiana e prospecção fitoquímica de *Eugenia Florida* DC. 2017. 97 f. Tese (Mestrado em Pesquisa, Gestão e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) – **Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, FIOCRUZ**, Rio de Janeiro.
- ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. R. The use of phenotypic tests for the research of carbapenamases in *enterobacteria*: a tool for clinical orientation. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.49, n.3, p. 240-244. 2017.
- ALI, K.M. et al. Cytotoxicity, Antimicrobial and Neuropharmacological evaluation of ethanolic extract of *Pistia stratiotes* L. **International Research Journal of Pharmacy**, v.2, n.2, p.82-92, 2011.
- ALO, M.N. et al. Antibacterial activity of water, ethanol and methanol extracts of *Ocimum gratissimum*, *Vernonia amygdalina* and *Aframomum melegueta*. **Advances in Applied Science Research**, v.3, n. 2, p.844-48, 2012
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ANTONIO, N. S. et al. Mecanismos de resistência bacteriana. **Revista Científica Electrónica de Medicina Veterinária**, n. 12, 2009.
- ARAÚJO, K.M. et al. Identification of Phenolic Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia Tirucalli* L.. **Antioxidants**, v.3, p.159-75, 2014.
- ASKARI, G.A. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Leaves of *Vitis vinifera* Collected from Different Regions in Morocco. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**. v.12, n.1, p.85-90, 2012.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.62, n.1, p. 55-61, 2003.
- BARBOSA, W. L. R. et al. Manual para Análise fitoquímica e Cromatografia de Extratos Vegetais. Belém: **UFPA**, 19 p., 2001.
- BENFATTI, C. S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp. frente a cepas de mollicutes. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 1, n. 2, p. 33-39, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas Integrativas e Complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. **Cadernos de atenção básica**. 2012. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2017.

BRASIL Ministério da Saúde - Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos - Boletim 03 - Uso Indiscriminado de Antimicrobianos e Resistência Microbiana. 2010. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=download&alias=1348-uso-indiscriminado-antimicrobianos-e-resistencia-microbiana-boletim-n-03-8&category_slug=uso-racional-medicamentos-685&Itemid=965> Acesso em: 10/01/2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf> Acesso em: 12 fev. 2017.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

CALOW, P. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In: HOFFMAN, D. et al. **Handbook in cytotoxicology**. Oxford: Blackwell Scientific Publication. v. 1. p. 1-5, 1993.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. Wayne, **Clinical and Laboratory Standards Institute**. 28th ed, 2018.

COCKERILL, F.R. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-fifth informational supplement. Wayne, Pa.: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical microbiology reviews**, v.12, n.4, p.564–82, 1999.

EVANS, W.C. Trease and Evan's Pharmacognosy. 14 ed. London: **WB Saunders Company**, 612p. 1996.

FERNANDES, A. T. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2000.

FERNANDES, M. C. et al. Surto de mastite bovina causada por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes aos antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, v. 61, n. 3, p. 745-748, 2009.

FISCHER, D. C. H. et al. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. **J Essent Oil Res**, v.17; p. 499 – 500, 2005.

FLECKNELL, P. Replacement, reduction and refinement. **ALTEX**, v. 19, n. 2, p. 73-78, 2002.

FRIGHETTO, N. et al. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra-corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, p. 338-343, 2005.

FRIGHETTO, N. et al. Purification of betulinic acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by high-speed counter-current chromatography. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 16, n. 6, p. 411-414, 2005.

FONSECA, F. C. S. et al. Análise por CLAE-DAD do ácido betulínico em extratos de *Zizyphus joazeiro* obtidos por diferentes métodos de extração. **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010.

FROTA, C. C.; CARVALHO, C. B. M.; MOREIRA, J. L. B. Visualização bacteriana e colorações. **Ceara: Imprensa Universitária**, 2015.

GEWEHR, R. B. et al. On traditional healing practices: subjectivity and objectivation in contemporary therapeutics. **Psicologia USP**, v. 28, n. 1, p. 33-43, 2017.

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

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

J.B.P.M.L. Nossa capa: Alexander Fleming e a descoberta da penicilina. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 5, p. I, 2009.

JUNIOR, L.A.S. Degradação de antibióticos de uso veterinário em reator de carbonização hidrotermal. 2015. 139f. Tese (Mestrado em Engenharia do Meio Ambiente) - **Escola de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Goiás**.

KHAN, M.A.A. et al. Cytotoxicity, antimicrobial and neuropharmacological, evolution of ethanolic extract of *Pistia stratiotes*. **International Research Journal of Pharmacy**, v.2, n.2, p.82- 92, 2011.

KUBDE, M.S. et al. In vitro antimicrobial activity of the crude extracts of *Colocasia esculenta* leaves (Araceae). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.1, n.8, p.88-91, 2010

- LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.
- MAGINA, M. A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **J. Nat Med.**, v.63, p. 345-350, 2009.
- MAGINA, M. A. et al. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Química Nova**, V. 35, N. 6, P. 1184-1188, 2012. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000600022>
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: **Edições UFC**, 1997.
- MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C.; SMITH, D. L. Simple Bench-Top Bioassays (Brine Shrimp and Potato Discs) for the Discovery of Plant Antitumor Compounds: Review of Recent Progress. In: KINGHORN, A. D.; BALANDRIN, M. F. (Eds.). **Human Medicinal Agents from Plants**. Washington, DC: American Chemical Society. v. 534, p. 112–137, 1993.
- MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug information journal**, v. 32, n. 2, p. 513-524, 1998.
- MENDES , et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.32, n. 1, p.121-125, 2011.
- MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.
- MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.316-320, 2005.
- MIGUES, H.V. Utilização dos métodos CLAE-DAD, UV e análise multivariada no controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos. 2018. 444 f. Tese (Doutorado em Química) – **Universidade Federal da Bahia**. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/28044/1/MIGUES%20VH.pdf> Acesso em: 22/05/2019
- MIRANDA, J. A. L. et al. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1142-1149, 2015.
- MOGHADDAM, M. G.; AHMAD, F. B. H.; SAMZADEH-KERMANI, A. Biological Activity of Betulinic Acid: A Review. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 3, n. 2, p. 119-123, 2012.
- MOON, J.S. et al. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.1176-1185, 2007.

MOREIRA, R. R. D. et al. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 11–19, 2002.

MOREIRA W.A.S. et al. Variação no tempo de eclosão dos cistos de *Artemia salina* e teste de toxicidade dos constituintes de *Spathelia excelsa*. **Biofar, Revista de Biologia e Farmácia**. v. 09, n.3, 2013 disponível em:

<<https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/123/4659/1/variacao.pdf>> Acessado em: 30/03/2019.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L.F.S. Bacteriologia. IN: AMENDOEIRA et al. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratório de Saúde. v. 4, p. 221-397, 2010.

OLIVEIRA, A.C.; ALBUQUERQUE, A.P.; ROCHA, L.C.M. Infecções Hospitalares: Abordagem, prevenção e controle. **MEDSI**, 1998, 466p.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–7, 2008.

PANDE Y, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 5, 2014.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. v. 8, n.5, p. 395-400, 2001.

PIMENTA, L.P.S. et al. Biological screening of *Annonaceous* Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**. v. 10, n. 2-3, p. 209-12, 2003.

PROLAB. Como preparar um meio de cultura para bactérias e fungos, 2014. Disponível em: <<http://www.prolab.com.br/blog/como-preparar-um-meio-de-cultura-para-bacterias-e-fungos/>>. Acesso em: 03 mai. 2018.

QUEIROZ, J. M. G. et al. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista Fitos Eletrônica**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 87-100, 2015. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/228>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

QUIROS-ROLDAN, E.; AIROLDI, M.; MORETTI, F.; CAROSI, G.. Bases moleculares de resistência de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev Diagn Biol.**, vol.50, n.4, pp.200-203, 2001. Disponível em: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-79732001000400006&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 10/01/2018.

- RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.23, n.1, p.20, 2015.
- REIS, M. C. P. et al. Experiência na implantação do Programa de Fitoterapia do Município do Rio de Janeiro. **Divulgação saúde debate**, n. 30, p. 42–49, 2004.
- ROCHA, J.A. Variabilidade Genética e Avaliação Antibacteriana e Anti-Schistosoma dos alcaloides Pilosina, Epiisopilosina, Isopilosina e Macaubina de Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardlew.). 2013. 146p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Biotecnologia). **Universidade Federal do Piauí**, Parnaíba, 2013.
- RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.
- RODRIGUES, T. S. et al. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, p. 587-590, 2011.
- ROY, S. et al. *In Vitro* antibacterial activity of *Alocasia decipiens* Schott. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, n.1, p.155-57, 2013.
- SANTOS, M. Á. S. Isolamento e síntese de derivados de ácidos triterpênicos e esteroides e avaliação da ação de inibição de proteases, **PPGQUIM - UFBA** (2011).
- SIEBERT, D. A. et al. Evaluation of seasonal chemical composition, antibacterial, antioxidant and anticholinesterase activity of essential oil from *Eugenia brasiliensis* Lam. **Natural Product Research**, v. 29, n. 3, p. 289-292, 2015.
- SILVA, F.A.; BIZERRA, A.M.C.; FERNANDES, P.R.D. Testes fitoquímicos em extratos orgânicos de *Bixa orellana* L (Urucum). **HOLOS**, 34, v.2, 484-498, 2018.
- SILVA, J.V.S. et al. Uma revisão bibliográfica sobre Araceae com foco nos gêneros *Pistia*, *Philodendron* e *Montrichardia*: aspectos botânicos, fitoquímicos e atividades biológicas. **Revista Fitos**, v.8, n.2, p. 73- 160, 2013.
- SILVA, C. H. P. DE M. E. Bacteriologia: um texto ilustrado. Teresópolis: **Editora Eventos**, 1999.
- SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brasília, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**. vol.29, n.4, p.844-855, 2006.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, 2002.

SINITOX, Casos, Óbitos e Letalidade de Intoxicação Humana por Agente e por Região. Brasil, 2016. Disponível em: <https://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Brasil10_0.pdf>. Acesso em 04/05/18.

SIQUEIRA J.M.; BOMM M.D.; PEREIRA N.F.G.; GARCEZ W.S.; BOAVENTURA M.A.D. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Atemia salina* Leach. **Revista Química Nova**, v.21, n.5. 1998.

SOUZA, M.; REIS, C.; PIMENTA, F. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista De Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v.34, n.1, 2007.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133-1148, 2009.

TAIZ L.; ZEIGER E. Fisiologia Vegetal. 3a ed. Rio de Janeiro. **Artmed**. 720p. 2004.

TORRES, V.R.N. Avaliação fitoquímica, citotóxica e farmacológica de *Calea uniflora* less. 2014. 81f. Tese (Mestrado em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. Criciúma.

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

WILLIAMS, J. D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **International journal of antimicrobial agents**, v. 12, p. S3-S7, 1999.

W H O. Traditional medicine strategy: 2014-2023. p.76, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/>. Acesso em: 12 fev. 2017.

W H O. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 jun. 2017.

ZIMBRO, M. J. et al., DIFCO™ & BBL™ MANUAL. Manual of Microbiological Culture Media. Ed., United States of America, 679 p., 2003