

Jaime Antonio Abrantes

**Avaliação de atividade antimicrobiana e prospecção  
fitoquímica de *Eugenia florida* DC.**

Rio de Janeiro

2017

Jaime Antonio Abrantes

**Avaliação de atividade antimicrobiana e prospecção fitoquímica de  
*Eugenia florida* DC.**

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 – FIOCRUZ.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joseli Maria da Rocha Nogueira

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Martins de Carvalho

Rio de Janeiro

2017

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Medicamentos e Fitomedicamentos/ Farmanguinhos / FIOCRUZ - RJ

A158a Abrantes, Jaime Antonio

Avaliação de atividade antimicrobiana e prospecção fitoquímica de  
Eugenia florida DC. / Jaime Antonio Abrantes. – Rio de Janeiro, 2017.

xi, 99 f. : il. ; 30 cm.

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

Dissertação (mestrado) – Instituto de Tecnologia em Fármacos-  
Farmanguinhos, Pós-graduação em Gestão, Pesquisa e  
Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica, 2017.

Bibliografia: f. 87-99

1. Bioatividade. 2. Bactérias. 3. Antimicrobianos. 4. Prospecção  
Fitoquímica. I. Título.

CDD 615.1

Jaime Antonio Abrantes

**Avaliação de atividade antimicrobiana e prospecção fitoquímica de  
*Eugenia florida* DC.**

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 – FIOCRUZ.

Aprovada em 16 de fevereiro de 2017

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Joseli Maria da Rocha Nogueira  
Escola Nacional de Saúde Pública – FIOCRUZ  
(Presidente da Banca)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Borges dos Santos Dias  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Garcia Costa  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cláudia Regina Brandão Gomes  
Instituto de Tecnologia em Fármacos - FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2017

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus dois amores, minha esposa Luana e meu filho Victor Hugo, por tanta compreensão e apoio em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, pelo sopro divino da vida e pela oportunidade dada a cada dia de vivê-la junto às pessoas que amo.

À minha esposa Luana, que me deu incentivo nas horas em que esmorecia e foi minha companheira em tempo integral nesta jornada.

Ao meu filho Victor Hugo, por cada sorriso e abraço sem nenhuma cobrança, mesmo com a ausência de seu pai em alguns momentos.

Ao meu pai Walzir, mesmo em memória, por me deixar tesouros valiosos, como caráter, honestidade e responsabilidade.

À minha orientadora e amiga, Dra. Joseli Nogueira, por acreditar no meu potencial e compartilhar esta jornada comigo.

À minha coorientadora e amiga, Dra. Érika Carvalho, por me ensinar coisas novas e por me ajudar neste projeto.

À minha turma do Mestrado, principalmente aos de P & D, Rafaella Silva, Jovana Rosas, Rayane Natashe, Juliana Soares e particularmente ao Paulo Victor de Souza por toda ajuda prestada ao longo desta jornada do início ao fim do trabalho.

À minha chefe e amiga, Dra. Ângela Dantas, por permitir que eu me aperfeiçoasse e pelo apoio.

Ao meu amigo, padrinho e microbiologista, Dr. Juarez Corrêa, pela inspiração e por me fazer descobrir o meu caminho profissional.

À minha amiga e colega de trabalho, Francisca Ribeiro, pelo apoio diário.

Aos amigos do laboratório do DCB – ENSP, Ary, Raquel, Licurgo e Mariza pelo apoio e recepção de vocês.

Aos amigos do DCB - ENSP que adquiri pelo caminho, Paula, Fernanda e Shênia pelo carinho.

À Ivone, do laboratório de Produtos Naturais, pela ajuda e pelas boas risadas.

À July, amiga colombiana de Farmanguinhos, por sempre ser solícita e pelo companheirismo.

Aos funcionários de Farmanguinhos que conviveram direta ou indiretamente comigo e auxiliaram em meu trabalho.

À Thaís Hidalgo de Almeida, bióloga do Jardim Botânico, por me acompanhar e ajudar na coleta do material vegetal, assim como a própria instituição.

Ao laboratório de mutagênese da UERJ, Dr. Israel Felzenszwalb e ao futuro Dr. Carlos Fernando Araújo-Lima, que colaboraram com este trabalho e o enriqueceram ainda mais.

À Júlia Queiroz, pela ajuda inicial e diversas orientações sobre o tema.

À coordenação do curso de Mestrado pela estrutura oferecida.

Aos membros banca da Qualificação pelas orientações e dicas importantes.

Aos membros banca da Defesa pela colaboração prestada e por aumentar a qualidade do trabalho.

Aos professores que ministraram todas as disciplinas do mestrado, entre eles, Maria Raquel, Ana Cláudia, Raquel Elisa, Paulo Bergo, Maria Antonieta, Cláudia Brandão, entre outros, pelo conhecimento.

Ao professor Helvécio Vinícius, que demonstrou que qualquer pessoa pode aprender sobre o assunto mais difícil, desde que haja alguém capacitado para ensinar.

À professora Mariana que participou de todo o processo de crescimento deste projeto desde o processo seletivo.

À amiga e colega de trabalho, Dra. Cristiane Lamas pelas colaborações em trabalhos científicos e incentivo.

Aos amigos e colegas do Instituto Nacional de Cardiologia pelas palavras de apoio nesses últimos dois anos.

A todos que de alguma forma participaram ou contribuíram para o sucesso deste trabalho e não foram citados nominalmente neste momento.

“Um pedaço de jade não pode se tornar um objeto de arte sem ser cinzelado. Uma pessoa não pode conhecer os grandes princípios sem a educação.”

*Confúcio*



## RESUMO

ABRANTES, Jaime Antonio. Avaliação de atividade antimicrobiana e prospecção fitoquímica de *Eugenia florida* DC. 2017. 97f. Dissertação Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

As plantas medicinais sempre foram utilizadas amplamente para diversos fins terapêuticos durante toda a história da humanidade, principalmente para tratamento de infecções causadas por bactérias e fungos. As plantas podem apresentar bioatividade contra diversos micro-organismos, até mesmo os que apresentam maior resistência aos antimicrobianos de eleição. Todavia ainda há poucos estudos brasileiros nessa área. Com base nestas afirmativas, nosso objetivo principal foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de folhas de *Eugenia florida* DC., frente a diversas cepas ATCC padrão, bacterianas e de leveduras. A prospecção fitoquímica, a pesquisa de toxicidade e do potencial mutagênico dos extratos obtidos foram partes integrantes do escopo do trabalho, para garantir a eficácia, segurança e eficiência do uso desta planta medicinal pela população. As folhas saudáveis foram coletadas e processadas de modo a obter o extrato bruto em uma solução aquosa de etanol a 50%, com intuito de simular as preparações realizadas na cultura popular. Para a avaliação da atividade antimicrobiana utilizamos os métodos de diluição em placa, difusão em disco e microdiluição em caldo. A técnica de diluição em ágar foi utilizada inicialmente, como um *screening* da atividade antimicrobiana e já a microdiluição em caldo foi realizada a fim de obter a Concentração Inibitória Mínima do extrato para cada cepa testada. As cepas mais sensíveis ao extrato bruto foram submetidas aos testes em frações do extrato, obtidas por partição líquido-líquido em solventes de polaridade diferentes. Na prospecção fitoquímica, os testes apontaram a presença de triterpenoides, saponinas e taninos no extrato bruto. Para a avaliação da toxicidade e mutagenicidade foram realizados os testes de *Artemia salina* e Ames respectivamente, os quais mostraram que os extratos brutos apresentaram baixa toxicidade e baixa mutagenicidade. As bactérias Gram positivas apresentaram maior sensibilidade ao extrato de *Eugenia florida*, principalmente as do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* com CIM em torno de 0,25 a 0,5 mg/mL. Estas mesmas cepas apresentaram sensibilidade frente frações de diclorometano e acetato de etila, entretanto no extrato bruto foi obtida maior atividade antimicrobiana. Fato que pode ter como explicação o sinergismo entre os compostos presentes no extrato bruto. Estes resultados promissores favorecerem estudos futuros com bactérias multirresistentes, e o desenvolvimento de um fitoterápico ou fitomedicamento, levando em consideração o desafio da terapêutica antimicrobiana no Brasil e no mundo.

Palavras-chave: bioatividade, bactérias, antimicrobianos, prospecção fitoquímica.

## ABSTRACT

Medicinal plants have always been used extensively for various therapeutic purposes throughout the history of mankind, mainly for the treatment of bacterial and fungal infections. The plants may have bioactivity against several microorganisms, even those that present greater resistance to the antimicrobial of choice. However, there are still few Brazilian studies in this area. Based on these assertions, our main objective was to evaluate the antimicrobial activity of leaf extracts of *Eugenia florida* DC., Against several strains ATCC standard, bacterial and yeast. Phytochemical prospecting, toxicity research and the mutagenic potential of the extracts obtained were integral parts of the scope of work to ensure the efficacy, safety and efficiency of the use of this medicinal plant by the population. Healthy leaves were collected and processed to obtain the crude extract in a 50% aqueous solution of ethanol, in order to simulate the preparations made in the popular culture. For the evaluation of the antimicrobial activity we used the methods of plate dilution, disc diffusion and microdilution in broth. The agar dilution technique was used initially as a screening of the antimicrobial activity and already the microdilution in broth was carried out in order to obtain the Minimum Inhibitory Concentration of the extract for each strain tested. The strains more sensitive to the crude extract were submitted to the tests in fractions of the extract, obtained by liquid-liquid partition in solvents of different polarity. In the phytochemical prospection, the tests indicated the presence of triterpenoids, saponins and tannins in the crude extract. To evaluate the toxicity and mutagenicity tests were performed of *Artemia salina* and Ames respectively, which showed that the crude extracts presented low toxicity and low mutagenicity. The Gram positive bacteria presented greater sensitivity to *Eugenia florida* extract, especially those of the genus *Staphylococcus* and *Streptococcus* with MIC around 0.25 to 0.5 mg/mL. These same strains presented sensitivity against fractions of dichloromethane and ethyl acetate, however in the crude extract a higher antimicrobial activity was obtained. This fact can explain the synergism between the compounds present in the crude extract. These promising results favor future studies with multiresistant bacteria, and the development of a phytotherapeutic or phytomedicine, taking into account the challenge of antimicrobial therapy in Brazil and in the world.

Key words: bioactivity, bacteria, antimicrobials, phytochemical prospecting.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 –</b>	Estrutura química da teixobactina.....	30
<b>FIGURA 2 –</b>	Planta <i>Eugenia florida</i> DC.- A) árvore, B) folhas, C) flores e D) frutos.....	37
<b>FIGURA 3 –</b>	Rotaevaporador utilizado.....	45
<b>FIGURA 4 –</b>	Placas contendo o extrato fundido ao meio em concentrações diferentes.....	50
<b>FIGURA 5 –</b>	Cuba com a placa em eluição na CCD.....	54
<b>FIGURA 6 –</b>	Larvas de <i>Artemia salina</i> Leach.....	56
<b>FIGURA 7 –</b>	Meio fundido com extrato apresentando: A) crescimento bacteriano e B) controle negativo.....	62
<b>FIGURA 8 –</b>	Placa de microdiluição do extrato bruto de <i>E.florida</i> nas cepas Gram positivas.....	69
<b>FIGURA 9 –</b>	Placa com a microdiluição do extrato bruto de <i>E.florida</i> nas cepas Gram negativas.....	70
<b>FIGURA 10 –</b>	Placa com a microdiluição do extrato bruto de <i>E.florida</i> nas cepas de leveduras.....	71
<b>FIGURA 11 –</b>	Testes positivos para triterpenoides em A e saponinas em B..	75
<b>FIGURA 12 –</b>	Teste negativo para alcaloides.....	76
<b>FIGURA 13 –</b>	Teste positivo para taninos em A e negativo para flavonoides em B.....	76
<b>FIGURA 14 –</b>	Diluições para o teste de <i>Artemia salina</i> .....	80
<b>FIGURA 15 –</b>	Larvas de <i>Artemia</i> no extrato de <i>E. florida</i> .....	81
<b>FIGURA 16 –</b>	Crescimento de colônias revertentes no controle negativo, controle positivo e amostra respectivamente.....	83

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>QUADRO 1</b> – Plantas medicinais: nome popular, nomenclatura científica e indicação de uso.....	18
<b>TABELA 1</b> – Dados de coleta de <i>Eugenia florida</i> DC.....	44
<b>TABELA 2</b> – Dados de Registro de <i>Eugenia florida</i> DC. em herbário e localização.....	44
<b>TABELA 3</b> – Peso e rendimento durante os processos de prospecção..	45
<b>TABELA 4</b> – Características a serem observadas na checagem de fenótipos das cepas de <i>S. enterica</i> sorovar Typhimurium...	57
<b>TABELA 5</b> – Controles positivos utilizados no Teste de Ames e na checagem de fenótipos.....	59
<b>TABELA 6</b> – Crescimento das cepas em concentrações diferentes do extrato bruto de <i>Eugenia florida</i> por diluição em ágar.....	63
<b>TABELA 7</b> – CIM do extrato de <i>E.florida</i> frente às cepas, usado a técnica de diluição em ágar.....	64
<b>TABELA 8</b> – CIM do extrato de <i>E.florida</i> frente às cepas testadas por microdiluição.....	67
<b>TABELA 9</b> – Comparação entre os valores obtidos entre as duas metodologias empregadas.....	72
<b>TABELA 10</b> – CIM das frações e extrato bruto de <i>E. florida</i> DC. em mg/mL.....	74
<b>TABELA 11</b> – Resultado dos testes de prospecção fitoquímica.....	77
<b>TABELA 12</b> – Concentração do extrato e DL <sub>50</sub> .....	80
<b>TABELA 13</b> – Resultado do ensaio <i>Salmonella</i> / microssoma após co-incubação com o extrato de <i>Eugenia florida</i> .....	82

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**AcOEt** – Acetato de Etila

**ATCC** - American Type Culture Collection

**n-BuOH** - Butanol

**CCD** - Cromatografia em Camada Delgada

**CG-EM** - Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas

**CLAE** - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**CBM** - Concentração Bactericida Mínima

**DCM** – Diclorometano

**EB** – Extrato Bruto

**ESBL** - *Beta*-lactamase de amplo espectro do inglês *Extended Spectrum Beta-lactamase*

**Hex** - Hexano

**JBRJ** - Jardim Botânico do Rio de Janeiro

**KPC** - *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase do inglês *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*

**MRSA** - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina do inglês *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*

**PBPs** - Proteínas Ligadoras da Penicilina do inglês *Penicillin Binding Proteins*

**RMN** - Ressonância Magnética Nuclear

**SUS** - Sistema Único de Saúde

**UFC** - Unidade Formadora de Colônia

**TSA** - Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

**VRE** - Enterococo Resistente à Vancomicina do *Vancomycin Resistant Enterococcus*

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
<b>1.1.</b>	<b>Plantas medicinais</b> .....	17
<u>1.1.1.</u>	<u>Histórico do uso de plantas medicinais</u> .....	19
<u>1.1.2.</u>	<u>Legislação em fitoterapia</u> .....	22
<b>1.2.</b>	<b>Infecções microbianas</b> .....	23
<u>1.2.1.</u>	<u>Principais classes de antimicrobianos</u> .....	26
<u>1.2.2.</u>	<u>Mecanismos de resistência bacteriana</u> .....	28
<b>1.3.</b>	<b>Atividade antimicrobiana de produtos naturais</b> .....	30
<u>1.3.1.</u>	<u>Atividade antimicrobiana da família Myrtaceae</u> .....	35
<u>1.3.1.1</u>	<u><i>Eugenia florida</i> DC.</u> .....	36
<b>1.4.</b>	<b>Toxicidade e mutagenicidade de produtos naturais</b> .....	37
<u>1.4.1</u>	<u>Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i></u> .....	37
<u>1.4.2</u>	<u>Teste de Ames e avaliação da mutagenicidade</u> .....	38
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	41
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
<b>3.1.</b>	<b>Objetivos gerais</b> .....	42
<b>3.2.</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	42
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
<b>4.1.</b>	<b>Métodos gerais</b> .....	43
<u>4.1.1.</u>	<u>Obtenção dos extratos e frações</u> .....	43
<u>4.1.1.1.</u>	<u>Material vegetal</u> .....	43
<u>4.1.1.2.</u>	<u>Obtenção dos extratos</u> .....	44
<u>4.1.1.3.</u>	<u>Obtenção das frações de <i>Eugenia florida</i></u> .....	46
<u>4.1.2.</u>	<u>Preparo do meio de cultura</u> .....	46
<u>4.1.3.</u>	<u>Ensaio biológicos</u> .....	46
<u>4.1.3.1.</u>	<u>Micro-organismos avaliados</u> .....	47
<u>4.1.3.2.</u>	<u>Preparo do inóculo e padronização</u> .....	48
<u>4.1.3.3.</u>	<u>Método de diluição em ágar Mueller Hinton com extrato</u> .....	49
<u>4.1.3.4.</u>	<u>Método de difusão em disco</u> .....	50
<u>4.1.3.5.</u>	<u>Método de microdiluição em caldo</u> .....	51
<u>4.1.4.</u>	<u>Agentes antimicrobianos</u> .....	52
<u>4.1.5.</u>	<u>Prospecção fitoquímica qualitativa</u> .....	52
<u>4.1.5.1.</u>	<u>Testes de identificação</u> .....	52
<u>4.1.6.</u>	<u>Cromatografia em camada delgada (CCD)</u> .....	54
<u>4.1.7</u>	<u>Ensaio de toxicidade e mutagenicidade</u> .....	55
<u>4.1.7.1.</u>	<u>Teste com <i>Artemia salina</i> Leach</u> .....	55
<u>4.1.7.2</u>	<u>Teste de AMES</u> .....	56
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>5.1.</b>	<b>Avaliação da atividade biológica</b> .....	62
<u>5.1.1.</u>	<u>Diluição em ágar</u> .....	62
<u>5.1.2.</u>	<u>Difusão em disco</u> .....	66

<u>5.1.3.</u>	<u>Microdiluição em caldo.....</u>	65
<u>5.1.4.</u>	<u>Comparação entre a diluição em ágar e a microdiluição.....</u>	71
<u>5.1.5.</u>	<u>Atividade antimicrobiana das frações obtidas.....</u>	74
<b>5.2.</b>	<b>Ensaio de prospecção fitoquímica de <i>Eugenia florida</i> DC.....</b>	75
<u>5.2.1.</u>	<u>Testes de identificação.....</u>	75
<u>5.2.2.</u>	<u>Separação das classes por CCD.....</u>	77
<b>5.3.</b>	<b>Avaliação da atividade citotóxica pelo teste de letalidade contra <i>Artemia salina</i>.....</b>	79
<b>5.4.</b>	<b>Teste de AMES.....</b>	82
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	85
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	86
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	87

## INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas e fúngicas, em um âmbito geral, são consideradas um grande problema de Saúde Pública em todo o mundo e afetam milhões de pessoas (PADOVEZE & FORTALEZA, 2014). Para tratamento destas, é necessário lançar mão de terapias antimicrobianas, onde os fármacos têm a função de eliminar os micro-organismos causadores e ao mesmo tempo preservar a saúde do indivíduo acometido (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Na atualidade, os pesquisadores são desafiados à busca de um antimicrobiano eficaz e seguro, pois de nada adianta tratar uma infecção e causar alguma outra patologia por intoxicação, ou então não agir de maneira desejável devido à resistência do micro-organismo (BRASIL, 2012).

Encontrar um equilíbrio entre estes fatores torna-se muito difícil, já que com o passar dos anos, desde a descoberta dos primeiros antimicrobianos, a resistência de micro-organismos têm aumentado em um ritmo bem mais acelerado do que a descoberta de novos fármacos para este fim (BAQUERO & BLAZQUEZ, 1997).

Surge então o aumento da necessidade de terapias alternativas como, por exemplo, a utilização de plantas para o tratamento de infecções, já que as mesmas apresentam um grande potencial para este tipo de emprego (CRUZ, 2013).

As plantas medicinais são de uso tradicional em todo o mundo e principalmente no Brasil, que abriga uma grande parte da biodiversidade mundial. Em nosso país fatores socioeconômicos também obrigam a população muitas vezes, a utilizar tais plantas, por apresentarem baixo custo (DUARTE, 2006).

A partir do conhecimento empírico, observado pelo uso tradicional, a comunidade científica começou a pesquisar os efeitos das plantas medicinais através dos extratos, com estudos de bioatividade, na tentativa de identificação das substâncias e princípios ativos presentes (ARAÚJO, 2011; AYRES *et al.*, 2008; COSTA, 2015). Atrelado a estes estudos somam-se as preocupações com a ação farmacológica e efeitos adversos, necessitando então de pesquisas mais aprofundadas, como por exemplo, ensaios de toxicidade (BRITO; SILVA; FIGUEIRA, 2012; CAVALCANTI FILHO, 2014; MOREIRA *et al.*, 2002).



Estudos com diversas espécies de plantas, inclusive as do gênero *Eugenia*, apontam a sua atividade antimicrobiana antifúngica, além de efeitos anti-inflamatório e antioxidante (GRANGEIRO *et al.*, 2006; LEITE *et al.*, 2010; SERRANO *et al.*, 2011). Esta atividade varia com a sazonalidade, condições de plantio e estresse da planta, fazendo que ela produza mais ou menos metabólitos secundários, que são as substâncias químicas de interesse (GOBBO NETO & LOPES, 2007). Já o isolamento destas substâncias depende da metodologia empregada, desde a coleta do espécime vegetal até a preparação do extrato, o solvente utilizado e o tempo de extração (ARAUJO *et al.*, 2011; OSTROSKY *et al.*, 2008).

Os parâmetros são diversos e as variantes aumentam a discrepância entre os resultados obtidos, necessitando assim de estudos sistemáticos e padronizados na área (OSTROSKY *et al.*, 2008; VALGAS *et al.*, 2007). Além das não conformidades, oriundas dos diferentes métodos de obtenção dos metabólitos secundários, as diferentes técnicas de pesquisa da atividade antimicrobiana, que variam o meio de crescimento, concentração do inóculo bacteriano e de extrato empregado, agravam este quadro (DE LIMA *et al.*, 2011).

A prospecção fitoquímica qualitativa exige diferentes reagentes para a detecção das substâncias relacionadas à determinada atividade, assim como nos testes de atividade biológica. Por conta deste fator, existe a possibilidade de dúvidas com relação à presença de tais metabólitos no produto avaliado (LÔBO *et al.*, 2010).

Hoje, além da prospecção fitoquímica outras técnicas mais avançadas são utilizadas para caracterização das substâncias ativas presentes nos extratos naturais como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Após a identificação da substância responsável pela bioatividade é possível caso haja interesse e viabilidade, sintetizar este novo composto para ser utilizado como um fármaco. No entanto, o processo é lento e esbarra nos entraves legislativos (BRAGA *et al.*, 2003; DE QUEIROZ *et al.*, 2015; QUEIROZ & HOSTETTMANN, 2013).

Dentre as várias espécies da biodiversidade brasileira, o uso do gênero *Eugenia* na medicina popular e das pesquisas de atividade antimicrobiana descritas

na literatura, foi decisivo para a escolha da espécie *Eugenia florida* para este trabalho. Cabe ressaltar que apesar de relatos de comunidades relatarem o uso das folhas de *Eugenia florida* para tratamento de diversas enfermidades como a diarreia, poucos estudos a este respeito estão relatados na literatura e, portanto esta espécie apresenta um grande potencial a ser explorado (ALMEIDA; FARIA; SILVA, 2012; COSTA, 2015; DE QUEIROZ *et al.*, 2015).

Para uso seguro e eficaz *Eugenia florida* pela população brasileira é crucial um estudo completo e interdisciplinar englobando as áreas correlatas, como a biológica, química e farmacológica (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

## **1. REVISÃO DA LITERATURA**

### **1.1. Plantas medicinais**

A utilização de plantas medicinais é de conhecimento popular e difundida pelo mundo inteiro, devido ao baixo custo e fácil manipulação (SANTOS, 2010). Segundo Lamarca e colaboradores (2013), através das gerações, o uso dos recursos naturais de maneira empírica, garantiu um acervo que agrega às tradições culturais.

As plantas medicinais, de acordo com Di Stasi (1995) podem ser utilizadas de variadas formas e preparações, como chás, garrafadas, óleos, entre outras, sendo chamadas de fitoterápicos. Tal denominação é usada quando não há isolamento e purificação dos seus compostos vegetais ativos, pois caso haja esta prática, serão denominados fitofármacos. Estes, por sua vez, apresentam estrutura química e ação farmacológica definida (DEVIIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

Os povos da antiguidade, como os egípcios e chineses, foram pioneiros no uso e registro da atividade de plantas na cura de doenças. As mesmas eram catalogadas de acordo com suas características e a elas eram atribuídos poderes mágicos ao invés de medicinais (ALMEIDA, 1993). Além do uso popular, as propriedades medicinais são comprovadas por pesquisas científicas, e apesar do grande potencial deste material, somente 8% da biodiversidade vegetal foi estudada em relação à compostos bioativos e apenas 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (BRASIL, 2006).

Hoje as plantas medicinais são amplamente empregadas principalmente pela população brasileira de baixa renda e localizada longe dos grandes centros urbanos em especial as populações ribeirinhas do Norte do país. Plantas como capim-rei, hortelã-pimenta e ruibarbo do brejo são exemplos utilizados por eles para tratar diversas doenças como indigestão e reumatismos (MATSUCHITA & MATSUCHITA, 2015). No quadro 1, apresentamos alguns exemplos do uso popular de plantas medicinais, uma prática, como já citada, muito difundida em nosso país.

<b>Nome popular/ espécie</b>	<b>Indicações</b>
<b>Boldo-de- Jardim / <i>Plectranthus barbatus Andrews</i></b>	Azia, dispepsias, mal estar gástrico, ressaca, gastrite, estimulante da digestão e do apetite
<b>Camomila / <i>Chamomilla recutita (L.)</i></b>	Digestivo, sedativo, eliminação de gases, combater cólicas, estimula o apetite, cicatrizante e anti-inflamatório
<b>Capim Limão / <i>Cymbopogon citratus (DC.)</i></b>	Calmante, cólicas uterinas e intestinais e nervosismo
<b>Carqueja / <i>Bacchais trimera (Less.)</i></b>	Esterilidade feminina, impotência masculina, problemas hepáticos, disfunções estomacais e intestinais
<b>Chá Verde / <i>Camellia sinensis (L.) Kuntze</i></b>	Problemas da pele, anti-cárie, antialérgica, anti-úlceras, diminui o colesterol do sangue
<b>Erva-Cidreira / <i>Melissa officinalis L.</i></b>	Calmante, dispepsia, gripe, bronquite crônica, cefaleias, enxaqueca, dores de origem reumática, normaliza as funções gastrointestinais
<b>Erva-Doce / <i>Foeniculum vulgare Mill.</i></b>	Problemas digestivos, eliminar, combater cólicas e estimular a lactação
<b>Hortelã / <i>Mentha spicata L.</i></b>	Antidispéptica, anti-hemética, descongestionante nasal, antigripal, resfriado comum, tosse, bronquite, febre, calafrios, inflamações na boca e faringe e dores
<b>Louro / <i>Laurus nobilis L.</i></b>	Estimulante do apetite e da digestão, antisséptica, dispepsia, anorexia, flatulência, cólicas, astenia, reumatismo, mau cheiro dos pés, fungos dos pés, parasitos e suor
<b>Saião / <i>Kalanchoe brasiliensis Cambess</i></b>	Furúnculos, tosse, gastrite

**QUADRO 1** – Plantas medicinais: nome popular, nomenclatura científica e indicação de uso. Adaptado de Pantoja e Neves (2014).

A presença de uma das maiores biodiversidades do mundo contribui sobremaneira para que o Brasil tenha um alto consumo de plantas medicinais, somando-se também ao fato de que os medicamentos, além de onerosos, são de difícil acesso por grande parte da população (SANTOS, 2010).

### 1.1.1. Histórico do uso de plantas medicinais

A origem da ciência da utilização de plantas medicinais tem diversas raízes, já que o homem sempre empregou o que a natureza proporcionava para prevenir e curar suas moléstias. Muitos povos, do mundo inteiro, utilizaram plantas medicinais durante a História (GRIGGS, 1996).

Diversas são as referências na literatura que indicam que o homem pré-histórico já tirava proveito das plantas para a cura de suas enfermidades e conforme observava os animais constatava que, muitas plantas serviam para fins alimentícios e outras eram tóxicas. Os animais, através de seu instinto, distinguiam as plantas para fins medicinais das tóxicas, auxiliando os humanos a decidir qual sua utilização (ALONSO, 1998).

Várias expedições arqueológicas evidenciaram o uso de plantas medicinais, por meio de representações gráficas, onde o corpo humano era relacionando com plantas. Tais desenhos se localizavam em cavernas do período paleolítico superior, na época do homem de Neandertal (GRIGGS, 1996).

Segundo Alonso (1998), o conhecimento sobre plantas medicinais foi transmitido através dos tempos, entre as gerações, baseado nas experiências e por este motivo, pode-se considerar a fitoterapia como a medicina mais remota. As plantas já estiveram presentes em rituais místicos e religiosos por seus efeitos alucinógenos, considerados atributos mágicos, com a possibilidade até do contato com ancestrais e deuses.

Alguns sacerdotes possuíam também a ciência dos atributos medicinais das plantas, que era transmitida a seus aprendizes e chegaram aos dias de hoje de uma

maneira empírica, embora provavelmente muitas plantas ainda sejam apenas conhecidas por remotas tribos, que vivem em florestas, e desertos. Pesquisadores reconhecem que o registro mais antigo do conhecimento sobre plantas medicinais pelo meio da escrita é relatado por volta de 4000 anos antes de Cristo (a.C.), evidenciado pelos arqueólogos nas ruínas de Nippur, onde uma tábua de barro grafada com caracteres cuneiformes, mencionava entre outras plantas o *Ficus carica* e o *Thymus vulgaris*, as duas empregadas inclusive atualmente, como laxante e expectorante respectivamente (ALONSO, 1998).

Na Babilônia, há menção em antigos documentos sobre diversas plantas curativas como *Mentha viridis*, utilizadas como estimulante digestivo e a *Glycyrrhiza glabra*, conhecida como alcaçuz e utilizada como antitussígeno (GRIGGS, 1996).

A China, um dos países mais ricos e tradicionais no uso de plantas medicinais, possui uma obra datada de 2800 a.C., onde há relato de 360 espécies, incluindo *Ephedra sinica*, conhecida atualmente como fonte de efedrina para fins medicinais (ELDIN & DUNFORD, 2001).

Não só os chineses, mas outros povos são tradicionais no uso de tais vegetais, como por exemplo, os Sumérios e Assírios que também utilizavam as plantas para fim medicinal, e os egípcios que faziam seu uso desde 2000 a.C. Existem diversos relatos na literatura que o povo egípcio utilizava plantas para fim contraceptivo, como por exemplo o uso de espigas de acácia seca, que possuem uma seiva que ao diluir forma ácido láctico, o qual é empregado até o presente em muitas fórmulas de contraceptivos modernos (ALONSO, 1998).

Na Índia foram descobertos escritos sobre o uso de plantas medicinais datados de 1000 anos a.C.. Na Grécia, a personagem mais respeitável da história da medicina, Hipócrates (468- 377 a.C.) idealizou um regime de terapêutica à base de plantas medicinais, exercícios e dietas, utilizando um total de 400 espécies (ELDIN & DUNFORD, 2001). Hipócrates utilizava, por exemplo, tomilho (*Thymus vulgaris*), hisopo (*Hyssopus officinalis*) e também bardana (*Arctium Lappa*), dependendo da moléstia a ser tratada (ELDIN & DUNFORD, 2001; ALONSO, 1998).

Já no séc. I depois de Cristo (d.C.) um médico grego da armada romana de Nero, Pedânio Discórides, reuniu informações em um guia fitoterápico, apontando os

atributos de todas as plantas medicinais conhecidas e como empregá-las. (ELDIN & DUNFORD, 2001; GRIGGS, 1996). Neste guia são encontradas referências que ainda são atuais, como a ação diurética da salsa (*Petroselinum sativum*) e a estimulação láctea na lactante pelo funcho (*Foeniculum vulgare*) (ALONSO, 1998).

No século II d.C., podemos citar Galeno como um dos maiores nomes da fitoterapia, foi médico dos gladiadores e a seguir dos imperadores romanos. Sua medicina tinha como base a correção dos humores (ALONSO, 1998). Deve-se a ele, o fato de combinar distintas ervas, fato que posteriormente nominou as fórmulas galênicas. (ELDIN & DUNFORD, 2001).

O desenvolvimento da arte de curar ganhou, no século XVI, grande investida dos alquimistas, sendo o mais conhecido entre eles Paracelso, que trazia interesse particular pela química de plantas medicinais. Logo após sua morte, a fitoterapia entrou em declínio com a vinda da medicina contemporânea, que começava a empregar substâncias empolgantes e ao mesmo tempo perigosas, como o mercúrio e o arsênio (ALONSO, 1998, ELDIN & DUNFORD, 2001).

Em princípios do século XX, a indústria farmacêutica embarca no apogeu, por meio do surgimento da aspirina e dos antibióticos, onde a prevalência da síntese química acabou levando à queda do uso de produtos naturais. Todavia, devido às intoxicações geradas por medicamentos na década de 80, as plantas medicinais voltaram aos poucos a constar nas farmacopeias pelo mundo, principalmente na Europa (ALONSO, 1998).

O crescente aumento no uso das plantas medicinais advém de duas vertentes: a primeira é relativa aos fatores socioeconômicos, onde há precariedade no acesso aos fármacos pela população de poder econômico limitado. Já a segunda tem origem na grande toxicidade de alguns fármacos e até mesmo na inexistência de um medicamento eficaz para alguma patologia, sem os efeitos colaterais como hemorragias, insuficiência renal, hepatite e até mesmo o óbito (AKERELE, 1988).

### 1.1.2. Legislação em fitoterapia

O Sistema Único de Saúde (SUS) incentiva o uso das plantas medicinais e seus derivados, através de programas municipais de Atenção Básica em Saúde (BRASIL, 2006). Um destes programas, o *Farmácia Viva*, exerce desde a produção à assistência farmacêutica com fitoterápicos e atua em municípios onde o acesso da população aos fármacos é limitado (REIS *et al.*, 2004).

Segundo Reis e colaboradores (2004), no Rio de Janeiro existe o estímulo à exploração de plantas locais de sabido efeito medicinal pelo conhecimento tradicional, além de facilitar o processamento destas mesmas com a finalidade de serem utilizadas pela própria população.

Para embasar a utilização das plantas medicinais, foi elaborada a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS), que contém os nomes de espécies vegetais com potencial de se tornar um produto de interesse para o SUS através do uso popular em determinadas regiões do Brasil. Os estudos para a confecção desta lista foram realizados por técnicos da ANVISA, Ministério da Saúde e pesquisadores de todo o país (BRASIL, 2009)

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 para a ampla difusão dos 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 otimizar os processos de produção dos fitoterápicos ou fitofármacos (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

O mercado de fitoterápicos está em ascensão, porém ainda há uma carência no controle microbiológico em diversos produtos procedentes de plantas medicinais. A padronização de plantas medicinais começou a ser empregada na década de 70 na Alemanha e é realizada por meio de um marcador químico ou pelo próprio princípio ativo, a fim de certificar que o consumidor de um medicamento fitoterápico, tenha a confiança de que naqueles comprimidos ou cápsulas contenha uma quantidade uniforme e suficiente do produto para ter efeito terapêutico. Por meio

desta padronização podemos reproduzir medicamentos com os mesmos compostos em relação à quantidade, no mundo inteiro (LAZARINI, 2002).

Em 2013 a ANVISA publicou a Resolução RE n° 13, de 14/03/2013, que estipulou requisitos básicos para o registro de medicamentos fitoterápicos, definindo as características dos mesmos. Assim, não foram classificados como fitoterápicos os medicamentos que em sua composição apresentassem substâncias ativas isoladas, tanto de origem sintética ou natural e nem associações destas substâncias com outros extratos vegetais (BRASIL, 2013).

É importante ressaltar, que os fitoterápicos possuem em sua composição, compostos químicos que podem interagir com outros medicamentos que sejam utilizados de modo concomitante pelo paciente e, portanto, podem provocar danos. O uso, por exemplo, de Hipérico (*Hypericum perforatum*) quando utilizado junto a contraceptivos, pode reduzir o efeito do segundo e por consequência aumenta o risco de gravidez. Assim como o uso de Ginko (*Ginko biloba*) junto a anticoagulantes pode causar hemorragias graves (BRASIL, 2011).

Com o intuito de definir as regras para a produção de produtos fitoterápicos tradicionais a ANVISA editou a RDC n° 13/2013, na qual constam os procedimentos específicos para a fabricação de produtos fitoterápicos tradicionais. Já os medicamentos fitoterápicos isentos de notificação e que não sejam classificados como de uso tradicional, serão regidos pela RDC n° 17/2010 (BRASIL, 2013) e a RDC n° 48/2004, a qual dispõe sobre a necessidade de testes de toxicidade e sugere testes de mutagenicidade (BRASIL, 2004) para a comercialização do produto.

## **1.2. Infecções microbianas**

Primeiramente, é imprescindível compreender que o homem só está isento de micro-organismos no útero, em condições naturais de gestação, conservando-se intactas as composições placentárias. Essas estruturas, por sua vez, formam uma barreira contra a entrada destes micro-organismos. Quando esta barreira é quebrada, com a ruptura da bolsa, o futuro concepto entra em contato com a



microbiota materna e, gradativamente, com micro-organismos de outras pessoas, objetos inanimados e do ambiente. Ao fim da segunda semana de vida, estão microbiologicamente colonizados de forma semelhante aos adultos, sendo esta colonização, conhecida como microbiota normal (FERNANDES, 2000).

A microbiota normal pode ser encontrada tanto na espécie humana como nos outros animais, varia amplamente e está relacionada com fatores como idade, sexo, dieta alimentar e temperatura. Algumas bactérias são encontradas em locais anatômicos particulares, outras estão presentes só ocasionalmente ou somente em alguns momentos da vida do hospedeiro (SILVA, 1999).

De acordo com Fernandes (2000), a microbiota normal tem uma interação altamente específica com os tecidos do hospedeiro, sendo sugestiva de cada sítio. Isso contribui para que haja uma tendência para que a microbiota de indivíduos saudáveis seja semelhante, com pouca variação.

Diferentemente da colonização, a infecção normalmente é causada por bactérias patogênicas, que por suscetibilidade, atacam seus hospedeiros causando variadas doenças. Apesar dessa assertiva, em alguns casos, bactérias patogênicas podem somente colonizar, e por outro lado, pode ocorrer de bactérias da microbiota normal causarem doenças oportunistas se estiverem fora de seu *habitat* ou por desequilíbrios metabólicos, como por exemplo, colonização exacerbada e baixa da imunidade (NOGUEIRA & MIGUEL, 2010).

Além de bactérias, as infecções podem ser causadas por outros micro-organismos, como vírus e fungos, por parasitas como protozoários e helmintos; e também por proteínas infectantes denominadas príons (KONEMAN & CURY, 2010).

Em relação às bactérias, podemos classificá-las em diversas categorias. Porém a classificação mais utilizada é realizada de acordo com a afinidade da sua parede celular a determinados corantes. Segundo Fernandes (2000), podemos dividir estes micro-organismos em três grandes grupos:

- Gram-positiva: quando existe uma camada espessa de peptidoglicano;

- Gram-negativa: quando a camada de peptidoglicano é delgada, mas apresenta uma porção externa de lipopolissacarídeo e lipoproteínas;
- Álcool-ácido resistente, quando o envelope externo contém lipídeos complexos (ácidos micólicos) que conferem a resistência da bactéria à descoloração pelo álcool ácido na técnica de Ziehl Neelsen.

Para o isolamento do micro-organismo causador de uma infecção, é necessário que se faça uma boa coleta, identificação correta do material, transporte em tempo hábil ao setor de microbiologia, processamento do material, isolamento de colônias puras e avaliação do perfil bioquímico através de testes identificação manual ou automatizada. O sucesso de todo esse processo depende de toda equipe interdisciplinar envolvido em alguma dessas fases. Alguma falha em uma etapa pode prejudicar o diagnóstico, atrasando o tempo do resultado, o que poderá levar até mesmo ao óbito do paciente (SILVA, 1999).

Entre micro-organismos, que são comumente isolados em infecções estão as principais bactérias Gram-positivas: estafilococos, estreptococos e enterococos. Já nas Gram-negativas observam-se principalmente os gêneros pertencentes a família *Enterobacteriaceae* e alguns bastonetes Gram-negativos não fermentadores. No que concerne aos fungos, as mais isoladas são leveduras do gênero *Candida* (FERNANDES, 2000).

Os *Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos e podem colonizar narinas, axilas e períneo. São micro-organismos considerados oportunistas, mas têm aumentado sua evidência devido a aquisição de resistência a gama de antimicrobianos, como é o caso MRSA, sigla em inglês para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Neste gênero, temos também os estafilococos coagulase negativos, com destaque para o *Staphylococcus epidermidis*, que faz parte da microbiota normal epitelial mas pode causar infecções graves devido a procedimentos cirúrgicos (SILVA, 1999).

Os *Streptococcus* sp., e os *Enterococcus* sp., também estão entre grandes causadores de infecções. Os primeiros implicados em diferentes patologias desde

simples tonsilites até sepses fatais, já os *Enterococcus* sp. se destacam por serem bactérias que facilmente adquirem resistência aos antimicrobianos, como por exemplo. o VRE, sigla em inglês para Enterococo Resistente à Vancomicina. (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

As enterobactérias, em sua maioria, fazem parte da microbiota normal gastrointestinal, mas causam sérias complicações se conseguirem se instalar fora de seu habitat natural. Dentro deste grupo têm aparecido várias espécies multirresistentes a antimicrobianos como a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), entre outras (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; SOARES, 2012)

Existem também, bactérias Gram-negativas não fermentadoras, tendo como principal representante a *Pseudomonas aeruginosa*, que pode estar presente tanto em organismos vivos, como em superfícies e ambiente pois, aliado ao fato de ser um micro-organismo pouco exigente nutricionalmente (SILVA, 1999), possui vários mecanismos de resistência antimicrobiana (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

Nas infecções fúngicas, como já explicado, destacam-se as leveduras do gênero *Candida*, que acometem com frequência os pacientes imunodeprimidos, pois apesar de pouca probabilidade de adquirir resistência à antimicrobianos (FERNANDES, 2000), já começa a apresentar cepas resistentes (GÓMEZ-QUINTERO, 2010).

### 1.2.1. Principais classes de antimicrobianos

Os antimicrobianos são utilizados amplamente entre a população e no ambiente hospitalar, muitas vezes de forma indiscriminada, aumentando a resistência bacteriana aos mesmos. Eles podem inibir o crescimento de micro-organismos (bacteriostáticos) ou destruí-los (bactericida) (SCHECHTER & MARANGONI, 1998). As características de um antimicrobiano ideal seriam, segundo Lacaz (1969):

- Ter atividade bacteriana sobre amplo espectro de micro-organismos;

- Ser absorvido por via enteral e parietal;
- Ter fácil distribuição pelos tecidos e líquidos orgânicos, atingindo concentração bactericida;
- Não sofrer destruição por enzimas tissulares;
- Não provocar efeitos irritantes, tóxicos ou alérgicos no hospedeiro;
- Não induzir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes;
- Não provocar diminuição da resistência do organismo do hospedeiro;
- Não ter efeitos teratogênicos;
- Produzir concentrações elevadas e por tempo prolongado;
- Ser facilmente obtido em escala industrial, possibilitando sua fabricação em grande quantidade e a baixo custo;

Existem vários métodos para testar *in vitro*, a suscetibilidade de um micro-organismo a determinado antimicrobiano. Entre eles o mais conhecido é o método qualitativo de difusão de disco em placa, onde discos com concentrações conhecidas de tal 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. Dependendo da zona de inibição e relacionando esse valor aos compêndios oficiais, pode-se a partir daí concluir se a bactéria tem o critério interpretativo de sensível, intermediário ou resistente àquele antimicrobiano. Essas práticas são padronizadas e sua qualidade é posta em prova por instituições que testam a qualidade de exames diagnósticos (CLSI, 2016).

Os antimicrobianos podem ser divididos também pelo seu mecanismo de ação, ou seja, 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).

Entre os antimicrobianos que têm seu efeito sobre a síntese da parede celular estão os Beta-lactâmicos e Glicopeptídeos. Quando a bactéria é exposta a esse tipo de fármaco, este se une às proteínas ligadoras da penicilina (PBPs) na membrana celular bacteriana e enzimas autolíticas são liberadas, degradando a parede celular e levando à morte bacteriana (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Os que agem Inibindo a síntese proteica são os Macrolídeos, Aminoglicosídeos, Lincosaminas, Tetraciclina, Oxazolidinonas e Estreptogramina, que penetram na membrana bacteriana através de canais proteicos e atacam os ribossomos, interferindo diretamente na síntese proteica e provocando efeito bacteriostático (SCHECHTER & MARANGONI, 1998).

Outros grupos de antibióticos agem de maneiras diferentes. As Polimixinas, por exemplo, atuam sobre a estrutura e função da membrana celular. As Quinolonas atuam na síntese do ácido nucléico por ligação ao RNA ou inibição do DNA, provocando efeito bactericida. Inibidores do Ácido Fólico, as Sulfonamidas, têm sua ação na atividade anti-metabólica, impedindo a síntese de Ácido Fólico e desempenhando efeito bacteriostático (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

### 1.2.2. Mecanismos de resistência bacteriana

A eficiência de um antimicrobiano sobre uma bactéria depende principalmente do tipo de antimicrobiano escolhido, sua dose, via de administração, continuidade do tratamento, utilização de grande quantidade e variedade de outros fármacos, o sinergismo e o antagonismo de outros antibióticos. Levando-se também em consideração a resistência intrínseca, inerente ao micro-organismo, e a adquirida a um antibiótico (SILVA, 1999). De acordo com Rossi e Andreazzi (2005), um micro-organismo pode ser resistente à um antibiótico através de diversos mecanismos.

Um dos mecanismos mais frequentes, é a inativação automática, onde as bactérias produzem enzimas que inativam a droga ou seus efeitos antimicrobianos. Também existe a alteração da permeabilidade da membrana, que dificulta a penetração e conseqüentemente sua ação. O efluxo ativo de antibióticos, outro mecanismo comum, é uma capacidade de expulsar ativamente o antibiótico para

fora da célula, não permitindo a concentração ideal para o efeito da droga (SILVA, 1999). Além destes, há também a alteração do sítio de ligação do antibiótico, onde não ocorre a ligação efetiva do antibiótico com a célula, com perda da atividade antimicrobiana (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Um dos exemplos mais conhecidos de inativação enzimática é a produção por algumas bactérias, da enzima *Beta*-lactamase, conhecida como ESBL, sigla em inglês para designar *Beta*-lactamase de amplo espectro. Essas bactérias são resistentes aos *beta*-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de terceira e até de quarta geração (SCHECHTER & MARANGONI, 1998).

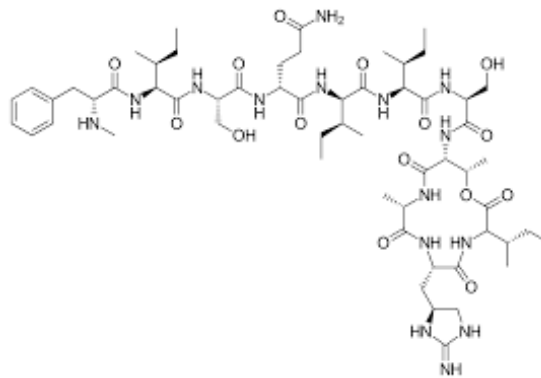
No entanto, os mecanismos de inativação enzimática evoluíram e deram origem a bactérias com resistência aos beta-lactâmicos carbapenêmicos, como o imipenem, meropenem e ertapenem, sendo chamadas de Carbapenemases (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Entre as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, são de grande importância clínica as que possuem o gene de resistência *bla*<sub>KPC</sub>, encontrado inicialmente em *Klebsiella pneumoniae*, sendo considerado hoje o subtipo de mecanismo mais difundido no mundo inteiro (CAMPOS et al., 2016).

Segundo Lee e colaboradores (2016), as enterobactérias produtoras de carbapenemases do tipo KPC, apesar de serem as prevalentes nas infecções hospitalares não são as únicas e nem as mais preocupantes portadoras de genes de resistência. São reportadas em todo o mundo as carbapenemases do tipo oxacilinases-48 (OXA-48) e uma das mais recentes descobertas: a Nova Deli metalo- $\beta$ -lactamase, conhecida como NDM e que surgiu na Índia.

### 1.3. Atividade antimicrobiana de produtos naturais

Como ressaltamos as bactérias, de um modo geral, apresentam cada vez mais resistência aos antibióticos utilizados na rotina clínica, seguido do fato de que mesmo com a atuação intensa da indústria farmacêutica, não há, praticamente, nenhuma nova categoria de antimicrobianos (BAQUERO & BLAZQUEZ, 1997), com exceção para a teixobactina (FIGURA 1), já em fase clínica, considerado promissor no combate às bactérias Gram-positivas (LING *et al.*, 2015). Antes deste antimicrobiano, somente a Linezolida foi colocada no mercado em meados dos anos 2000 e se trata de um fármaco sintético, de amplo espectro da classe das oxazolidinonas (WEIGELT, 2005).



**FIGURA 1** – Estrutura química da teixobactina (LING *et al.*, 2015)

Seguindo a linha dos antimicrobianos, observa-se com base na literatura, que indubitavelmente, certas plantas possuem potencial para inibir e combater diversas infecções, inclusive por bactérias (DUARTE, 2006).

Além disso, muitas plantas dos biomas brasileiros, tais como o cerrado, a floresta amazônica e a mata atlântica são muito utilizadas, como já comentado, como medicamentos naturais por diversas comunidades na terapêutica de várias moléstias tropicais, incluindo esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas. Além destas plantas, diversas espécies exóticas foram introduzidas no Brasil por conta da colonização e a partir daí, foram também utilizadas por tais comunidades (BUSSMANN, 2002).

As bactérias, principalmente em ambiente hospitalar, podem apresentar resistência concomitante a múltiplos antimicrobianos, tornando-se um desafio, para a definição de protocolos terapêuticos na atualidade (GARBATI & AL GODHAIR, 2013). Por esse motivo o interesse e as pesquisas técnico-científicas com extratos de plantas têm crescido substancialmente em nosso país, somando-se ao fator da grande biodiversidade no território nacional (WIEST *et al.*, 2009).

Os extratos vegetais são popularmente utilizados para tratamento de diversas doenças de modo empírico, porém em algumas plantas já foram realizados estudos de bioatividade e toxicidade em função da substância de interesse (DUARTE, 2006).

Dados históricos demonstram que as composições produzidas pelas plantas abrangem uma gama de metabólitos primários e secundários, que podem ser separados por diferentes técnicas. Os metabólitos primários são substâncias que se localizam em todas as células vegetais e são imprescindíveis para o desenvolvimento da planta. São os açúcares, aminoácidos, proteínas e os ácidos nucléicos (LÓPEZ, 2006).

Os metabólitos secundários, diferentemente dos primários, são limitados em sua distribuição pela planta, tanto dentro do próprio espécime quanto entre diferentes espécies e são imprescindíveis para a sobrevivência e a proliferação das plantas que os produzem. Entre estes compostos secundários podemos citar entre outros, os fenóis, terpenoides, óleos essenciais e alcaloides (MATOS, 1997).

Os metabólitos secundários, normalmente, são os responsáveis pelas propriedades medicinais ou tóxicas das plantas, e proporcionam amplo valor ecológico, pois podem agir na atração de polinizadores, ou desencadear uma defesa química contra uma possível ameaça do ambiente. (RAVEN *et al.*, 2007).

Apesar de tais substâncias possuírem admiráveis finalidades nos vegetais, podem por outro lado, produzir diversos efeitos deletérios no homem, pela própria composição e propósito destes metabólitos. Porém, na maioria destas substâncias, a toxicidade depende muito da dosagem em que venham a ser utilizadas (LORENZI & MATOS, 2002).



Metabólitos secundários são produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários, algas, insetos, animais marinhos, entre outros. Nas plantas o conjunto de compostos secundários é consequência do balanço entre a formação e eliminação de tais substâncias durante o desenvolvimento da planta, tendo influência de fatores genéticos e ambientais como luz, temperatura, tipo de solo, água e diversas outras variáveis. A pressão seletiva natural, inclusive as influências mútuas de competição, parasitismo, e alterações ambientais que alterem a disponibilidade de recursos são fatores determinantes para a origem dos metabólitos secundários. (RAVEN *et al.*, 2007).

As plantas possuem diversas vias metabólicas secundárias que dão procedência a diferentes compostos como alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, poliacetilenos, que por vezes, são exclusivos de determinadas famílias, gêneros ou espécies. (COWAN, 1999; SOUZA *et al.*, 2003).

Os princípios ativos de uma planta nem sempre são conhecidos, mas mesmo assim é totalmente possível que ela apresente bioatividade satisfatória e pode ser empregada desde que não ofereça efeito tóxico. Entre os grupos de princípios ativos podemos citar:

- Os alcaloides, que atuam no sistema nervoso central (calmante, sedativo, estimulante, anestésico, analgésico). Alguns podem ser cancerígenos e outros antitumorais;
- As mucilagens, que têm efeito cicatrizante, anti-inflamatório, laxativo, expectorante e antiespasmódico;
- Os flavonoides, com potencial anti-inflamatório, fortalecem os vasos capilares, antiesclerótico, dilatador de coronárias, espasmolítico, antihepatotóxico, colerético e antimicrobiano;
- Os taninos são adstringentes, antimicrobianos e antidiarreicos;
- Os óleos essenciais são bactericidas, antiviróticos, cicatrizantes, analgésicos, relaxantes, expectorantes e antiespasmódicos (LORENZI & MATOS, 2002).

As plantas que apresentam compostos aromáticos são empregadas de modo tradicional na medicina popular, na indústria farmacêutica, na indústria de alimentos aumentando a vida útil dos alimentos, mostrando inibição de bactérias e fungos (SARTORATTO *et al.*, 2004). Devido à atividade metabólica secundária dos vegetais, são produzidas substâncias como mecanismo de defesa contra micro-organismos, insetos e herbívoros (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005).

Os óleos essenciais e os extratos de diversas espécies de plantas podem conter o desenvolvimento dos micro-organismos relacionados à pele, à cárie dental, abrangendo os micro-organismos Gram-negativos e Gram-positivos (SARTORATTO *et al.*, 2004).

A atividade antimicrobiana tem sido relacionada a pequenos terpenoides e compostos fenólicos como timol, carvona, carvacrol, mentol e muroleno, que mesmo na forma isolada apresentam atividade antibacteriana ou antifúngica. Ainda que os mecanismos de ação estejam caracterizados, os mesmos indicam estar integrados à característica lipofílica destes compostos, proporcionando o acúmulo em membranas e perda de energia pelas células (DUARTE, 2006).

Os compostos antioxidantes, taninos e flavonoides, possuem potencial de atividade antimicrobiana, onde o possível mecanismo de ação é obtido devido à competência de inativação das enzimas e a formação de complexos com proteínas extracelulares, com proteínas solúveis e com a parede das células das bactérias, destacando que a ruptura total das membranas bacterianas pode ser atribuída a presença de flavonoides (FALCÃO *et al.*, 2006).

Os taninos possuem ação inibitória do crescimento de micro-organismos, entretanto não há um consenso sobre mecanismo de ação envolvido (BEELEN *et al.*, 2006). Um dos mecanismos sugeridos é à disposição dos taninos solúveis em originar ligação com os elementos da parede celular das bactérias formando complexos que são impossíveis de serem ligados às enzimas bacterianas, restringindo a atividade enzimática destes micro-organismos (NELSON *et al.*, 1997).

As particularidades e diferenças relacionadas às técnicas utilizadas para investigação da ação de compostos de plantas e uma grande variação localizada na composição química de determinadas preparações vegetais, possibilitam o

aparecimento de resultados de difícil comparação entre os estudos. Com todas as discrepâncias, não há um consenso sobre os valores de bioatividade padronizados para compostos de plantas, quando confrontados com antimicrobianos padrões (DUARTE, 2006).

A avaliação da atividade antimicrobiana em extratos vegetais é obtida por meio da determinação da menor quantidade do conteúdo em questão que tenha o potencial de inibir o desenvolvimento do micro-organismo utilizado. Podendo ser também utilizado para a realização de um *screening* na investigação de novos compostos com atividades farmacológicas. Os métodos mais conhecidos para a avaliação da atividade antimicrobiana são: método de macrodiluição, método de microdiluição, método de difusão em ágar e método de diluição em ágar (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Algumas destas técnicas são utilizadas para obter um *screening* da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, plantas ou substâncias puras. A turbidez é um indicativo da densidade bacteriana. Normalmente, quando não há crescimento microbiano o meio de cultura conserva-se límpido, porém se houver crescimento o meio tende a ficar turvo.

Deste modo, o nível de inibição está ligado com a turbidez do meio. Pode ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de diversos tipos de amostras e até espécies diferentes, sendo de certo modo, simples e de rápida execução. Entretanto esta metodologia possui uma limitação deste tipo de leitura, pois o meio pode apresentar crescimento bacteriano, mas o número de células presentes pode não ser suficiente para turvar o meio de cultura (RIOS *et al.*, 1988).

Já a difusão em disco depende da solubilidade do composto nele instilado, e precisa ser comparada com outras substâncias conhecidas para poder avaliar o tamanho do halo de ausência de crescimento obtido (ALVES *et al.*, 2008).

Há um número expressivo de famílias e espécies de plantas já estudadas. Todavia, se ponderarmos a existência das cerca de 300.000 espécies de plantas conhecidas, ainda é um percentual ainda reduzido daquelas exploradas pela pesquisa científica. Em grande parte dos casos, apenas uma das partes, como folha,

raiz ou caule, ou exclusivamente um tipo de preparação como óleo essencial ou extrato foram analisados (BUSSMANN, 2002).

### 1.3.1. Atividade antimicrobiana da família Myrtaceae

A família Myrtaceae é uma das mais características do Brasil constituindo frequentemente a estirpe arbórea predominante na mata Atlântica (LANDRUM & KAWASAKI, 1997). Esta família é decomposta em duas subfamílias, *Myrtoideae* e *Leptospermoideae*. Possui por volta de 140 gêneros e 5.800 espécies desenvolvendo-se em distintas localidades como Austrália, sudeste da Ásia e América do Sul (WILSON *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2005; GOVAERTS *et al.*, 2008).

Como principais características desta família podem-se apresentar folhas simples, opostas e de bordos inteiros; flores brancas, bissexuadas, pequenas, tetrâmeras ou pentâmeras, auxiliares ou em racemos ou panículas; ramos inertes; casca lisa sendo normalmente clara; frutos, bagas ou drupas (SOBRAL *et al.*, 2006).

Fazem parte da subfamília Myrtoideae muitas plantas de relevância econômica no campo alimentício, agrícola e ornamental, onde especiarias como o cravo (*Syzygium aromaticum*), os frutos de *Psidium* (goiabas), *Eugenia*, *Plinia*, *Syzygium*, *Myrciaria* são uns dos representantes mais conhecidos (REYNERTSON *et al.*, 2005).

Plantas da família Myrtaceae tem em sua composição uma alta concentração de terpenos, sabendo que existe uma variação qualitativa e quantitativa destes terpenos nas folhas em população e indivíduos distintos (KESZEI *et al.*, 2010).

No Brasil, as espécies da família Myrtaceae e gênero *Eugenia* constituem a maior fração de uso para fins medicinais, representando 71,4% do total empregado. Em sua maioria, são utilizadas para o tratamento ou auxílio no combate a distúrbios gastrintestinais, doenças infecciosas e hemorrágicas, tendo como partes comumente utilizadas as cascas, folhas e frutos (CRUZ & KAPLAN, 2004; DE QUEIROZ, 2015)

Apesar do conhecimento sobre os possíveis efeitos medicinais, os estudos sobre algumas espécies de *Eugenia* ainda são muito escassos (DUARTE, 2006; DE QUEIROZ, 2015). Pesquisas realizadas por Araújo (2011), já apontaram ação antimicrobiana de várias espécies de *Eugenia* sobre determinadas cepas

bacterianas Gram positivas e Gram negativas, como também leveduras do gênero *Candida*.

#### 1.3.1.1. *Eugenia florida* DC.

A planta *Eugenia florida* DC, conhecida popularmente como guamirim ou cereja-preta, pertence à família *Myrtaceae*, subfamília *Myrtoideae* e ao gênero *Eugenia*. Este engloba mais de 500 espécies, sendo encontrada de forma difundida no Brasil, inclusive no Rio de Janeiro (ALMEIDA; FARIA; SILVA, 2012). A *Eugenia florida* pode ser utilizada para diversos fins, sendo os principais a alimentação e ornamentação, porém como todo o gênero *Eugenia*, tem potencial para utilização medicinal (ROMAGNOLO & SOUZA, 2006).

Embora tenha esta nomenclatura principal, em alguns estudos e na literatura relacionada, a *Eugenia florida* DC. aparece citada pelos seus sinônimos como: *Eugenia gardneriana* O. Berg, *Eugenia silvatica* Cambess., *Eugenia seriatoracemosa* Kiaersk., *Eugenia membranaceae* O.Berg, *Eugenia patula* DC., *Eugenia atropunctata* Steud., *Eugenia oligoneura* O. Berg, *Eugenia racemifera* Sagot, *Eugenia tingelingua* S. Moore, *Eugenia perorebi* Parodi ex Speg. & Girola (DEWICK, 2002).

Espécimes de *Eugenia florida* DC. se apresentam como pequenas árvores, com uma média de altura de 3,5m, entre outubro e dezembro florescem e frutificam. Os frutos produzidos são comestíveis e possuem paladar muito agradável. (DONATO & MORRETES, 2009).

A folha de *Eugenia florida* DC. é oblongo-lanceolada, de margem inteira, com textura cartácea, base simétrica e ápice suavemente acuminado. O limbo mede de 9 a 13,5 cm de comprimento, por 4,5 a 6 cm de largura. O pecíolo mede de 6 a 9 mm de comprimento por 1 a 1,5 mm de diâmetro na base.

As folhas de sol são maiores que as folhas de sombras. Em estado natural, a folha é verde nas duas faces, apresentando-se um pouco mais clara no lado abaxial. Quando jovem, a folha é tênue, flexível e de coloração vinho, devido à presença de antocianina. Constata-se maior densidade vascular nas folhas de sol, que são

diferentes das de sombra por apresentarem características particulares que favorecem a recepção da luz solar (DONATO & MORRETES, 2009). Na figura 2 podemos observar as características desta espécie.



**FIGURA 2** - Planta *Eugenia florida* DC.- A) árvore, B) folhas, C) flores e D) frutos.

#### 1.4. Avaliação da toxicidade e mutagenicidade de produtos naturais

##### 1.4.1. Teste de toxicidade com *Artemia salina*

A toxicidade de um extrato e frações pode ser avaliada pelo ensaio biológico com *Artemia salina*, um microcrustáceo da ordem *Anostraca*, muito sensível à presença de substâncias potencialmente tóxicas (MCLAUGHLIN; CHANG; SMITH, 1993).

Utilizada como bioindicador de toxicidade, a *Artemia* é um crustáceo filtrador que se alimenta basicamente de bactérias, pequenos protozoários, algas unicelulares e detritos dissolvidos no meio. A filtração conduz as partículas alimentícias e outras substâncias do meio em direção ao seu sistema digestivo, sendo que a taxa de filtração diminui com o aumento da concentração de partículas,

ficando estas acumuladas e interferindo o processo normal de seus batimentos (SOUTO, 1991).

A maioria de experimentos que visam testes de toxicidade utilizam modelos baseados em ratos em crescimento, apresentando desvantagens para o método como o gasto de quantidade de amostra e o elevado custo (RIOS & RECIO, 2005). Parra e colaboradores (2001) também colocam o teste da *A. salina* como sendo útil para prever a toxicidade *in vivo*, já que realizaram testes em 20 extratos de plantas cubanas e estas apresentaram uma boa correlação entre *A. salina* e em ratos.

Considerado por Pimenta e colaboradores (2003) como um teste eficiente, rápido, barato e que requer uma quantidade pequena de amostra (2-20 mg), esse método segue o princípio dos 3Rs (redução, refinamento e quando possível a substituição) recomendado há tantos anos por Russell e Burch (1959) para pesquisas científicas e tão debatido como meta prioritária nos dias atuais (FLECKNELL, 2002).

A DL<sup>50</sup> (Dose Letal para 50% da população de *Artemia*) para valores encontrados em teste com o microcrustáceo é geralmente dez vezes a concentração necessária para inibir 50% do crescimento celular (CI50) em testes antitumorais (MCLAUGHLIN & ROGERS, 1998). A utilização de *Artemia* é facilitada por ser uma espécie de fácil manipulação em laboratório e de baixo custo econômico (CALOW, 1993). Estudos comprovam a ação tóxica de várias substâncias naturais ao crustáceo *Artemia* (RIOS & RECIO, 2005; NASCIMENTO *et al*, 2008).

O bioensaio em *Artemia salina* oferece uma vantagem na padronização e no controle de qualidade de produtos botânicos e pode ser usado para monitorar a atividade de produtos naturais bioativos. Esse teste é bem correlacionado com a atividade antitumoral (citotoxicidade).

#### 4.1.2. Teste de Ames e avaliação da mutagenicidade

A utilização de bactérias para detectar mutações gênicas é, atualmente, uma importante ferramenta para os estudos das etapas do processo de carcinogênese e

para detectar compostos genotóxicos, capazes de causar danos à saúde humana e ambiental (UMBUZEIRO & VARGAS, 2003).

Ames e Yamasaki (1971) descreveram um método utilizando mutantes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium deficientes da síntese de histidina para detectar o potencial carcinogênico de compostos químicos. No entanto, sabido que a maior parte dos carcinógenos conhecidos depende de metabolização para apresentar seu potencial de interação com o DNA (CLAXTON, 1997).

Portanto, se faz necessária a utilização de um sistema de metabolização exógena, geralmente, se baseando no uso de frações microsossomais hepáticas de ratos (MCCANN, 1975).

A utilização de modelos bacterianos para a detecção de mutágenos é recomendada pelo *guideline* 471, de 17 de julho de 1997, da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development* – OECD, 1997), que é um órgão não governamental responsável pela normatização de diretrizes de desenvolvimento. Conseqüentemente, as demais agências reguladoras de produtos de sanidade humana e animal no mundo submetem aos testes, os produtos que porventura possam ser comercializados em seu território.

Segundo modificações do método descrito por Maron e Ames (1983), são utilizadas cinco linhagens do clone LT2 da bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104), deficientes da síntese do aminoácido histidina (*His<sup>-</sup>*), geneticamente modificados no *operon* da histidina, para detectar mutágenos diversos, que produzem padrões determinados de mutação.

Segundo Maron e Ames (1983), a cepa TA97 detecta mutações do tipo *frameshift*, onde há modificação na leitura do DNA, e apresenta mutação no gene *hisD* 6610 e alvo para mutação os resíduos GC. Já cepa TA98 expressa mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica a histidinol desidrogenase e detecta compostos mutagênicos que acarretam deslocamento do quadro de leitura do DNA.

A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre no gene que codifica a primeira enzima do processo de biossíntese da histidina, através da substituição do



códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CAT) – leucina. Desta forma, esta cepa detecta agentes mutagênicos que geram substituições, principalmente neste par G-C. A cepa TA102 contém a mutação *ochre* TAA no gene *hisG* e detecta de modo eficaz substâncias mutagênicas como formaldeído, glioxal, vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes cross-link, como mitomicina- C. A cepa TA104 apresenta uma mutação no *locus hisG46* e pode reverter todas as combinações de pares de bases, por substituições/transversões de pares de bases A:T por C:G (MARON & AMES, 1983).

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento de micro-organismos multirresistentes na atualidade, as opções terapêuticas estão ficando escassas no que diz respeito ao uso de antimicrobianos já comercializados. Além deste fato, existe ainda a alta toxicidade de certos antimicrobianos elegíveis no tratamento de infecções por tais micro-organismos.

Sendo assim torna-se necessário o estudo e pesquisa sobre a atividade antimicrobiana, toxicidade e mutagenicidade de substâncias e /ou extratos oriundos de plantas medicinais que possam ser eficazes contra infecções e com menor nível de toxicidade para o organismo.

A escolha de *Eugenia florida* para este trabalho foi baseada em estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa por conta da utilização popular desta planta em forma de garrafadas por quilombolas. Os mesmos relatam o uso em infecções intestinais e diarreias, remetendo a um potencial antimicrobiano já que boa parte destes distúrbios gastrointestinais é de origem bacteriana.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Avaliar diferentes extratos de *Eugenia florida* como potenciais antimicrobianos frente a diferentes cepas padrão bacterianas e de leveduras, determinando a Concentração Inibitória Mínima em diferentes frações.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Obtenção de diferentes extratos vegetais a partir do extrato etanólico de *Eugenia florida*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de cada extrato (bruto e semi-puros) por diferentes técnicas, comparando sua eficácia;
- Identificar os componentes majoritários presentes nos extratos que apresentarem bioatividade, por procedimentos cromatográficos;
- Avaliar a toxicidade e a mutagenicidade dos extratos obtidos;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Métodos gerais

Os experimentos de prospecção do material vegetal e os testes fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais (PN-2) em Farmanguinhos e os testes de atividade biológica e toxicidade foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas (DCB), situado na Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), ambos situados na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os ensaios de mutagenicidade foram realizados no Laboratório de Mutagênese Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Tais experimentos foram realizados de janeiro de 2016 a janeiro de 2017.

#### 4.1.1. Obtenção dos extratos e frações

##### 4.1.1.1. Material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (JBRJ), sendo o espécimen número 1385 de *Eugenia florida* DC., localizado no canteiro 5K. Procedeu-se a coleta em dois momentos diferentes, sendo a primeira no dia 14 de janeiro de 2016 e a segunda no dia 17 de fevereiro do mesmo ano, como consta na tabela 1 junto aos dados pertinentes ao processo e na tabela 2, onde os dados de registro em herbário e localização foram descritos.

A escolha do material vegetal se restringiu às folhas, pois segundo o uso tradicional e testes realizados com garrafada pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que os extratos (BESSA et al., 2013; DE QUEIROZ et al., 2015), possuíam atividade antimicrobiana, além de ser a parte da planta com maior frequência de renovação e por consequência, maior conservação (LÓPEZ, 2006).

As folhas foram coletadas por todo o espécimen utilizando um podão e tesoura de poda e logo em seguida foram selecionadas as mais saudáveis, destacando-as dos galhos.

**TABELA 1** - Dados de coleta de *Eugenia florida* DC.

<b>Data</b>	14/01/2016	17/02/2016
<b>Hora</b>	8h 20 min.	9h
<b>Temperatura</b>	23°C	27°C
<b>Umidade</b>	95%	84%
<b>Quantidade</b>	1.595 g	706 g

A segunda coleta teve como propósito assegurar quantidade de material suficiente caso fosse necessário repetir algum ensaio, já que os parâmetros de coleta foram praticamente os mesmos.

**TABELA 2** - Dados de Registro de *Eugenia florida* DC. em herbário e localização.

<b>Espécie</b>	<b>Registro no</b>	<b>Registro no herbário Farmacia</b>	<b>Coordenadas</b>
	<b>herbário do</b>	<b>Verde de Farmanguinhos/</b>	
	<b>JBRJ</b>	<b>Fiocruz</b>	
<i>E. florida</i> DC.	RB 336.681	FFAR – 443	S – 22°58' 02.45'' W – 43°13'2467'' Altitude 16msnm

#### 4.1.1.2. Obtenção dos extratos

Após a coleta, as folhas saudáveis foram limpas, pesadas e secas em estufa com temperatura de aproximadamente 40°C. O tempo de secagem foi de 48 a 72 horas. Após esse período o material novamente pesado para cálculo de rendimento e triturado em moinho de facas em cinco a sete ciclos, por um tempo de cinco segundos cada um. O extrato foi preparado com 50g de folhas secas da primeira coleta, adicionado 1L de etanol P.A. e obtido por maceração estática em frasco vedado. O restante do material foi armazenado para estudos posteriores (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Para pesquisar diferenças de concentração e bioatividade, foi avaliada a influência do tempo de extração: sete, catorze e vinte e um dias. Em cada período de sete dias foram retiradas alíquotas para a realização dos testes de atividade e prospecção fitoquímica, enquanto. Os extratos passaram pelo rotaevaporador BUCHI® (FIGURA 3) até a secura e foram armazenados em dessecador para minimizar a quantidade de solvente. Após este processo houve a ressuspensão com solução hidroalcoólica a 50%. Para a redução de partículas sólidas foi utilizado papel de filtro e para esterilização o filtro microbiológico de 0,22 $\mu$ m. O rendimento em cada etapa é demonstrado na tabela 3.



**FIGURA 3** - Rotaevaporador utilizado.

**TABELA 3** - Peso e rendimento durante os processos de prospecção.

<b>Peso (rendimento)</b>	<b>Coleta 1</b>	<b>Coleta 2</b>
Fresco total	1595g	706g
Seco total	661g (41,4%)	318g (45%)
Seco utilizado	50g/1000mL	50g/1000mL
Extrato obtido	6mg/mL	6mg/mL

#### 4.1.1.3. Obtenção das frações de *Eugenia florida*

O extrato bruto, da alíquota do 21º dias, foi concentrado e depois ressuspenso em água, originando um precipitado que é chamado de fração insolúvel. O precipitado foi separado em filtro de papel, e o filtrado restante fracionado através de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol). Após a evaporação dos solventes sob pressão reduzida, obtivemos as frações desejadas (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

#### 4.1.2. Preparo do meio de cultura

Como meio de cultura, o ágar Mueller Hinton® foi utilizado para a realização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) por difusão em disco e também pode ser utilizado para um *screening test* da atividade antimicrobiana do extrato quando este está fundido ao meio (COSTA *et al.*, 2010; MIMICA; MENDES, 2007).

O meio de cultura ágar Mueller Hinton® se apresenta em pó comercial e precisou ser diluído em água numa proporção de 38g de meio para cada litro de água e depois aquecido para total solubilização. A esterilização foi realizada por calor úmido em autoclave na temperatura de 121°C, com 1 atm. de pressão por 15 minutos. Após este processo o meio fundido foi resfriado para aproximadamente 40°C e depois distribuído em placas de Petri de 60 mm. Após solidificação foi realizado o teste de esterilidade das placas por incubação de 18h em estufa a 35/36°C, avaliação da espessura de 4 mm e posteriormente liberado para utilização (MUELLER & HINTON, 1941; OPLUSTIL, 2010).

#### 4.1.3. Ensaio biológico

Os ensaios biológicos foram realizados em cepas bacterianas ATCC (*American Type Culture Collection*), pois são padronizadas com relação a seu fenótipo

bioquímico e ao seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos. Foi testado o extrato bruto hidroalcoólico frente às cepas bacterianas ATCC.

Foram utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana, três diferentes formas de análise, inicialmente foi realizado um screening com base na fusão do extrato de *Eugenia florida* com o meio Mueller Hinton, a difusão em disco usando diferentes concentrações do extrato e a microdiluição, onde é possível realizar a avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) (OSTROSKY *et al*, 2008).

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi obtida por meio de repique em meio sólido do conteúdo do poço na placa de microdiluição que apresentou a CIM. Foi considerada CBM àquela que não apresentou crescimento microbiano no meio de cultura junto ao conteúdo em questão, após incubação. Quando houve crescimento, foi denominada Concentração Bacteriostática (CB) (BARON & FINEGOLD, 1990). O uso de mais de uma estratégia metodológica teve a finalidade de comparação de resultados.

#### 4.1.3.1. Micro-organismos avaliados

Foram utilizadas doze cepas de bactérias e três leveduras ATCCs neste estudo. A maioria do acervo é constituído de cepas selvagens, ou seja, não apresentam mecanismos de resistência adquiridos, apenas os constitutivos quando apresentam. Seus perfis bioquímicos e de susceptibilidade aos antimicrobianos foram confirmados por meio de sistemas automatizados e manuais. São elas:

- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) – Cepa selvagem;
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) - Produtor de Beta-lactamase;
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) – Cepa selvagem;
- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) – Cepa selvagem;



- *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) - Resistente à vancomicina e a aminoglicosídeos;
- *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) – Cepa selvagem;
- *Escherichia coli* (ATCC 35218) - Produtora de ESBL (Beta-lactamase de espectro estendido; utilizada para controle de conjugados);
- *Escherichia coli* (ATCC 25922) – Cepa selvagem;
- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) – Produtora de ESBL (resistência plasmidial);
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) - Cepa selvagem;
- *Proteus mirabilis* (ATCC 7002) – Cepa selvagem;
- *Proteus vulgaris* (ATCC 8427) – Cepa selvagem;
- *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) – Cepa selvagem;
- *Candida glabrata* (ATCC 2350) – Cepa selvagem;
- *Candida albicans* (ATCC 10231) – Cepa selvagem;

Neste experimento, as cepas bacterianas acima foram denominadas por letras de A a L respectivamente. E as de leveduras foram denominadas L1, L2 e L3;

#### 4.1.3.2. Preparo do inóculo e padronização

O preparo do inóculo bacteriano é baseado na escala de turbidez de Mc Farland (tubo 0,5), que se fundamenta na turvação correspondente a uma determinada concentração bacteriana em meio líquido, que se correlaciona a grandeza de aproximadamente  $10^8$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por mL (NOGUEIRA & MIGUEL, 2010; CLSI, 2016).

Dependendo do tipo bacteriano foi alcançado este grau na escala pegando de duas ou três colônias do micro-organismo e diluindo em aproximadamente três mililitros de solução salina a 0,9%, homogeneizando em agitador de tubos. Foi utilizada a escala para determinar os padrões de referência de turbidez por comparação visual e, em nos caso de dúvida foi utilizado o turbidímetro (OPLUSTIL, 2010).

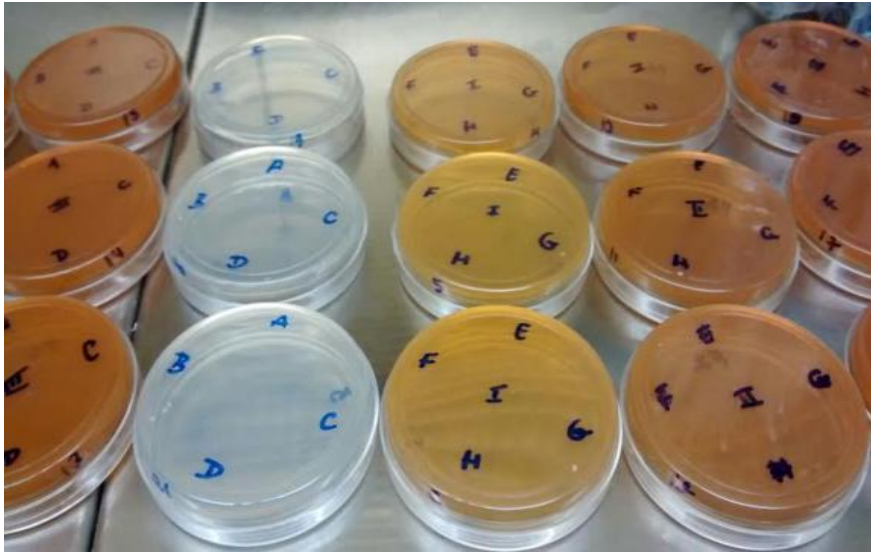
As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrosado, realizando dois repiques para obter culturas puras e jovens. Para o preparo do inóculo foram selecionadas de quatro a cinco colônias que foram suspensas em cinco mililitros de salina a 0,9% e homogeneizadas em agitador de tubos. A concentração final foi de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, de acordo com a metodologia estabelecida por Espinel-Ingroff e Pfaller (1995).

#### 4.1.3.3. Método de diluição em ágar Mueller Hinton com extrato

Como foi citado anteriormente, o método de diluição em ágar tem como função ser um *screening* da atividade antimicrobiana de um extrato, onde se funde a quantidade de extrato desejada no meio de cultura. Neste trabalho o extrato foi fundido ao meio de forma que a concentração do extrato fosse respectivamente de 3 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,25 mg/mL (COSTA *et al.*, 2010).

Para cada extrato, obtidos das alíquotas de 7, 14 e 21 dias, foram realizados ensaios em triplicata. Ao todo foram realizados nove ensaios, cada um com cinco concentrações diferentes do extrato. Em cada placa de 60 mm foi possível testar quatro cepas com *spots* de 10 $\mu$ L (FIGURA 4).

A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a aproximadamente 35°C por 24 e 48h. A menor diluição onde a cepa não apresentou crescimento foi denominada CIM (concentração inibitória mínima).



**FIGURA 4** - Placas contendo o extrato fundido ao meio em concentrações diferentes.

As letras de A a H representam cepas bacterianas diferentes e a coloração do meio corresponde a concentração do extrato fundido ao ágar.

#### 4.1.3.4. Método de difusão em disco

O método de difusão em disco se baseia na capacidade do extrato, inicialmente impregnado em disco, de se difundir pelo meio de cultura e ser ativo ou não contra o micro-organismo (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Neste método foi utilizado disco de filtro de papel estéril e nele foram colocadas com auxílio de uma micropipeta, concentrações determinadas do extrato, de 3 mg/mL, 2 mg/mL e 1 mg/mL. Esses discos foram depositados na superfície do meio Mueller Hinton contendo o inóculo bacteriano da cepa padrão ATCC, em turvação de crescimento correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland semeado por induto contínuo. Tais discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 10  $\mu$ L do extrato bruto e deixados secar assepticamente a temperatura ambiente, por 2 horas.

Os discos foram colocados numa distância de 25 a 30 mm com o auxílio de uma pinça estéril, sobre as placas inoculadas com os micro-organismos teste de forma equidistante. Depois de incubação de 24 h em estufa bacteriológica foi medido o halo de inibição de cada disco com as mesmas concentrações que a técnica anterior (BAUER *et al.*, 1966). Como controle positivo foi utilizado ciprofloxacino para

bactérias e anfotericina B para leveduras. Já no controle negativo foi utilizado disco com o solvente, no caso uma solução hidroalcoólica a 50% (CLSI, 2016)

#### 4.1.3.5. Método de microdiluição em caldo

Na microdiluição foi utilizado o caldo BHI, com o extrato e o inóculo bacteriano. Na macrodiluição a ordem de grandeza da solução é de mililitros, já na microdiluição, podemos trabalhar com microlitros (CLSI, 2016).

Este método foi realizado segundo o compêndio internacional denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016), em placa de microdiluição estéril com 96 poços e cada bactéria a ser testada foi inoculada em duplicata. Todos os poços foram então preenchidos com 100 µL do meio BHI. Posteriormente, em cada poço inicial da placa foram adicionados 100 µL de extrato e o volume total por sua vez foi transferido para o poço seguinte, reduzindo a concentração pela metade. Do primeiro para o segundo 100 µL e assim por diante. No último poço foi descartado o volume de 100 µL. Por fim em cada poço foi depositado 10 µL de inóculo bacteriano na diluição correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland. A placa foi incubada em estufa bacteriológica por 24h a temperatura de  $35\pm 2$  °C.

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 (CLSI, 2016).

Foram realizados quatro tipos de controle para garantir a qualidade e confiabilidade do teste. Foi realizado o controle do meio, onde somente o mesmo foi depositado nos poços para confirmar a esterilidade do meio e da placa utilizada. O controle do meio junto às cepas Gram positivas, Gram negativas e de leveduras respectivamente, demonstrou que o meio estava apto para proporcionar o crescimento bacteriano.

O controle do solvente, no caso álcool a 50%, 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. E por último, o controle de inibição, onde foram adicionados ao

meio e as cepas, o antimicrobiano ciprofloxacino para as bactérias e anfotericina B para as leveduras.

#### 4.1.4. Agentes antimicrobianos

Nos testes de atividade foram utilizados antimicrobianos específicos compatíveis com cada tipo de bactéria. Ciprofloxacino foi o antimicrobiano selecionado para a inibição bacteriana nas mesmas concentrações que o extrato para servir como padrões comparativos (OSTROSKY *et al.*, 2008). Seguindo as recomendações do CLSI (2016), para controle de inibição fúngica, foi utilizado anfotericina B em concentração de 100 microgramas/mL. Os fármacos utilizados no controle positivo de inibição foram reconstituídos em água destilada a fim de se obter uma solução nas concentrações desejadas.

#### 4.1.5. Prospecção fitoquímica qualitativa

Os testes de prospecção fitoquímica foram realizados no extrato bruto e semipuro, utilizando reações químicas específicas que geram coloração ou precipitação característica que identificam a presença de metabólitos secundários. Os testes selecionados tiveram como objetivo a verificação da presença de triterpenos/esteroides, saponinas, flavonoides, taninos e alcaloides nos extratos de folhas de *Eugenia florida* DC. Todos os testes fitoquímicos seguiram a metodologia empregada por Matos (1997) conforme mostrado abaixo.

##### 4.1.5.1. Testes de identificação

###### 1) triterpenoides e esteroides pelo teste de Libermann Burchard

Para detecção de triterpenoides e esteroides foram misturados 2mL de extrato e 2mL de clorofórmio, em seguida procedemos a filtração em sulfato de sódio anidro e a adição de 1mL de anidrido acético com agitação suave. Por fim adicionamos 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado e continuamos agitando suavemente. A

visualização de uma coloração azul evanescente e depois verde, indica a presença de esteroides livres, porém se o produto apresentar uma cor parda à vermelha, indicará a presença de triterpenoides livres.

#### 2) saponinas pelo teste de espuma

No teste para identificação de saponinas foram acrescentados 5 mL de água destilada a 2mL de extrato e mais 2mL de clorofórmio. Depois de forte agitação, a visualização de formação de espuma abundante e persistente indica uma reação positiva da presença de saponinas.

#### 3) alcaloides pelo teste de Dragendorff

Para a identificação de alcaloides foram utilizados 2 mL de extrato, mais 15 gotas de hidróxido de sódio a 1%, 2mL de água e 2mL de clorofórmio. Com um funil de separação, utilizando a fase orgânica em outro recipiente, adicionamos 15 gotas de ácido clorídrico a 1% e 2mL de água destilada. Com funil de separação foi reservada a fase aquosa ácida e por fim foram adicionadas três gotas de reagente Dragendorff. A formação de precipitados insolúveis indica a presença alcaloides.

#### 4) Flavonoides pelo teste de Shinoda

Foi realizamos o teste com ácido clorídrico concentrado e magnésio. Onde foram adicionados a 2 mL do extrato, aproximadamente 0,5 cm de magnésio em fita com 2 mL de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação dá-se pelo término da efervescência. O aparecimento de coloração que varia de parda a vermelha indica a presença de flavonoides no extrato.

#### 5) Taninos pelo teste de $\text{FeCl}_2$

A presença de Taninos foi revelada com a adição de três gotas de solução de Cloreto férrico 1%, sendo possível observar a presença da coloração azul ou verde característica caso o teste seja positivo. Já um teste negativo é indicado pela cor inalterada do extrato.

Todos os testes foram realizados em triplicata e com extratos brutos das alíquotas do 7º, 14º e 21º dias de maceração estática, a fim de observar alguma diferença nos resultados da prospecção fitoquímica qualitativa.

#### 4.1.6. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram avaliados os eluentes e os reveladores utilizados nos extratos obtidos. Estes solventes foram anteriormente testados em diferentes proporções: hexano/acetato de etila (4:1, 1:1, 1:4, 1:2, 1:5 e 1:8) e acetato de etila/metanol (4:1, 1:1, 1:2, 2:1, 1:4, 8:1, 6:1) (DE QUEIROZ *et al.*, 2015). Como reveladores foram utilizados: lâmpada de ultravioleta, anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico, NP-PEG, cloreto férrico 3% e vanilina sulfúrica. Foi eleito, após a avaliação de estudos anteriores, o eluente hexano/acetato de etila em proporção de 1:4 e como revelador, a lâmpada de ultravioleta e vanilina sulfúrica (FROEHNER; LEITHOLD; LIMA JÚNIOR, 2007). Tais eluentes foram eleitos devido a melhor separação na CCD (FIGURA 5), e os reveladores com base na melhor visualização das classes presentes nos extratos (DE QUEIROZ *et al.*, 2015).



**FIGURA 5** - Cuba com a placa em eluição na CCD.

#### 4.1.7. Ensaio de toxicidade e mutagenicidade

Os ensaios realizados para a pesquisa de toxicidade e potencial mutagênico foram os Testes com *Artemia salina* para toxicidade e o de Ames para mutagenicidade e também toxicidade.

##### 4.1.7.1. Teste com *Artemia salina* Leach

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi realizada através da adaptação da metodologia de Meyer et al. (1982), preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 300 g/L .

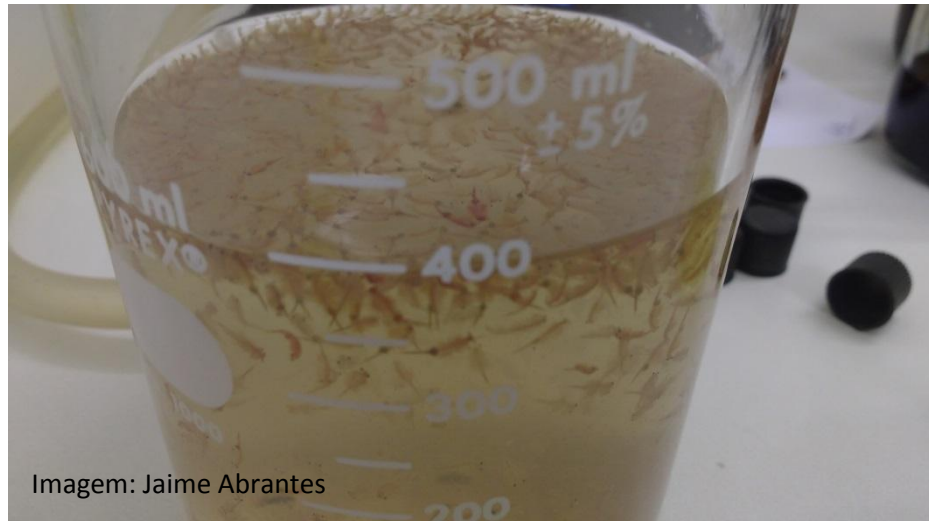
O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol/L de NaOH. Esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Posteriormente a estabilização, em aproximadamente 24 horas, foram adicionados 3 g de cistos de *A. salina*, que foram colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25°C.

Seis concentrações diferentes do extrato bruto (3500, 3000, 2500, 2000 1000 e 500 µg/mL) foram testadas através da colocação em tubo de ensaio de 1,0 mL de solução salina a 0,9%, dez larvas de *A. salina* e 500 µL das concentrações testadas do extrato bruto, cada uma em triplicata.

Seguindo as recomendações de Dolabela (1997), os tubos foram mantidos por período de 24 horas em iluminação artificial a 28°C e em seguida realizadas as contagens dos animais mortos e vivos (FIGURA 6).

Para o cálculo da DL<sup>50</sup> considera-se um produto de baixa toxicidade quando a dose letal 50% (DL<sup>50</sup>) foi superior a 500 µg/mL, moderadamente para DL<sup>50</sup> entre 100 a 500 µg/mL e muito tóxico quando a DL<sup>50</sup> < 100 µg/mL (DOLABELA, 1997).





**FIGURA 6** - Larvas de *Artemia salina*.

#### 4.1.7.2. Teste de AMES

Para a detecção de mutagenicidade no extrato bruto de *Eugenia florida* DC., foi eleito o teste de Ames com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, que indica por meio da sensibilidade das cepas utilizadas, a possibilidade de sofrer mutação ao ser exposta a substâncias externas ao seu próprio metabolismo e habitat. Utilizamos as linhagens TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104 (TAGLIARI; CECCHINI; SARIDAKIS, 1999).

Para verificar se as cepas utilizadas apresentam as características genéticas específicas que lhes conferem uma maior capacidade de detectar mutágenos, foi realizada uma bateria de testes capazes de verificar os aspectos fenotípicos, relativos à expressão do genótipo bacteriano.

A essa bateria de testes, se dá o nome de checagem de fenótipos. Os procedimentos a seguir foram realizados de acordo com Maron e Ames (1983) (TABELA 4).

**TABELA 4** – Características a serem observadas na checagem de fenótipos das cepas de *S. enterica* sorovar Typhimurium.

Cepa	Mutação		Resistência		Requerimento		Reversão	
	<i>rfa</i>	<i>uvr</i>	Ampi <sup>R</sup>	Tetra <sup>R</sup>	His	Bio	[-]	[+]
	<i>B</i>							
<b>TA97</b>	+	+	+	-	+	+	80-215	>400
<b>TA98</b>	+	+	+	-	+	+	20-55	>100
<b>TA100</b>	+	+	+	-	+	+	100-240	>500
<b>TA102</b>	+	-	+	+	+	-	100-400	>800
<b>TA104</b>	+	+	+	-	+	+	150-500	>1000

Legenda: Na checagem de fenótipos, são detectadas características fenotípicas de cada linhagem utilizada no ensaio de mutação reversa bacteriana. As cepas utilizadas foram TA97, TA98, TA100, TA102 e TA104. As características a serem detectadas são as mutações nos genes *rfa* e *uvrB*, a resistência à Ampicilina (Ampi<sup>R</sup>) e à Tetraciclina (Tetra<sup>R</sup>), o requerimento de Histidina (His) e Biotina (Bio) e as taxas de reversão espontânea ([-]) e induzida ([+]). (+)=positivo, presença do fenótipo; (-)=negativo, ausência do fenótipo. Fonte: Adaptado de MARON & AMES, 1983.

São verificadas características como: (a) presença da mutação no gene *rfa*, que aumenta a permeabilidade da parede de LPS, permitindo que moléculas de alto peso molecular atravessem a parede celular das bactérias; (b) a presença da mutação no gene *uvrB*, que confere um mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), através da resistência à radiação UVB; (c) a presença do plasmídeo pKM101, que confere resistência ao antibiótico Ampicilina e aumenta a taxa de reparo propenso a erro (EPR); (d) a presença do plasmídeo pAQ1, que confere resistência ao antibiótico Tetraciclina e apresenta um domínio extra de mutação da histidina; (e) o requerimento de histidina e (f) biotina e, por fim, as taxas de mutação (g) espontânea e (h) induzida.

Para detectar a mutação *rfa*, 100µL das culturas bacterianas crescidas em caldo Luria Bertani (LB) a  $1-2 \times 10^9$  cel./mL foram dispersas em ágar nutriente, utilizando 2mL de ágar de superfície (7 g/L ágar; 5 g/L NaCl, 45 °C). Após a polimerização do ágar de superfície, um disco de papel filtro estéril foi aplicado no

centro da placa, 10µL de uma solução de Cristal Violeta (1 g/L) foi aplicada no papel e, após 18-24 horas, os resultados foram avaliados. Esperava-se observar um halo de inibição de cerca de 15 mm de diâmetro em todas as cepas portadoras dessa mutação.

Para detectar a mutação *uvrB*, foram realizadas estrias de cada linhagem em placas de ágar nutriente, com auxílio de alças bacteriológicas descartáveis. Metade de cada placa foi coberta, deixando um lado da placa exposto à radiação UV (15W – germicida) a uma distância de 33 cm, por 8 segundos. Após a incubação por 18-24h, foi realizada a avaliação. Esperava-se observar o crescimento das linhagens na metade não irradiada e, na metade irradiada, apenas a TA102, portadora do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos, deveria crescer.

Para detectar a resistência aos antibióticos ampicilina e tetraciclina, 100µL das culturas crescidas em caldo LB a  $1-2 \times 10^9$  células/mL foram colocadas em 10mL de caldo LB na presença de 31,5µL de ampicilina (8 mg/mL) e 2,5µL de tetraciclina (8 mg/mL). Esperava-se que as linhagens utilizadas fossem resistentes à ampicilina e sensíveis à tetraciclina, com exceção da TA102, que também era resistente ao último.

Para detectar a necessidade de histidina e biotina, foi realizada a incubação, em tubos de ensaio estéreis, de 100µL das culturas bacterianas crescidas em caldo LB a  $1-2 \times 10^9$  cel./mL em: (a) ausência dos dois componentes, (b) na presença de histidina (0,1 M) ou (c) biotina (0,5mM) e (d) na presença de ambos, diluídos a 10% em 2 mL de ágar de superfície.

O ágar de superfície foi vertido em placas de ágar Vogel-Bonner 10X (10 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 100 g/L  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ; 500 g/L  $K_2HPO_4$ ; 175 g/L  $Na(NH_4)HPO_4 \cdot 4H_2O$ ) contendo 20 g/L de glicose (ágar VB – Meio mínimo). Esperava-se observar crescimento apenas nas placas em que há adição de histidina e biotina. Para a cepa TA102, houve o crescimento nas placas contendo histidina, sendo ausente a biotina, já que esta cepa não é auxotrófica para a síntese dessa vitamina.

Para verificar as taxas de reversão espontânea e induzida, cada linhagem bacteriana foi incubada a 37°C por 16 horas, em LB com ampicilina e tetraciclina (para TA102) até atingir a fase estacionária ( $1-2 \times 10^9$  cel./mL). Foram colocados,

em um tubo de ensaio: 100 µL dessa suspensão bacteriana, 500 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,4) e 100 µL de DMSO (controle negativo) ou um controle positivo, específico para cada linhagem (TABELA 5).

**TABELA 5** – Controles Positivos utilizados no Teste de Ames e na checagem de fenótipos

<b>Cepa</b>	<b>Substância para controle positivo</b>
<b>TA97</b>	Óxido de N-4-Nitroquinolina (CAS: 56-57-5) 1,0 µg/placa
<b>TA98</b>	Óxido de N-4-Nitroquinolina (CAS: 56-57-5) 1,0 µg/placa
<b>TA100</b>	Azida Sódica (CAS: 26628-22-8) 0,5 µg/placa
<b>TA102</b>	Mitomicina C (CAS: 50-07-7) 0,5 µg/placa
<b>TA104</b>	Metilmetano sulfonato (CAS: 66-27-3) 250 µg/placa

Legenda: Controles positivos (mutágenos) utilizados na checagem de fenótipo. Estão expressos os controles utilizados (nome usual e número CAS) e a dose utilizada, para cada linhagem. Fonte: Adaptado de Mortelmans e Zeiger, 2000.

Os tubos foram então incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida, 2 mL de ágar de superfície, contendo solução de histidina e biotina (10%) à 45 °C foi adicionado no tubo de ensaio e a mistura final foi vertida sobre uma placa de Petri de ágar Vogel-Bonner até a solidificação do ágar de dispersão e então incubada a 37 °C por 72 horas.

As unidades formadoras de colônias (UFC) revertentes *His*<sup>+</sup> foram contadas manualmente. Esperava-se obter um número de colônias revertentes dentro da faixa apresentada na tabela 3, tanto para o padrão espontâneo, quanto para o induzido, utilizando os mutágenos específico para cada linhagem, descritos na tabela 4.

No ensaio de mutação reversa bacteriana (TAGLIARI; CECCHINI; SARIDAKIS, 1999), cada linhagem bacteriana foi incubada a 37°C por 14-16 horas, sob agitação em LB com ampicilina e/ou tetraciclina até atingir a fase estacionária ( $1-2 \times 10^9$  células/mL). Foram colocados, em um tubo de ensaio: 100 µL dessa suspensão bacteriana, 500 µL de tampão fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,4) e 100 µL de uma das concentrações (0,1; 1; 10; 100 ou 1000 µg/placa) do extrato, ou controles positivo (de acordo com cada linhagem e na ausência de metabolização) ou controle negativo (DMSO).

Os tubos foram então incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida, 2 mL de top ágar contendo solução de histidina e biotina (10%) à 45 °C foi adicionado no tubo de ensaio e todo o conteúdo foi vertido sobre uma placa de Petri de ágar Vogel-Bonner. Esta mistura final foi incubada a 37 °C por 72 horas e as unidades formadoras de colônias (UFC) revertentes *His*<sup>+</sup> foram contadas manualmente.

A amostra foi considerada positiva / mutagênica quando o número de revertentes no ensaio foi, pelo menos, duas vezes maior que o número de revertentes espontâneos (observados no controle negativo), gerando um índice de mutagenicidade maior ou igual a dois, ( $IM \geq 2$ ).

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados pela variância estatística do tipo *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste correlativo de Tukey, a fim de determinar diferenças estatísticas significantes ( $p \leq 0,01$ ). As amostras que obtiveram  $IM \geq 2$  foram analisadas pelo ensaio correlativo de Bernstein, a fim de se obter a potência mutagênica dos compostos estudados (OECD, 1997; ARAUJO-LIMA *et al.*, 2017).

As avaliações quantitativas foram feitas para determinar os efeitos citotóxicos das concentrações dos compostos. No ensaio, 10 µL da suspensão bacteriana tratada como descrito para o Teste de Ames foi diluída em microtubos contendo uma solução salina 0,9% (NaCl 9 g/L), sendo realizada uma diluição seriada onde a diluição final foi  $10^{-7}$ . Em seguida, 100 µL da mistura foram colocados em uma placa de Petri com ágar nutriente e espalhados com auxílio de pérolas de vidro.

Estas placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias foram contadas manualmente e um cálculo percentual foi feito em relação ao controle negativo.

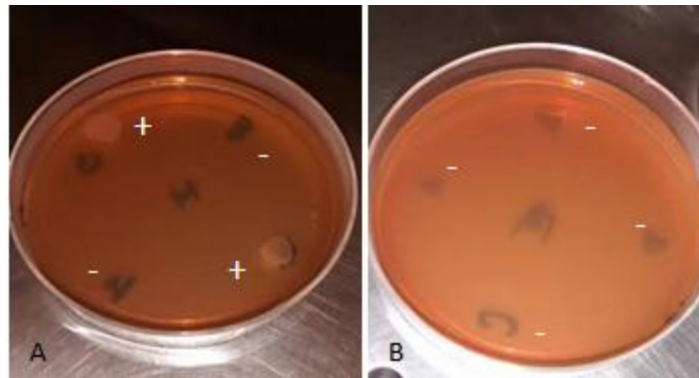
Foram consideradas concentrações citotóxicas aquelas onde o percentual de sobrevivência foi menor que 70%, em relação ao controle negativo e houve diferença estatística significativa. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos duas vezes. Os resultados foram analisados por *one-way ANOVA*, seguido do pós-teste correlativo de Tukey, a fim de determinar diferenças estatísticas significantes ( $p \leq 0,01$ ) (OECD, 1997; ARAUJO-LIMA *et al.*, 2017).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação da atividade biológica

#### 5.1.1. Diluição em ágar

Os extratos hidroalcoólicos (50%, V/V) foram testados em cepas de bactérias Gram positivas, negativas e em leveduras e avaliadas a influência do tempo de extração e determinada a CIM. O primeiro método empregado foi o método de diluição em ágar (FIGURA 7) na concentração de 3mg/mL do extrato bruto (CLSI, 2016).



**FIGURA 7** - Meio fundido com extrato apresentando:  
A) crescimento bacteriano e B) controle negativo.

A análise dos resultados revelou que nesta concentração as cepas bacterianas *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 e ATCC 51299, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. vulgaris* não apresentaram crescimento, como também as três cepas de leveduras (*C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2350 e *C. albicans* ATCC 22019). Enquanto as cepas de *E. coli* ATCC 35218 e ATCC 25922 e de *P. aeruginosa* ATCC 27853 apresentaram crescimento (resistentes) e, portanto, foram excluídas nas diluições posteriores conforme a tabela 6:

**TABELA 6** – Crescimento das cepas em concentrações diferentes do extrato bruto de *Eugenia florida* por diluição em ágar

Cepa	Concentração em mg/mL							
	3	2	1	0,5	0,25	CN	CP	
<i>S. epidermidis</i> (A)	-	-	-	+	+	+	-	
<i>S. aureus</i> (B)	-	-	-	-	+	+	-	
<i>S. aureus</i> (C)	-	-	-	-	+	+	-	
<i>E. faecalis</i> (D)	-	-	-	+	---	+	-	
<i>E. faecalis</i> (E)	-	-	+	+	---	+	-	
<i>S. pyogenes</i> (F)	-	-	-	+	+	+	-	
<i>E. coli</i> (G)	+	---	---	---	---	+	-	
<i>E. coli</i> (H)	+	---	---	---	---	+	-	
<i>K. pneumoniae</i> (I)	-	+	+	---	---	+	-	
<i>P. aeruginosa</i> (J)	+	---	---	---	---	+	-	
<i>P. mirabilis</i> (K)	-	-	+	---	---	+	-	
<i>P. vulgaris</i> (L)	-	-	+	---	---	+	-	
<i>C. parapsilosis</i> (L1)	-	-	+	---	---	+	-	
<i>C. glabrata</i> (L2)	-	-	+	---	---	+	-	
<i>C. albicans</i> (L3)	-	-	+	---	---	+	-	

Legenda: (-) Ausência de crescimento; (+) Crescimento; (+\*) Crescimento moderado; (---) Excluído da diluição por apresentar crescimento na concentração anterior.

Os ensaios realizados com os extratos hidroalcoólicos das folhas de *E. florida* na concentração de 2mg/mL mostraram que a maioria das cepas bacterianas e das três cepas de leveduras não apresentaram crescimento, exceto a cepa de *K. pneumoniae* que apresentou crescimento moderado, representado uma atividade fraca.

Na concentração de 1mg/mL, não houve crescimento nas cepas *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. aureus* ATCC 29213 e ATCC 25923, e nem na cepa *E. faecalis*



ATCC 29212. Enquanto *E. faecalis* ATCC 51299 apresentou crescimento moderado, houve crescimento nas demais cepas bacterianas e leveduras. Estes resultados indicam pouca atividade em uma das cepas de *E. faecalis*, nenhuma atividade em *K. pneumoniae* e nem nas duas cepas de *Proteus*.

Já na concentração de 0,5 mg/mL houve inibição do crescimento das cepas de *S. aureus* (ATCC 29213 e ATCC 25923). Este resultado demonstra atividade parcial nas cepas de *S. epidermidis*, *S. pyogenes* e na cepa selvagem de *E. faecalis*. É apresentada também a ausência de atividade na cepa mais resistente de *E. faecalis*.

Por fim, na concentração de 0,25 mg/mL houve a inibição parcial apenas das cepas de *S. aureus* (ATCC 29213 e ATCC 25923). Logo, não houve atividade antimicrobiana do extrato nesta concentração para as cepas de *S. epidermidis* e *S. pyogenes*.

Os resultados mostraram que o tempo de extração não influenciou na atividade antimicrobiana, pois foram obtidos os mesmos perfis de sensibilidade das cepas aos extratos com 7, 14 e 21 dias de extração.

A tabela 6 mostra às CIM do extrato de *Eugenia florida*, frente às cepas bacterianas testadas.

**TABELA 7** - CIM do extrato de *E.florida* frente às cepas, usado a técnica de diluição em ágar.

	<b>Micro-organismos</b>	<b>CIM diluição do extrato em ágar (mg/mL)</b>
<b>Gram positivos</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	1,0
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,5
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,5
	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	1,0
	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	2,0
	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	1,0

<b>Gram negativos</b>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218)	>3,0
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	>3,0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (700603)	3,0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>3,0
	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 7002)	2,0
	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	2,0
<b>Leveduras</b>	<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	2,0
	<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2350)	2,0
	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	2,0

Segundo Holetz e colaboradores (2002) concentrações iguais ou menores que 1 mg/mL são consideradas satisfatórias contra micro-organismos. Os resultados mostram que os extratos hidroalcoólicos de *Eugenia florida* apresentam uma melhor atividade em bactérias Gram-positivas, principalmente nas cepas de *Staphylococcus aureus* testadas.

Estes resultados estão de acordo com dados na literatura que mostram que os extratos hidroetanólico das partes aéreas de membros do gênero *Eugenia*, *E. uniflora* L. (PESSINI *et al.* 2003) e *Eugenia umbeliflora* (MACHADO, 2005) onde foram utilizadas a mesma metodologia, apresentaram boa atividade frente às bactérias Gram positivas, principalmente *S. aureus*. Esse achado corrobora os dados da literatura no que concerne ao gênero, já que obtivemos também a melhor CIM frente a esse micro-organismo. Este dado é de extrema importância, pois como se trata de uma das espécies bacterianas mais implicadas atualmente em infecções hospitalares resistentes, as novas opções terapêuticas sempre são de extrema importância (SANTOS *et al.*, 2007).

Observa-se claramente uma maior sensibilidade das bactérias Gram positivas frente ao extrato testado, já que foi possível inibir o crescimento destas bactérias em

concentrações de 0,5 mg/mL, valores considerados altamente promissores por vários pesquisadores (HOLETZ *et al*, 2002; ALIGIANNIS *et al*, 2001).

### 5.1.2. Difusão em disco

Na difusão em disco, em nenhuma concentração do extrato bruto foi observado halo de inibição ao entorno dos discos impregnados. Normalmente quando não há formação de halo de inibição, é indicativo de resistência do micro-organismo ao composto testado, porém, tal resultado apresentou-se discrepante das outras metodologias realizadas, onde algumas cepas apresentaram alguma sensibilidade aos extratos de *Eugenia florida* (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Como foi realizado em triplicata e os controles tiveram o perfil esperado, apresentando halo de inibição somente nos controles positivos com o antimicrobiano. Pode-se inferir então que pode ter havido interferência do solvente por conta da difusão do extrato tanto no disco como no ágar ou o tamanho das moléculas presentes no extrato bruto, podem ter sido grandes o suficiente para não difundirem adequadamente neste ensaio. Segundo Ostrosky e colaboradores (2008), esse tipo de problema pode ocorrer, portanto é de grande importância a realização de mais de uma metodologia para avaliar bioatividade, ou mesmo realizar técnicas de *screening*.

### 5.1.3. Microdiluição em caldo

Pelo método da microdiluição foram obtidas as seguintes concentrações, de acordo com a tabela 10, representando as CIM de Gram positivos, Gram negativos e leveduras respectivamente. Nesta técnica foram utilizadas apenas três placas de 96 poços, pois o *screening* realizado anteriormente permitiu reduzir o número de testes para esta metodologia.

**TABELA 8** - CIM do Extrato de *E.florida* frente às cepas testadas por microdiluição.

Bactéria	CIM microdiluição (mg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	1,0
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	1,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	0,5
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 135218)	2,0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	2,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (700603)	2,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	2,0
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 7002)	2,0
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	2,0
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	2,0
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2350)	2,0
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	1,0

As concentrações alcançadas foram relativamente próximas àquelas obtidas pela diluição em ágar, porém com uma discreta redução apresentada pela microdiluição. Por esta técnica incluem-se para prosseguimento dos testes, as cepas que tiveram sua CIM até o limite de 0,5 mg/mL (FIGURA 8).

Na literatura não há uma classificação universal e padronizada sobre os valores de CIM. Aligiannis e colaboradores (2001) expuseram a seguinte classificação: CIM até 0,5mg/mL são inibidores de alta potência; CIM entre 0,6 e 1,5mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6mg/mL são inibidores fracos.

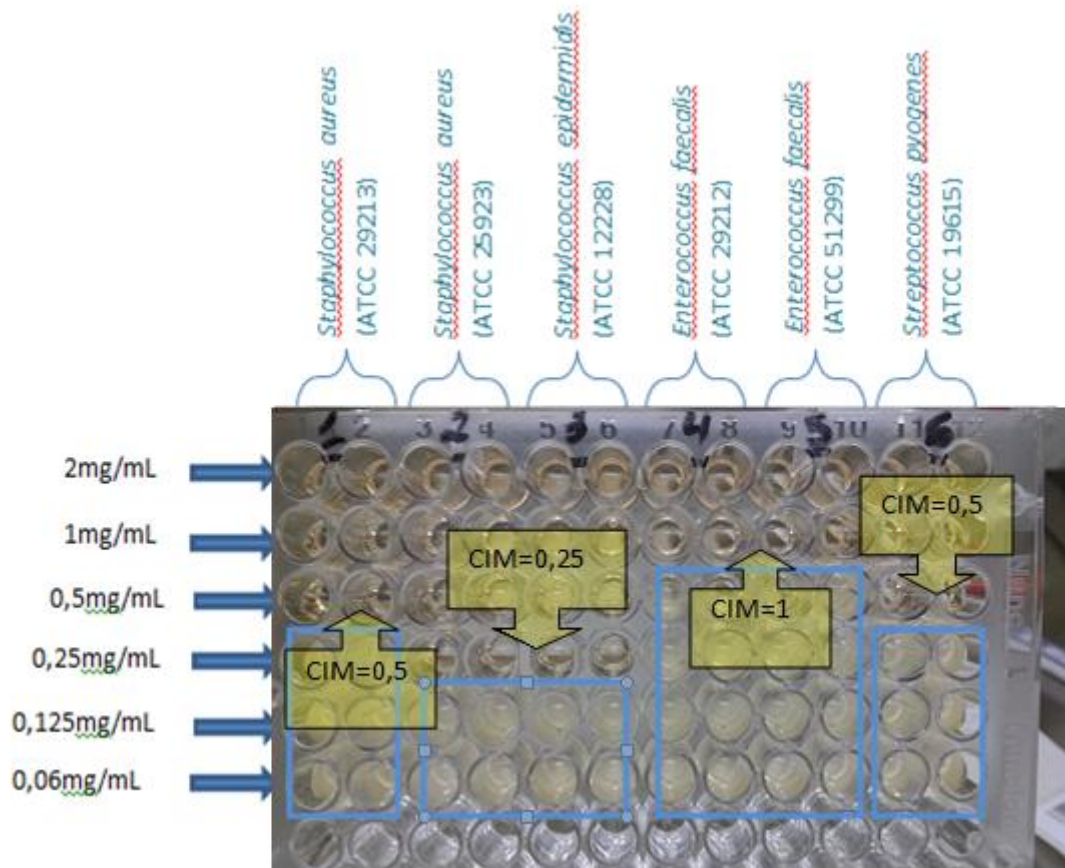
Já Webster e colaboradores (2008) recomendaram um valor de CIM satisfatório até o limite 1000µg/mL, ou seja, 1 mg/mL. Em nosso estudo utilizaremos a primeira classificação, pois nos testes realizados obtivemos inibições entre 0,25 e 2 mg/mL e podemos alocá-las em diferentes categorias. Por conta deste fato consideramos que quando o extrato de *E. florida* apresentou valores abaixo de 1 mg/mL de CIM frente as cepas testadas, o mesmo foi considerado antimicrobiano de alta potência.

As cepas de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) apresentaram este perfil quando expostas ao extrato bruto e então, também foram testadas frente às frações obtidas pela partição líquido – líquido nos solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol.

As cepas de bactérias Gram positivas apresentaram uma CIM menor que 2,0 mg/mL, sugerindo um potencial antimicrobiano bem razoável para este tipo de micro-organismos.

Mohanakrishnan e colaboradores (2013), por meio de estudos com o óleo essencial de *Eugenia uniflora*, demonstraram ação antimicrobiana desta planta contra *S. aureus*. Já o extrato bruto etanólico de *Eugenia caryophyllata*, apresentou excelente atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* em pesquisa realizada por Bayoub e colaboradores (2010).

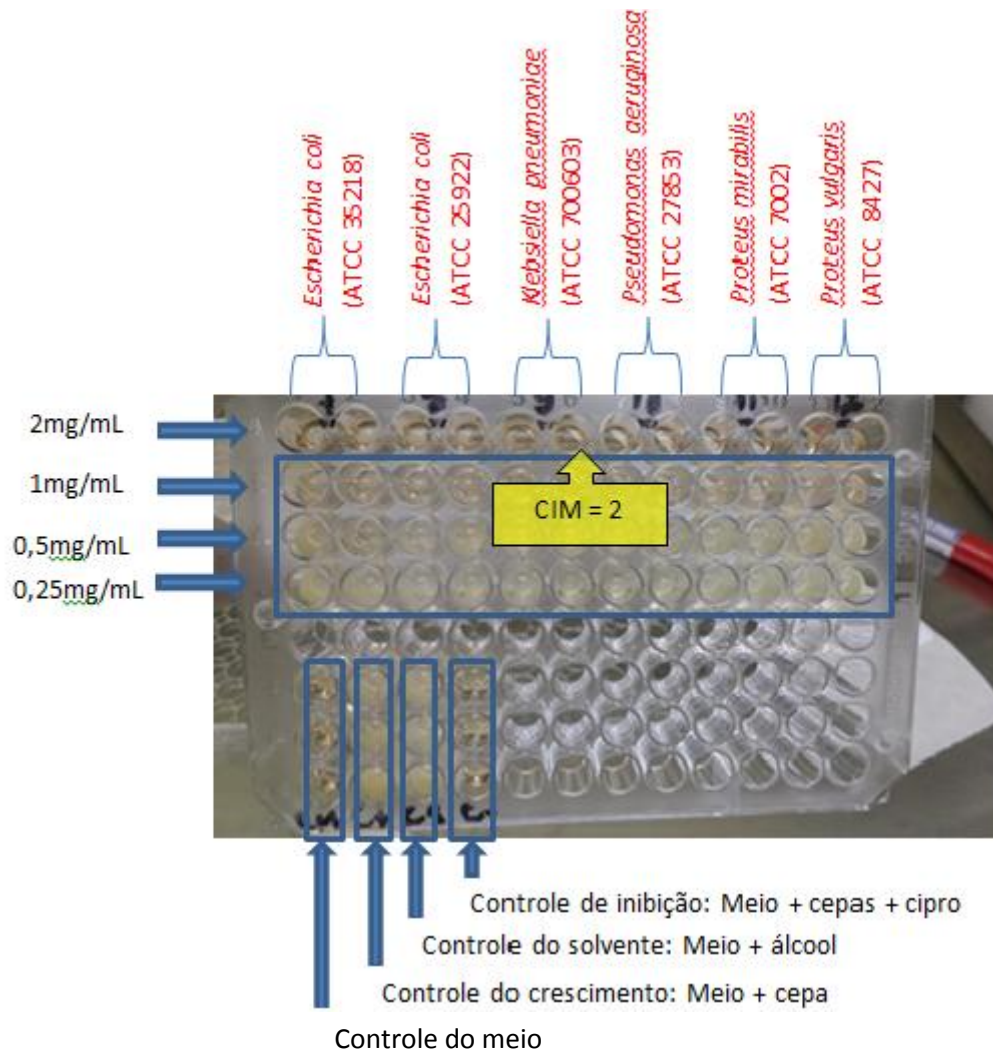
O extrato bruto foi menos eficaz contra as cepas de *Enterococcus faecalis* (CIM=1,0mg/mL), que foram excluídas de serem testadas em frações diferentes do extrato mesmo tendo atividade moderada.



**FIGURA 8** - Placa de microdiluição para teste da CIM do extrato bruto de *E.florida* nas cepas Gram positivas.

Não foi perceptível ainda, nas cepas Gram positivas, discrepâncias entre as cepas de maior resistência de *Enterococcus faecalis*, porém houve diferença de CIM entre a cepa ATCC selvagem e a mais resistente de *Staphylococcus aureus*, sendo a primeira também mais sensível ao extrato de *Eugenia florida* DC.

Todas as cepas Gram negativas, apresentaram uma CIM de 2,0 mg/mL, o que representa uma baixa atividade inibitória sobre as bactérias deste tipo, conforme demonstrado na figura 9. Não houve discrepância na atividade do extrato frente às duas cepas de *Escherichia coli* com relação ao perfil de resistência.



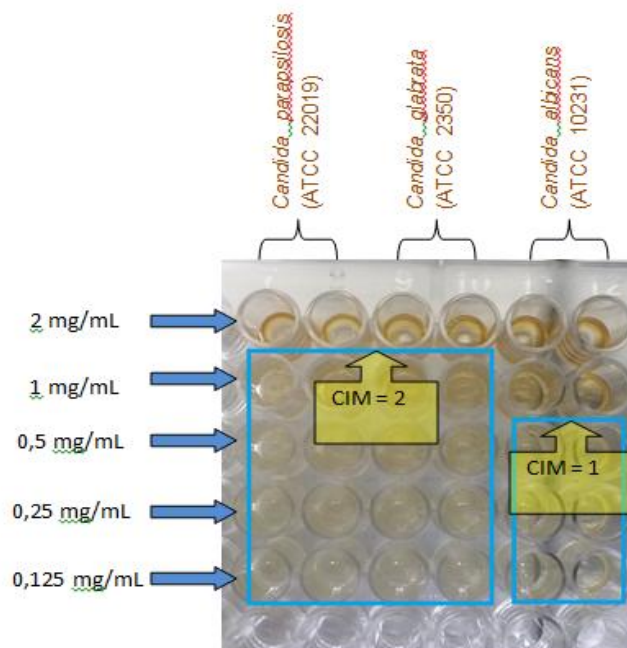
**FIGURA 9** - Placa com a microdiluição do extrato bruto de *E.florida* nas cepas Gram negativas.

A baixa atividade no gênero *Eugenia* frente às bactérias Gram negativas também é demonstrada por Machado (2005), que obteve CIM maiores que 1 mg/mL em *Eugenia umbelliflora*. O mesmo foi evidenciado por De Queiroz e colaboradores (2015), que obtiveram atividade insuficiente, em preparações populares em forma de garrafada, de *Eugenia florida* frente à *Escherichia coli*. O extrato bruto de *Eugenia uniflora* também não apresentou ação antimicrobiana frente à mesma bactéria nos estudos realizados por Souza e colaboradores (2004).

As bactérias Gram positivas apresentam um envelope celular menos complexo quando comparado com as bactérias Gram negativas (MURRAY et al, 2009), tornando-as mais susceptíveis aos antimicrobianos e por sua vez a compostos de potencial antimicrobiano. Junto a esta característica morfológica, muitas bactérias Gram negativas apresentam resistência intrínseca a uma gama de antimicrobianos,

por diversos mecanismos específicos de cada gênero, aumentando o desafio não só de penetração, mas também biodisponibilidade e ação eficaz do composto a ser testado neste tipo bacteriano (ROSSI & ANDREAZZI, 2005; KONEMAN & CURY, 2010)

Com relação as leveduras, o extrato frente a cepa de *Candida parapsilosis* e de *Candida glabrata*, apresentou uma CIM de 2,0 mg/mL, todavia para a cepa de *Candida albicans*, observamos uma CIM de 1,0 mg/mL (FIGURA 10). Este resultado corrobora as pesquisas de Gómez-Quintero (2010), que confirma o perfil mais sensível desta última cepa aos antifúngicos normalmente testados, assim como as cepas isoladas de pacientes em diversas patologias. Auricchio e Bacchi (2003), com extrato bruto de *Eugenia uniflora*, obtiveram atividade satisfatória frente a cepas de *Candida albicans*, porém não obteve sucesso contra leveduras de outras espécies.



**FIGURA 10** - Microdiluição com cepas de leveduras.

#### 5.1.4. Comparação entre a diluição em ágar e a microdiluição

Dentre as duas metodologias empregadas, a microdiluição apresentou valores discrepantes da técnica de *screening* de diluição em ágar, que se pode explicar pela variação do tipo de material usado e da técnica propriamente dita. Segundo Ostrosky e colaboradores (2008), mudanças como temperatura, pH, quantidade e



tipo de meio, condições e tempo de incubação são cruciais para que duas técnicas tenham ou não perfis idênticos.

Araújo (2011) indica a microdiluição, por ser um método mais sensível, como uma técnica mais adequada para a obtenção da CIM em relação a diluição em ágar. Todavia outros autores indicam igualmente o uso desta última metodologia como um ensaio aceitável para obtenção destes resultados (MACHADO, 2005; COSTA, 2015).

De acordo com a tabela 8, podemos comparar os resultados entre as duas técnicas, observando uma concordância com relação à CIM de 50% (6) das cepas analisadas. Entretanto, houve uma redução da CIM no método da microdiluição em relação ao método diluição em ágar nos outros 50% das cepas, que variou de uma a duas diluições. Tal discrepância é muito comum entre metodologias de bases diferentes como diluição e difusão (OSTROSKY *et. al*, 2008).

**TABELA 9** - Comparação entre os valores obtidos entre as duas metodologias empregadas.

Cepa	CIM diluição em ágar (mg/mL)	CIM microdiluição (mg/mL)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	1,0	0,25
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	0,5	0,5
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	0,5	0,25
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	1,0	1,0
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 51299)	2,0	1,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)	1,0	0,5
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 135218)	>3,0	2,0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	>3,0	2,0

---

<i>Klebsiella pneumoniae</i> (700603)	3,0	2,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>3,0	2,0
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 7002)	2,0	2,0
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 8427)	2,0	2,0
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	2,0	2,0
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 2350)	2,0	2,0
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	2,0	1,0

---

Corroborando com as pesquisas de Eloff e colaboradores (1998), Cowan (1999), Gabrielson e colaboradores (2002), Langfield e colaboradores (2004), Cushnie e Lamb (2005), Alves e colaboradores (2008), Ostrosky e colaboradores (2008), Salazar-Aranda e colaboradores (2009) e Palombo (2011) nosso estudo também apresentou uma maior sensibilidade no método da microdiluição, quando compararmos com a técnica diluição em ágar.

Essa metodologia possibilitou a análise de muitas amostras em pequeno volume, um dos critérios fundamentais quando trabalhamos com extratos e compostos vegetais, permite utilizar mais de uma amostra e também diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio. Além destas vantagens, possibilitou a avaliação de resultados quantitativos, como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos em questão.

Em contrapartida, foi interessante observar que a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi exatamente a mesma da CIM obtida, pois o repique derivado do poço desta concentração não apresentou crescimento em meio de cultura após a incubação. Segundo Bianchini e Bedendo (1998) esse tipo de achado sugere que o extrato em questão tenha atividade bactericida e não bacteriostática.

### 5.1.5. Atividade antimicrobiana das frações obtidas

As frações obtidas por partição líquido-líquido de hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e butanol (n-BuOH), foram testadas frente às cepas que apresentaram potencial elevado de sensibilidade ao extrato bruto. A tabela 9 apresenta a CIM por microdiluição de cada fração para as quatro cepas testadas e junto a CIM obtida pelo extrato bruto (EB): *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615). A concentração inicial estabelecida foi de 0,5 mg/mL, maior valor de CIM encontrado pelas cepas testadas e a final foi 0,03 mg/mL. No entanto somente as frações de DCM e AcOEt apresentaram alguma atividade, mesmo que inferior ao obtido no EB, enquanto na fração Hex e n-BuOH não houve atividade satisfatória.

**TABELA 10** - CIM das frações e extrato bruto de *E. florida* DC. em mg/mL

Bactéria	Hex	DCM	AcOEt	n-BuOH	EB
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	>0,5	0,5	0,5	>0,5	0,25
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	0,5
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	>0,5	0,5	0,5	>0,5	0,25
<i>S. pyogenes</i> (ATCC 19615)	>0,5	>0,5	>0,5	>0,5	0,5

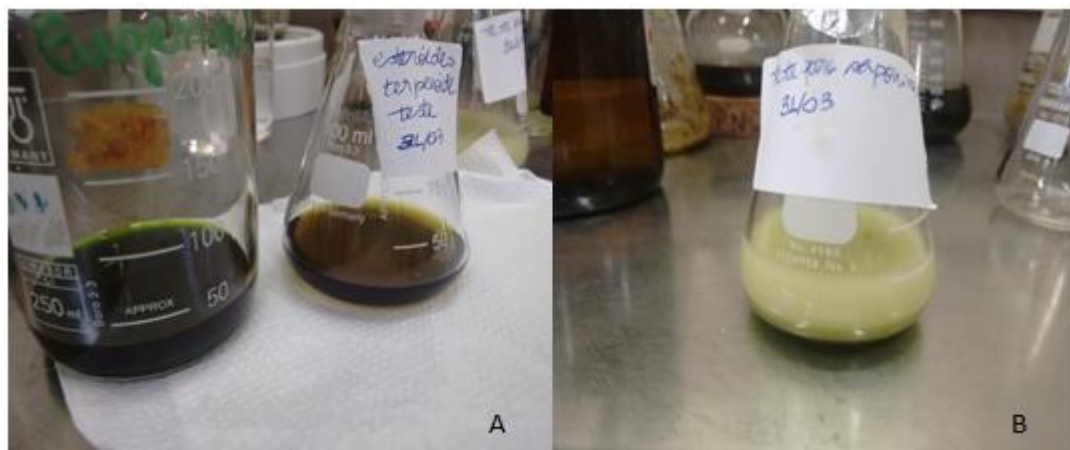
Os resultados obtidos pelas frações podem ser explicados, considerando o possível sinergismo entre os compostos existentes no extrato bruto, que juntos possibilitam o potencial de bioatividade do mesmo. A diminuição da bioatividade das frações DCM e AcOEt relativo ao valor de CIM do extrato bruto pode ter como explicação, a separação dos compostos mais ativos entre as duas frações. Pauletti e colaboradores (2003) sugerem que fatores como a perda de atividade durante a separação cromatográfica e o sinergismo dos compostos podem influenciar nos resultados da atividade antimicrobiana. Esta afirmação permite levantar uma hipótese de que a atividade observada neste estudo seja devida ao sinergismo das substâncias com bioatividade do extrato bruto.

## 5.2. Ensaio de prospecção fitoquímica de *Eugenia florida* DC.

Segundo De Queiroz (2015), o perfil químico das espécies de *Eugenia* spp. demonstram uma composição química variada e dependente do estágio de desenvolvimento no ciclo de vida e, principalmente, das variações climáticas. As espécies do gênero *Eugenia*, em geral possuem flavonoides, triterpenoides, chalconas, taninos e algumas espécies, saponinas (DE QUEIROZ, 2015). Entretanto não foram encontrados estudos fitoquímicos com *Eugenia florida* para posterior discussão entre resultados interespecie.

### 5.2.1. Testes de identificação

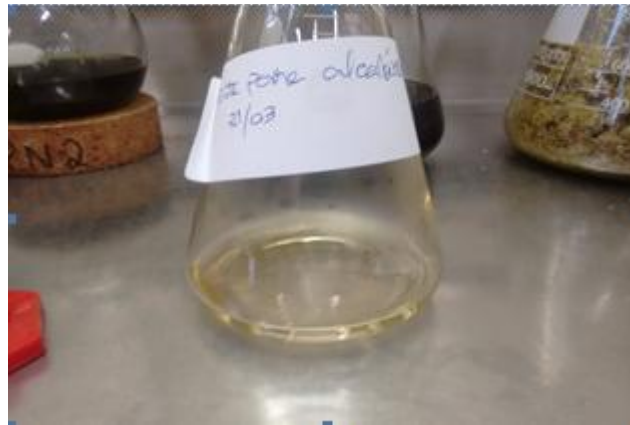
Os testes de prospecção fitoquímica feitos com os extratos hidroalcoólicos de *Eugenia florida* com 7, 14 e 21 dias de armazenamento sugeriram a presença de triterpenoides, uma vez que as soluções apresentaram uma coloração avermelhada após o teste de Libermann Burchard. Nos testes realizados com estas mesmas amostras, também se pôde observar a presença de uma camada de espuma, o que sugere a presença de saponinas, como pode ser observado na figura 11.



**FIGURA 11** - Testes positivos para triterpenoides em A e saponinas em B.

(A) Coloração verde a esquerda no controle negativo e amostra positiva a direita, com coloração avermelhada, para o teste de triterpenoides e negativa para esteroides por não ter apresentado cor azul. (B) Teste positivo pela presença persistente de camada de espuma.

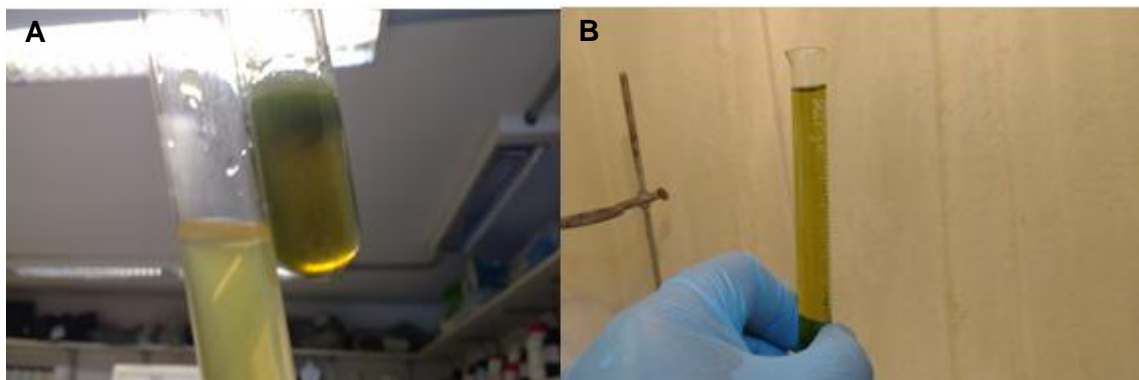
Os testes foram negativos para a presença de esteroides e alcaloides, pois no primeiro não apresentou cor azul e no segundo não apresentou os precipitados insolúveis. Podemos observar o teste negativo para alcaloides na figura 12.



**FIGURA 12.** Teste negativos para alcaloides

Para taninos o teste de  $\text{FeCl}_2$  apresentou positivo (FIGURA 13), sendo evidenciado pela coloração verde. Segundo Scalbert (1991) a presença de taninos pode conferir atividade antimicrobiana a um extrato. Dessa maneira, sua presença no extrato analisado, pode ser um dos fatores potencializadores da atividade encontrada.

Em contrapartida o teste para flavonoides, foi negativo, não demonstrando mudança na coloração (FIGURA 13).



**FIGURA 13.** Teste positivo para taninos em A e negativo para flavonoides em B.

(A) Controle negativo a esquerda e teste positivo, com formação de coloração verde, para a presença de taninos. (B) Teste negativo para flavonoides, não apresentando mudança na coloração do extrato bruto.

Os resultados, evidenciados na tabela 10, corroboram com a atividade antimicrobiana das frações obtidas, pois estes compostos são apontados na literatura como responsáveis por este tipo de bioatividade (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Os resultados negativos não excluem a presença dos compostos relacionados, como por exemplo, os flavonoides, pois a metodologia aplicada pode 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).

**TABELA 11** - Resultado dos testes de prospecção fitoquímica.

Fitoconstituente	Teste realizado	EXT.	EXT.	EXT.
		7d	14d	21d
Esteroides	Teste Libermann Burchard	-	-	-
Triterpenos	Teste Libermann Burchard	+	+	+
Saponinas	Teste de espuma	+	+	+
Flavonoides	Teste de Shinoda	-	-	-
Taninos	Teste de FeCl <sub>2</sub>	+	+	+
Alcaloides	Teste de Dragendroff	-	-	-

### 5.2.2. Separação das classes por CCD

Os melhores resultados foram obtidos utilizando hexano/acetato de etila (1:4) como eluente e vanilina sulfúrica e lâmpada de ultravioleta como reveladores. Os índices de retenção (Rf) foram calculados, na primeira faixa o Rf das manchas foi 0,15 e na segunda de 0,3.

Estes dados, juntamente com os resultados de prospecção fitoquímica, sugerem que os componentes presentes no extrato bruto são em sua maioria terpenoides e saponinas, sendo estes provavelmente, os responsáveis pela a atividade antimicrobiana apresentada por *Eugenia florida*, assim como nos resultados obtidos em extratos de *Gochnatia polymorpha* (STEFANELLO *et al.*, 2006), corroborando com os resultados obtidos nos testes fitoquímicos qualitativos.

Esses achados corroboram com outros autores, o que indica que as classes obtidas a partir do extrato bruto de *Eugenia florida* são características do gênero desta planta. Panizza (1998) registrou nos extratos das folhas de *Eugenia uniflora*, além de taninos e flavonóides, a presença de saponinas. Gu e colaboradores (2001) com *Eugenia sandwicensis*, detectaram a presença de triterpenos livres e saponinas com grande ação antimicrobiana.

Triterpenos com o esqueleto lupano, derivados do lupeol, como o ácido 6 $\alpha$ -Hidroxibetulínico, ácido platânico e ácido betulínico, além de um esteroide, o  $\beta$ -sitosterol, foram isolados das folhas e caules de *Eugenia moraviana*, por Lunardi e colaboradores (2001). Tal classe também foi predominante em extratos de *Eugenia puniceifolia*, quando estudada por Oliveira e colaboradores (2005).

Nos estudos de Yang e colaboradores (2000), com *Eugenia jambos*, foram isolados dois taninos, 1-Ogaloilcastalgina e casuarinina do extrato acetônico a 70 %, com ação bactericida e antitumoral. Segundo as pesquisas de Tanaka e colaboradores (1996), do extrato acetônico das folhas de *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia), foram isolados os taninos sizigininas e eugenina .

Os taninos também foram isolados de *Eugenia uniflora*, por Lee e colaboradores (1997), como a eugenina e a oenoteína, além do flavonoide miricitrina. Das folhas de *Eugenia jambolana* foram isolados por Timbola e colaboradores (2002), os flavonóides miricetina, quercetina e miricitrina. Em pesquisas realizadas por Hussein e colaboradores (2003) também foram encontradas as mesmas substâncias nesta planta.

A classe dos flavonoides está presente em várias espécies de *Eugenia*, embora não tenha sido encontrada em nossa prospecção fitoquímica com *Eugenia florida*. Porém, pode estar presente em concentrações mínimas, assim como em *Eugenia kurzil*, em estudos realizados por Painuly e Tandon (1983).

Em *Eugenia florida*, ainda não há estudos de prospecção fitoquímica relacionados à atividade antimicrobiana e antifúngica. Porém Frighetto e colaboradores (2005) isolaram o ácido betulínico desta planta, substância que tem ação antitumoral, antimalárica, anti-inflamatória e antirretroviral, sugerindo grande potencial bioativo de *Eugenia florida*.

Em uma revisão de artigos sobre atividade antimicrobiana de plantas medicinais, Rios e Recio (2005) sugeriram que o maior problema com as pesquisas ainda continua sendo a falta de homogeneidade nos critérios selecionados para estudar a atividade. Segundo eles, isso geralmente leva a contradições entre os resultados obtidos por diferentes grupos e até para o mesmo autor estudando a mesma amostra com diferentes métodos.

### **5.3. Avaliação da atividade citotóxica pelo teste de letalidade contra *Artemia salina***

Vários estudos tentaram correlacionar a toxicidade contra *Artemia salina* usando atividades como antifúngico, virucida e antimicrobiana (ARCANJO, 2012). O bioensaio com *Artemia salina* é um teste simples, rápido e de baixo custo, e pode ser realizado em laboratórios simples de pouca complexidade, já que para esse procedimento não há necessidade de técnicas assépticas (LIEBERMAN, 1999).

No teste de *Artemia salina*, para a verificação do potencial de toxicidade, utilizamos as concentrações de 3500, 3000, 2500, 2000 1000 e 500 µg/mL do extrato hidroalcoólico, pois estas são concentrações semelhantes aquelas onde encontramos atividade antimicrobiana (FIGURA 14 e 15).

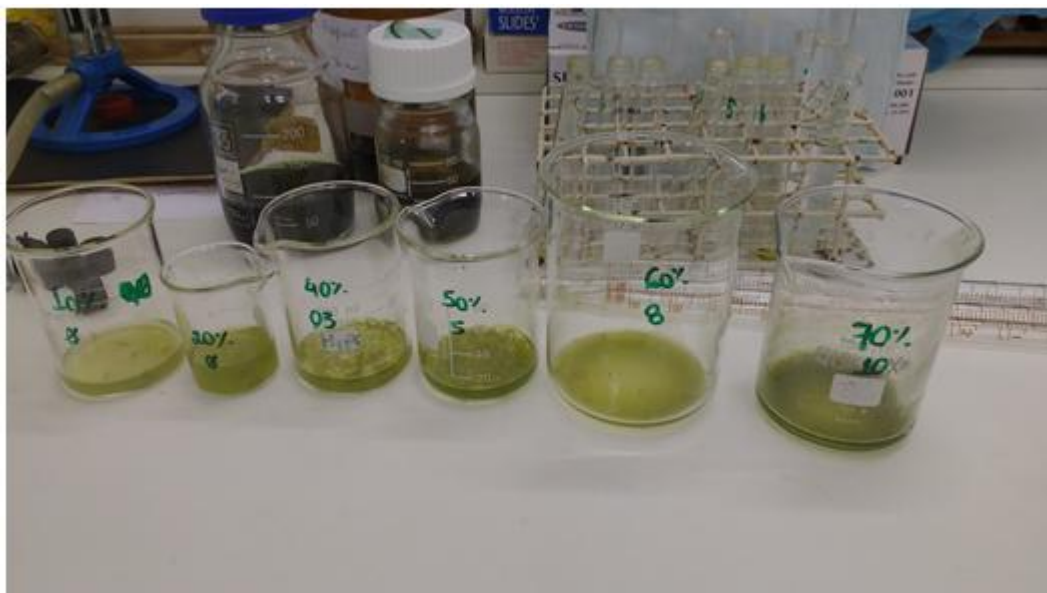
Seguindo as recomendações de (DOLABELA 1997), foram colocadas dez larvas em cada tubo de ensaio que ficaram por até 24 horas em contato com as concentrações diferentes do extrato e o teste foi realizado em triplicata. Após este tempo foi contabilizada a taxa de letalidade e foram obtidos os seguintes resultados de acordo com tabela 11:

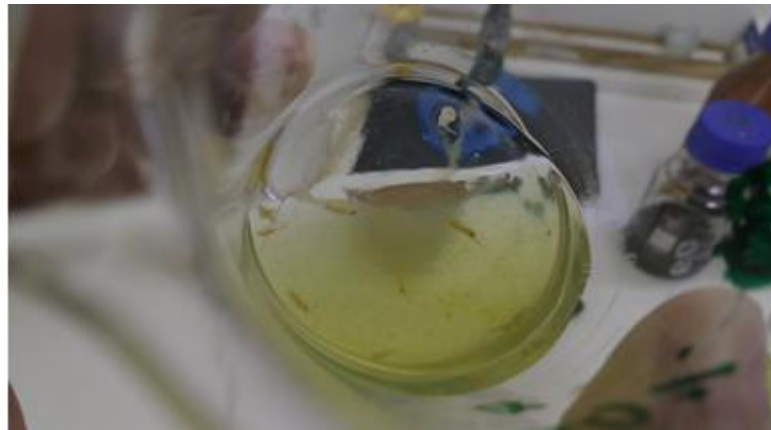


TABELA 12 - Concentração do extrato e DL<sub>50</sub>

Concentração do extrato bruto µg/mL	Nº de mortes	DL <sub>50</sub>
500	0	-
1000	0	-
2000	3	-
2500	5	+
3000	8	-
3500	10	-

O resultado obtido com o teste de *Artemia salina* indicou a DL<sub>50</sub> de 2500, que é cinco vezes o limite de baixa toxicidade proposto por Dolabela (1997), o que demonstra um resultado positivo para uso medicinal, já que a toxidez é considerada baixa quando a dose letal 50% (DL<sup>50</sup>) for superior a 500 µg/mL, moderadamente para DL<sup>50</sup> entre 100 a 500 µg/mL e muito tóxica quando a DL<sup>50</sup> < 100 µg/mL.

FIGURA 14 - Diluições para o teste de *Artemia salina*



**FIGURA 15** - Larvas de *Artemia salina* no extrato de *E. florida*

De acordo com Talalay (2001), todo produto natural habitualmente utilizado em terapêutica necessitaria ser submetido a testes de eficácia e segurança por métodos idênticos aos usados por novos fármacos sintéticos, pelo risco que apresenta um consumo.

A aquisição de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada, por conta de motivos éticos, morais e legais. Desta forma, as informações toxicológicas sobre substâncias químicas são obtidas principalmente por testes toxicológicos pré-clínicos, com animais de laboratórios em condições padronizadas (MORTON, 1998; BOELSTERLI, 2003).

Em nossa busca bibliográfica, não foram encontrados estudos com avaliação da toxicidade da espécie *Eugenia florida*. Entretanto, em pesquisa realizada por Albuquerque e colaboradores (2007) com o gênero *Eugenia*, foi encontrada uma  $DL^{50}$  de 248  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em extratos da espécie *Eugenia uniflora*, o que expressa uma toxicidade moderada desta planta. No mesmo estudo são apresentadas plantas de outros gêneros, como *Moringa oleífera*, *Justicia pectoralis* e *Equisetum sp.* que apresentaram valores acima de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , representando a segurança para consumo devido a não toxicidade.

A metodologia de testes *in vitro* utilizada nestes estudos, apesar de ser a mesma aplicada neste trabalho apresentou resultados bem mais tóxicos no mesmo gênero da planta testada, todavia espécies diferentes dentro do mesmo gênero

podem possuir uma grande diversidade de produtos químicos disponíveis e que precisam ser avaliados com muita cautela. Além disso, Sabe-se que condições ambientais podem provocar variações significativas na produção de metabólitos secundários nos vegetais (D'ANGELIS & NEGRELLE, 2014).

Embora os estudos de toxicidade tenham uma correlação com a atividade antitumoral, antimicrobiana entre muitas outras, o teste de *Artemia salina* tem como princípio a segurança, pois dependendo da DL<sup>50</sup> podemos inferir que o composto testado não seja tóxico para o consumo humano. Por este fato é importante a realização deste teste em estudo com plantas medicinais. (DOLABELA, 1997; TALALAY, 2011).

#### 5.4. Teste de AMES

Os resultados da mutagenicidade de *Eugenia florida* estão apresentados na Tabela 12 e estão expressos pelo número de revertentes (FIGURA 16), seus respectivos desvios padrões (DP) e índice de mutagenicidade, para as cinco linhagens de *S. Typhimurium*.

As cepas TA97 e TA98 foram consideradas não mutagênicas, no entanto citotóxicas para células procariontes na concentração de 10 µL. Já as cepas TA100, TA102 e TA104 não apresentaram mutagenicidade até a concentração de 1000 µL.

**TABELA 12** - Resultado do ensaio *Salmonella*/ microsossoma após co-incubação com o extrato de *Eugenia florida*.

Concentração em µL/mL	TA97	TA98	TA100	TA102	TA104
0.0	63 ± 0 (1.0)	24 ± 2 (1.0)	122 ± 16 (1.0)	526 ± 60 (1.0)	509 ± 50 (1.0)
0.1	95 ± 7 (1.5)	21 ± 2 (0.9)	123 ± 8 (1.0)	576 ± 4 (1.1)	542 ± 33 (1.1)
1	108 ± 0 (1.7)	21 ± 2 (0.9)	124 ± 4 (1.0)	516 ± 20 (1.0)	539 ± 4 (1.1)

10	Citotóxico	Citotóxico	128 ± 4 (1.0)	513 ± 22 (1.0)	557 ± 25 (1.1)
100	-	-	128 ± 1 (1.0)	586 ± 33 (1.1)	602 ± 22 (1.2)
1000	-	-	131 ± 14 (1.1)	602 ± 39 (1.1)	749 ± 22 (1.5)
CP	155 ± 30	110 ± 6	1568 ± 85	4000 ± 380	1858 ± 160

Valores médios ± DP (IM) de colônias His + revertentes de estirpes de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. DP: desvio padrão; IM: índice de mutagenicidade; CP: controle positivo; Controles positivos: Óxido de N-4-Nitroquinolina (1,0 µg) para TA97 e para TA98; Azida Sódica (1,0 µg) para TA100; Mitomicina C (0,5 µg) para TA102; Metilmetano sulfonato (250,0 µg) para TA104.

Podemos observar que todos os índices de mutagenicidade, para todas as linhagens e em todas as concentrações, foram menores do que 2,0, o que indica que este extrato padronizado não foi mutagênico para nenhuma linhagem utilizada.



**FIGURA 16** - Crescimento de colônias revertentes no controle negativo, no controle positivo e na amostra respectivamente.

Não foram encontrados até o momento na literatura nacional e internacional, outros trabalhos que tenham realizado este teste na espécie *Eugenia florida*, o que sugere a ineditabilidade deste estudo.

Comprovando este fato, outras pesquisas com plantas medicinais também reforçam que poucas espécies têm sido testadas na avaliação do seu potencial mutagênico. Um destes estudos, onde a metodologia de Ames foi aplicada, realizado por Mazzolin e colaboradores (2010), pesquisando a *Qualea parviflora*,

planta medicinal usada popularmente como antisséptica e anti-inflamatória. Essa pesquisa contribui muito para a segurança do uso desta planta, já que o teste foi negativo para a mutagenicidade de seu extrato.

Em outros estudos semelhantes, Esteves-Pedro e sua equipe (2012) e Chen e colaboradores (2013), obtiveram resultados negativos para mutagenicidade no teste de Ames em dois estudos com produtos usados popularmente, pesquisaram respectivamente, *Dipteryx alata*, pertencente a família das leguminosas e *Lignosus rhinocerotis*, um cogumelo utilizado na medicina tradicional contra febre, asma e câncer.

Porém não podemos afirmar que plantas do mesmo gênero não apresentem potencial mutagênico distinto, pois *Qualea multiflora* e *Qualea grandiforma*, plantas medicinais utilizadas para tratar problemas gastrointestinais e como anti-inflamatórios, apresentaram atividade mutagênica quando avaliadas pelo Teste de Ames por Santos e colaboradores (2011), sendo um resultado discrepando do estudo anterior com *Qualea parviflora* (MAZZOLIN *et al.*, 2010) Este estudo demonstrou que mesmo plantas utilizadas popularmente, não estão isentas de possíveis efeitos danosos ao usuário e que estudos deste tipo devem ser estimulados em todas as preparações empregadas pela população.

Muitas plantas estão não só isentas de potencial mutagênico nas concentrações normalmente consumidas, mas também podem ser antimutagênicas e anticarcinogênicas de acordo com Arriaga-Alba e colaboradores (2013). Entre os compostos presentes nestas plantas e que são relacionados na literatura como responsáveis por esta atividade, estão os polifenóis, vitaminas e terpenos (ARRIAGA-ALBA *et al.*; 2013).

## 6. CONCLUSÕES

- O extrato bruto de *Eugenia florida* DC. apresentou uma boa atividade antimicrobiana contra a maioria das cepas testadas, porém a maior atividade se deu contra as bactérias Gram-positivas, principalmente nas cepas de *Staphylococcus aureus*. Sabendo que esta espécie é altamente patogênica, e com tendência a apresentarem multirresistência, o resultado obtido é um indicativo muito relevante, esta atividade, para futuros usos no controle da colonização hospitalar e infecções atribuídas a este tipo de micro-organismo.
- Tendo em vista o baixo nível de toxicidade e mutagenicidade do extrato das folhas de *E. florida*, há a possibilidade de ser utilizado de forma segura, além do potencial para utilização na Indústria Farmacêutica.
- Embora tenhamos detectado classes fitoquímicas relacionadas a atividade antimicrobiana, acreditamos que o sinergismo entre os compostos do extrato bruto pode resultar em um maior potencial bioativo, comparado ao das frações obtidas;
- O grande número de passos no processo de pesquisa de compostos de potencial antimicrobiano aumenta o número de variáveis, justificando as discrepâncias entre os estudos. Por este motivo, é importante a padronização e validação dos testes em todas as etapas da pesquisa, para aumentar a confiabilidade, reprodutibilidade dos resultados obtidos e auxiliar os atuais e futuros pesquisadores na escolha de um protocolo adequado.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar testes complementares para a avaliação de citotoxicidade e hepatotoxicidade;
- Identificar os metabólitos que possam conter a bioatividade de interesse;
- Publicação Científica relacionada ao estudo em questão;
- Desenvolver um fitoterápico ou uma monografia para uso do SUS;
- Ampliar os estudos realizados para o extrato de *E. florida* cultivada ao longo do ano, verificando possíveis condições de estresse ambiental;
- Realizar ensaios biológicos com outras partes da planta;

## 8. REFERÊNCIAS

AKERELE, O. Medicinal Plants and Primary Health Care: an Agenda for Action. **Fitoterapia**. N. (5): 355-63, 1988.

ALBUQUERQUE, U.P. *et al.* Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of thnopharmacology**, vol. 114, no. 3, p. 325-354, 2007.

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.

ALMEIDA, D. J. DE; FARIA, M. V.; SILVA, P. R. D. Biologia experimental em Pitangueira: uma revisão de cinco décadas de publicações científicas / Experimental biology in pitangueira: a review of five decades of scientific publications. **Revista Ambiência**, v. 8, n. 1, p. 159–175, 2012.

ALMEIDA, E. R. DE. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. São Paulo, SP, Brasil: Hemus, 1993.

ALONSO, R.J. **Tratado de fitomedicina-bases clínicas e farmacologycas**. Buenos Aires: I Ed. Isis, 1998.

ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, São Paulo , v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008 .

AMES B. N.; YAMASAKI E. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, em *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their detection*, Hollander, A, Cap. 9, Ed., New York, Plenum Press, 1971.

ARAÚJO, I. S. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará**. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia. Feira de Santana, Bahia.: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2011.

ARAUJO, Y. L. F. M. DE *et al.* Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, p. 1–4, 2011.

ARAUJO-LIMA, C.F. *et al.* Pharmacokinetic and Toxicological Evaluation of a Zinc Gluconate-Based Chemical Sterilant Using In Vitro and In Silico approaches. **BioMed Research International**, 8p, 2017.



- ARCANJO, D.D.R. *et al.* Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, 72(3), 505-509, 2012.
- ARRIAGA-ALBA, M. *et al.* Antimutagenicity mechanisms of the *Rhoeo discolor* ethanolic extract. **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 63, p.243-248, 2011.
- 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.
- AYRES, M. C. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 90–7, 2008.
- BARON, E. J.; FINEGOLD. S. M. **Bailey & scott`s - Diagnostic microbiology**, 8 ed. The C. V. Mosby Co: St. Louis, 1990.
- BAQUERO, F.; BLAZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance. **Trends in ecology & evolution**, v. 12, n. 12, p. 482–487, 1997.
- BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493–496, 1966.
- BAYOUB, K. *et al.* Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.27, p.4251- 4258, 2010.
- BEELEN, P. M. G. *et al.* Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 910-917, 2006.
- BESSA, N. G. F. D. *et al.* Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde - Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692–707, 2013.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia agricola**, Piracicaba , v. 55, n. 1, p. 149-152, 1998.
- BOELSTERLI, U.A. Animal models of human disease in drug safety assessment. **Journal Toxicological Sciences**, v.28, n.3, p.109-21, 2003.
- BRAGA, F. C. *et al.* Estudo fitoquímico de *Erythraea centaurium*, *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos

para o fitoterápico Ierobina®. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 28–31, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 48. **Resolução - RDC No 48, de 16 de março de 2004**. Diário Oficial da União, 2004.

BRASIL. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 1a. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Ministério da Saúde elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Diário Oficial da União, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**, 2011.

BRASIL. **Uso racional de medicamentos: temas selecionados**. [s.l.] Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos., 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RDC nº13, de 14 de março de 2013. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação Produtos Tradicionais Fitoterápicos**. Diário Oficial da União, 2013.

BRITO, A.; SILVA, G.; FIGUEIRA, A. Avaliação da Toxicidade de Plantas Medicinais Brasileiras por meio do Bioensaio com *Artemia salina*. **JIC-Jornada de Pesquisa e Iniciação Científica**, v. 3, n. 3, 2012.

BUSSMANN, R.W. Modern Trends in Applied Terrestrial Ecology. **Ethnobotany and Biodiversity Conservation**.. 345-362. NK. 2002.

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.

CAMPOS, A.C. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. *American Journal of Infection Control*. 44(11):1374-1380, 2016.

CAVALCANTI FILHO, J. R. N. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de óleos essenciais extraídos de *Buchenavia tetraphylla***. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas—[s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

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.

CHEN, T.-I. *et al.* Mutagenicity and genotoxicity effects of *Lignosus rhinocerotis* mushroom mycelium. **Journal of ethnopharmacology**, 2013.

CLAXTON, L. D. The development, validation and analysis of *Salmonella* mutagenicity the methods for environmental situation. In: **Microscale testing in aquatic toxicology: advances, techniques and practice**, 1997.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement**. Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.

COSTA, B. DE L. **Avaliação da composição química e das atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos de *Eugenia uniflora***. Monografia de Bacharelado em Farmácia—Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2015.

COSTA, E. M. M. DE B. *et al.* Estudo in vitro da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 175–180, 2010.

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

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CRUZ, M. T. DA. Fitoterápicos: estudos com plantas para fins terapêutico e medicinal. **Acervo da Iniciação Científica**, n. 1, 2013.

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

D'ANGELIS, A.S.R.; NEGRELLE, R.R.B. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum: aspectos botânicos, ecológicos, etnobotânicos e farmacológicos. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 607-617, 2014 .

DE LIMA, É. R. *et al.* Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra microorganismos. **Saber Científico**, v. 3, n. 1, p. 53–69, 2011.

DE QUEIROZ, J. M. G. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 9, n. 2, p. 87–100, 2015.

DE QUEIROZ, J. M. G. *et al.* *Eugenia florida*: atividade antimicrobiana e prospecção química. **Symposium CNTP**, Farmanguinhos - Fiocruz. Rio de Janeiro, 2015.

- DEVIENNE, K. F.; RADDI, G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 11–14, 2004.
- DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed ed. Chichester, West Sussex, England ; New York, NY, USA: Wiley, 2002.
- DI STASI, L. C. (ED.). **Plantas medicinais: arte e ciência ; um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo, SP: Editora Unesp Fundação, 1995.
- DOLABELA, M. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti *Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. 128p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1997.
- DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. DE. Foliar anatomy of *Eugenia florida* DC.(Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 759–770, 2009.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, p. 17, 2006.
- ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Herbal Medicine in Primary Care**. São Paulo: Manole, 2001.
- ELOFF, J.N. A Sensitive an quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extract for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.
- ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A. Antifungal agents and susceptibility testing. In: MURRAY, P. R. *et al.* **Manual of Clinical Microbiology**, 6 ed. Washington: ASM, 1995.
- ESTEVEZ-PEDRO, N. M.; *et al.* *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Dipteryx alata* Vogel extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- FALCAO, D. Q. *et al.* Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 1, p. 73-76, 2006.
- FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.
- FLECKNELL, P. **Replacement, reduction and refinement**. **ALTEX**, v. 19, n. 2, p. 73–78, 2002.

- FRIGHETTO, N. *et al.* Purification of Betulinic Acid from *Eugenia florida* (Myrtaceae) by High-speed Counter current Chromatography Phytochemical Analysis, 16: 411–414, 2005.
- FROEHNER, S.; LEITHOLD, J.; LIMA JÚNIOR, L. F. Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 2016–2019, 2007.
- GABRIELSON, J. *et al.* Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.
- GARBATI, M. A.; AL GODHAIR, A. I. The growing resistance of *Klebsiella pneumoniae*; the need to expand our antibiogram: case report and review of the literature. **African Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 8–10, 2013.
- 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.
- GÓMEZ-QUINTERO, C. H. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. **Infectio**, v. 14, p. s172–s180, 2010.
- GOVAERTS, R.; *et al.* **World Checklist of Myrtaceae**, Kew: Royal Botanic Gardens, v.1, 2008.
- GRANGEIRO, M. S. *et al.* Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 26–30, 2006.
- GRIGGS, B. Green Pharmacy. The History and Evolution of Western Herbal Medicine. **Healing Arts Press**. Rochester ,Vermont, 1996.
- GU, J.Q. *et al.* Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. **Phytochemistry**, v.58, p. 121–127, 2001.
- 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** 97: 1027-1031, 2002.
- HUSSEIN, S.A.M. *et al.* Polyoxigenated flavonoids from *Eugenia edulis*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 883- 889, 2003.

KESZEI, A. *et al.* Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 71, p. 844–852, 2010.

KONEMAN, E. W.; CURY, A. E. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2010.

LACAZ, C. DA S. **Antibióticos**. 3. ed. São Paulo: Editora Sarvier, 1969.

LAMARCA, E. V. *et al.* Contribuições do conhecimento local sobre o uso de *Eugenia* spp. em sistemas de policultivos e agroflorestas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 3, p. 119–130, 2013.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, p. 508–536, 1997.

LANGFIELD, R.D. *et al.* Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 279-281, 2004.

LAZZARINI, A. **Fitoterápicos: histórico, tendências, oportunidades e desenvolvimento internacional**. São Paulo, Conferência sobre Mercado de Fitoterápicos, 2002.

LEE, C. R. *et al.* Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Frontiers in Microbiology**. vol .7. 895p., 2016

LEE, M. *et al.* Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v.44, p. 1343-1349, 1997.

LEITE, P. E. C. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Eugenia punicifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 111, n. 6, p. 1652–1660, 2010.

LIEBERMAN, M. A Brine Shrimp Bioassay for Measuring Toxicity and Remediation of Chemicals. **Journal of Chemical Education**, 76 (12), 1689. 1999.

LING, L. L. *et al.* A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455–459, 2015.

LÔBO, K. M. S. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) DF Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 2, p. 227–233, 2010.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, 1(1):19-27, 2006.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LUNARDI, I. *et al.* Triterpenic acids from *Eugenia moraviana*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 2, p. 180-183, 2001.

MACHADO, K. E. **Atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas da *Eugenia umbelliflora* BERG**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, 2005.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation. Resistance**, v.113, p.173-215, 1983.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MATSUCHITA, H. L. P.; MATSUCHITA, A. S. P. A Contextualização da Fitoterapia na Saúde Pública. **UNICIÊNCIAS**, v. 19, n. 1, 2015.

MAZZOLIN, L. P. *et al.* *Qualea parviflora* Mart.: An integrative study to validate the gastropotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. **Journal of ethnopharmacology**, v. 127, p.508-514, 2010.

MCCANN, J. *et al.* Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* / microsome test. Assay of 300 chemicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 72 p. 5135-5139, 1975.

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. 534p. 112–137, 1993.

MCLAUGHLIN J.L.; ROGERS, L. L. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Inform Journal**. 32:513–524, 1998.

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.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399–406, 2007.

MOHANAKRISHNAN, M. *et al.* Composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Eugenia uniflora* L. leaves growing in India. **International Journal Biomedical Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.1, p.46-49, 2013.

- 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.
- MORTELMANS K & ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Resistance**. 450, p. 29-60, 2000.
- MORTON, D.M. Importance of species selection in drugtoxicity testing. **Toxicology Letters**, v.102, p.545- 50, 1998.
- MUELLER, J. H.; HINTON, J. A Protein-Free Medium for Primary Isolation of the *Gonococcus* and *Meningococcus*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 48, n. 1, p. 330–333, 1941.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 6 ed. Ed. Elsevier, 2009.
- NASCIMENTO, J.E. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (*Phyllanthaceae*). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 29, n.2, p. 143- 148, 2008.
- NELSON, K. E. *et al.* Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 1175-1194, 1997.
- 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**. Vol IV 221-39, 2010.
- NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011.
- OECD. Guideline 471 for testing chemicals by Bacterial **Reverse Mutation Test**, 1997.
- OLIVEIRA, R.N. de; DIAS, I.J.M.; CAMARA, C.A.G. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia punicifolia* (HBK) DC. de diferentes localidades de Pernambuco. **Revista brasileira de farmacognosia**, João Pessoa , v. 15, n. 1, p. 39-43, 2005 .
- OPLUSTIL, C. P. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010.
- 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.



- PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.
- PAINULY, P.; TANDON, J.S. Two 3-C-methylflavone glycosides from *Eugenia kurzii*. *Phytochemistry*, v. 22, n.1, p.243 - 245, 1983.
- PALOMBO, E.A. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1- 15, 2011.
- PANIZZA, S. **Plantas que curam (Cheiro de Mato)**. 3ª edição. São Paulo: IBRASA, 1998.
- PANTOJA, S. C. S.; NEVES, C. F. S. Levantamento das espécies de plantas medicinais utilizadas pelos alunos de graduação da Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, RJ. **Educação Ambiental em Ação**, v. 46, p. 1, 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**. 8(5):395-400, 2001.
- PAULETTI, P.M.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoidea* (Bignoniaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 641-643, 2003.
- PESSINI, G.L. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.21-24, 2003
- PIMENTA, L.P.S. *et al.* Biological screening of *Annonaceous* Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**. 10(2-3):209-12, 2003.
- QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. A Importância das Técnicas Acopladas (CL/UV, CL/EM, CL/RMN) para Procura de Princípios Ativos. **Revista Fitos Eletrônica**; v. 2, n. 03, 2013.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F., CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 906 p., 2007.
- 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.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven *Myrtaceae* fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3; p. 25-36, 2005.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. *Screening* methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127–149, 1988.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, 100(1-2):80-4, 2005.

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. DE. O gênero *Eugenia* L. (Myrtaceae) na planície de alagável do Alto Rio Paraná, Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 529–548, 2006.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The Principles of Humane Experimental Technique**. Methuen, London, 1959

SALAZAR-ARANDA, R. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-6, 2009.

SANTOS, A. L. *et al.* Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007 .

SANTOS, M. M. P. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais das espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annum*, e de análogos sintéticos da capsaicina, frente aos microrganismos da cavidade oral**. Tese de Doutorado em Produção Vegetal - Campo dos Goytacazes, Rio de Janeiro.: Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2010.

SANTOS, F. V. *et al.* Genotoxicity of polar and apolar extracts obtained from *Qualea multiflora* and *Qualea grandiflora*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, p. 105-110, 2011.

SANTOS, I. DE A. L. DOS; NOGUEIRA, J. M. DA R.; MENDONÇA, F. C. R. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 47, p. 5–12, 2015.

- SARTORATTO, A. *et al.* Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 35, n.4, p. 275-280, 2004.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Volume 30, Issue 12, Pages 3875-3883, 1991.
- SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças infecciosas conduta diagnóstica e terapêutica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1998.
- SERRANO, C. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1554–1560, 2011.
- SILVA, C. H. P. DE M. E. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis: Editora Eventos, 1999.
- 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.
- SOARES, V. M. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 251–253, 2012.
- SOBRAL, M. *et al.* **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. Rima: Novo Ambiente, Porto Alegre, 2006.
- SOUTO, F. J. B. **Influências de parâmetros ambientais sobre *Artemia* sp (*Branchiopoda: Artemiidae*) em uma salina artesanal do estado do Rio Grande do Norte**. Curso de Mestrado em Ciências Biológicas – Zoologia, Universidade Federal da Paraíba, 19 p., 1991.
- SOUZA M. C. *et al.* Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. **Pharmazie**; 58:582-6, 2003.
- SOUZA, G.C. *et al.* Ethnofarmacology studies of antimicrobial remedies in south of Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.135-143, 2004.
- STEFANELLO, M.E.A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha ssp floccosa*. **Revista Brasileira Farmacognosia** 16: 525-530, 2006.
- TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; SARIDAKIS, H. O. Teste de ames como uma ferramenta para detecção de citotoxicidade e mutagenicidade causadas por metais pesados e radicais livres. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 18, n. 2, p. 41,1999.

TALALAY, P. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. **Academic Medicine**, v.76, p.238-47, 2001.

TANAKA, T. *et al.* Syzyginins A and B, two ellagitannins from *Syzygium aromaticum*. **Phytochemistry**, v. 43, n.6, p. 1345 – 1348, 1996.

TIMBOLA, A.K. *et al.* A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v.73, p.174 –176, 2002.

UMBUZEIRO, G. A. & VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella* Typhimurium (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: SALVADORI, D. M. F. *et al.* **Mutagênese Ambiental**, 1 Ed. Canoas: Ed. ULBRA, p. 81-112, 2003.

VALGAS, C. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 369–380, 2007.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**. vol.28, n.3, pp. 519-528, 2005.

WEBSTER, D. *et al.* Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 140–146, 2008.

WEIGELT, J. *et al.* Linezolid versus vancomycin in treatment of complicated skin and soft tissue infections. **Antimicrob Agents Chemother**. 49(6):2260-6, 2005.

WIEST, J. M. *et al.* Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 474–480, 2009.

WILSON, P. G. *et al.* *Myrtaceae* revisited: a reassessment of infra familial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

WILSON, P. G. *et al.* Relationships within *Myrtaceae* sensu lato based on a matk phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.

YANG, L.L.; LEE, C.Y.; YEN, K.Y. Induction of apoptosis by hydrolyzable tannins from *Eugenia jambos* L. on human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 157, p. 65-75, 2000.