



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS – PPGCA

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS OBTIDOS DA *Poincianella*
***bracteosa* (FABACEAE)**

Leticia Gonçalves de Aguiar Santana

Itapetinga – Bahia
Maio - 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS OBTIDOS DA *Poincianella*
bracteosa (FABACEAE)**

Autora: Letícia Gonçalves de Aguiar Santana

Orientadora: Dra. Simone Andrade Gualberto

Co-orientadora: Dra. Silmara Almeida Carvalho

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento”

Itapetinga – Bahia
Maio - 2018

543 Santana, Letícia Gonçalves de Aguiar
S223p Potencial antimicrobiano de extratos obtidos da *Poincianella bracteosa* (Fabaceae). / Letícia Gonçalves de Aguiar Santana. – Itapetinga, BA: UESB, 2018.

66fl.

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Simone Andrade Gualberto e coorientação da Prof^a. D.Sc. Silmara Almeida Carvalho.

1. Caatinga. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Prospecção química. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, *Campus* de Itapetinga. II. Gualberto, Simone Andrade. III. Carvalho, Silmara Almeida. IV. Título.

CDD(21): 543

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5^a Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Caatinga
2. Atividade antimicrobiana
3. Prospecção química

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida, por ter me guiado nos momentos mais difíceis e por não me deixar fraquejar.

A minha mãe Dinalva, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, onde sempre estive ao meu lado, estando à disposição por todas as vezes que precisei e por acreditar no meu sucesso.

Em especial à minha orientadora, Profa. Dra. Simone Gualberto, pela oportunidade, pela paciência, pelo incentivo, por acreditar que eu chegaria lá e por todo o conhecimento transmitido.

A Profa Dra. Silmara Carvalho, minha co-orientadora, por sua amizade, apoio, pelos conselhos e sugestões, além das palavras de ânimo que sempre me incentivaram.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

As minhas amigas, e as que a UESB me deu, por todos os momentos juntos de alegrias, trabalho, diversão e também dificuldades, sei que posso contar com vocês, onde sempre me presentearam com um sorriso ou palavra amiga.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), pelo acolhimento durante estes anos e pelo suporte dado. Ao Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia (LPNBio), onde pude trabalhar durante todos estes anos e pelas trocas de experiências.

Ao LAPRON e todos os colegas do laboratório, que ajudaram e deram o suporte para a conclusão deste trabalho.

À professora Aline, por conceder que uma parte dos testes fossem feito em seu laboratório na Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC.

Enfim, a todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, desses dois anos de batalha para o meu crescimento pessoal e profissional, e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Características Ecológicas da Caatinga	16
2.2 Características Químicas e Botânicas da <i>Poincianella bracteosa</i>	18
2.3 Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais	20
2.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	22
2.4 Plantas Medicinais como fontes de compostos bioativos	23
2.5 Utilização de Fitoterápicos: Os desafios para produção	25
2.6 Resistência Bacteriana	26
2.7 Metabólitos Secundários de Vegetais com Ação Antimicrobiana	29
2.8 Perspectivas para a obtenção de novos antifúngicos	30
3 METODOLOGIA.....	32
3.1 Material Vegetal	32
3.1.1 Coleta e Identificação do Material Botânico.....	32
3.1.2 Preparação do Material Vegetal	32
3.2 Obtenção do Extrato Etanólico (EE)	33
3.2.1 Obtenção das Frações.....	33

3.3 Avaliação da Atividade Antimicrobiana.....	34
3.3.1 Microrganismos Teste	34
3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	35
3.3.3 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM).....	36
3.4 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos	36
3.4.1 Microrganismos teste	37
3.5 Prospecção Química	38
3.5.1 Teste <i>in vitro</i> para a identificação dos constituintes químicos.....	38
3.5.2 Determinação do teor de flavonoides totais	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	41
4.2 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM).....	45
4.3 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de <i>P. bracteosa</i>	46
4.4 Prospecção Química	47
5 CONCLUSÃO.....	52
6 REFERÊNCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Extensão territorial ocupada pela caatinga no Brasil	17
Figura 2. <i>Poincianella bracteosa</i> no seu habitat natural.....	19
Figura 3. Reação de redução da resazurina.....	23
Figura 4. Parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	28
Figura 5. Princípios ativos presentes nos vegetais.....	29
Figura 6. Esquema do ensaio antibacteriano para a determinação da CIM	36
Figura 7. Teste antibacteriano realizado para a fração diclorometânica obtida da raiz da <i>P. bracteosa</i>	43

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Informações sobre as cepas padrão de microrganismos utilizados nos testes	34
Tabela 2. Fungos utilizados no teste	37
Tabela 3. Resultados dos testes antibacterianos dos extratos obtidos das folhas da <i>Poincianella bracteosa</i>	42
Tabela 4. Resultados dos testes antibacterianos dos extratos obtidos do caule da <i>Poincianella bracteosa</i>	42
Tabela 5. Resultados dos testes antibacterianos dos extratos obtidos da raiz da <i>Poincianella bracteosa</i>	43
Tabela 6. Resultados dos testes antifúngicos dos extratos das folhas da <i>Poincianella bracteosa</i> frente a diferentes cepas de fungos	46
Tabela 7. Resultados dos testes antifúngicos dos extratos do caule da <i>Poincianella bracteosa</i> frente a diferentes cepas de fungos	46
Tabela 8. Resultados dos testes antifúngicos dos extratos da raiz da <i>Poincianella bracteosa</i> frente a diferentes cepas de fungos	47
Tabela 9. Resultados da prospecção química <i>in vitro</i> do extrato etanólico obtido das folhas da <i>Poincianella bracteosa</i>	47
Tabela 10. Resultados da prospecção química <i>in vitro</i> do extrato etanólico obtido do caule da <i>Poincianella bracteosa</i>	48

Tabela 11. Resultados da prospecção química <i>in vitro</i> do extrato etanólico obtido da raiz da <i>Poincianella bracteosa</i>	48
Tabela 12. Teores de flavonoides encontrados nos extratos das folhas da <i>Poincianella bracteosa</i>	50
Tabela 13. Teores de flavonoides encontrados nos extratos do caule obtidos da <i>Poincianella bracteosa</i>	50
Tabela 14. Teores de flavonoides encontrados nos extratos da raiz obtidos da <i>Poincianella bracteosa</i>	51

RESUMO

SANTANA, L. G. A. **Potencial antimicrobiano de extratos obtidos da *Poincianella bracteosa* (FABACEAE)**. Itapetinga- BA: UESB, 2018, 66 pg. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais – Área de Concentração em Meio Ambiente e Desenvolvimento).

A Caatinga se destaca como um bioma rico em diversidade vegetal, com elevado potencial econômico e farmacológico, atuando como uma verdadeira farmácia viva, em que a maioria das espécies apresentam inúmeras utilizações na medicina popular. Dentre elas, se insere a *Poincianella bracteosa*, muito utilizada para fins medicinais, possuindo ação antiinflamatória, antimicrobiana, entre outras. Assim, com o presente trabalho objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos e frações obtidas de diferentes partes da *Poincianella bracteosa*, contra microrganismos patogênicos. O material vegetal foi coletado na Floresta Nacional (FLONA) de Contendas do Sincorá. Para a obtenção do extrato bruto, realizou-se a extração do material vegetal por percolação exaustiva com solução hidroetanólica a 70%. Posteriormente, este extrato foi fracionado pelo método de partição líquido-líquido com solventes menos polares, para obtenção das diferentes frações: hexânica, diclorometânica e acetato de etila. Para a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras foi utilizado o ensaio de susceptibilidade por microdiluição em caldo, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando-se seis cepas bacterianas patogênicas. Uma prospecção química preliminar foi feita com o objetivo de se identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos, através de reações químicas *in vitro*, de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997). As frações provenientes do fracionamento mostraram-se mais ativas frente às cepas bacterianas que seus respectivos extratos brutos. Os extratos provenientes da raiz da planta foram os mais eficientes em inibir o crescimento microbiano, em comparação com os demais. A CIM do extrato bruto da raiz foi de 0,62 mg.mL⁻¹ para *Enterococcus faecalis* e de 1,25 mg.mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Enterococcus faecalis* (CBAM 0278). A fração diclorometânica da raiz foi a mais ativa frente às cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, com CIM de 0,03 mg.mL⁻¹. Assim sendo, os ensaios realizados indicam o potencial antibacteriano da espécie estudada frente aos microrganismos testados.

Palavras-chave: Caatinga; Atividade antimicrobiana; Prospecção química.

*Orientadora: D.Sc. Simone Andrade Gualberto, UESB. Co-orientadora: D.Sc. Silmara Almeida Carvalho, UESB.

ABSTRACT

SANTANA, L. G. A. **Antimicrobial potential of extracts obtained from *Poincianella bracteosa* (FABACEAE)**. Itapetinga- BA: UESB, 2018, 66 pg. (Dissertation - Master in Environmental Sciences - Area of Concentration in Environment and Development).

The Caatinga stands out as a biome rich in plant diversity, with high economic and pharmacological potential, acting as a true living pharmacy, in which most species have numerous uses in folk medicine. Among them, *Poincianella bracteosa*, widely used for medicinal purposes, has anti-inflammatory, antimicrobial action, among others. Thus, the present work aimed to evaluate the antimicrobial activity of crude extracts and fractions obtained from different parts of *Poincianella bracteosa* against pathogenic microorganisms. The plant material was collected in the National Forest (FLONA) of Contendas do Sincorá. In order to obtain the crude extract, the vegetal material was extracted by exhaustive percolation with 70% hydroethanolic solution. Later, this extract was fractionated by the liquid-liquid partition method with less polar solvents, to obtain the different fractions: hexane, dichloromethane and ethyl acetate. For the evaluation of the antimicrobial activity of the samples, the microdilution susceptibility test in broth was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), using six pathogenic bacterial strains. A preliminary chemical prospection was made with the objective of identifying the main classes of secondary metabolites present in the extracts, through in vitro chemical reactions, according to the methodology described by Matos (1997). Fractions showed to be more active against bacterial strains than their crude extracts. The extracts from the root of the plant were the most efficient in inhibiting microbial growth, in comparison with the others. The MIC of the crude extract of the root was 0.62 mg.mL⁻¹ for *Enterococcus faecalis* and 1.25 mg.mL⁻¹ for *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* and *Enterococcus faecalis* (CBAM 0278). The dichloromethane fraction of the root was the most active against strains of *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, with MIC of 0.03 mg.mL⁻¹. Therefore, the tests performed indicate the antibacterial potential of the species studied against the tested microorganisms.

Keywords: Caatinga; Antimicrobial activity; Chemical prospecting.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das mais ricas biodiversidades do planeta, com representantes de vários táxons vegetais, sendo muitos destes empregados na medicina popular, e outras tantas ainda por descobrir (GIULIETTI et al., 2005). Diversas comunidades recorrem às plantas como recurso terapêutico e, nos últimos anos, intensificou-se o uso de espécies vegetais como forma alternativa ou complementar aos tratamentos utilizados na medicina tradicional (DORIGONI et al., 2001).

A ampla biodiversidade do território brasileiro, aliada ao acervo de conhecimentos empíricos sobre plantas medicinais, acumulados por populações tradicionais, tornam o Brasil um país privilegiado para a realização de estudos voltados para o conhecimento e aplicação terapêutica das espécies vegetais (ALBAGLI, 2001). Os conhecimentos tradicionais associados à utilização das plantas medicinais constituem a base da medicina popular no Brasil, formados a partir de uma mistura das culturas indígena, européia e africana, oriundos do período da colonização (MARTINS et al., 2000).

As plantas medicinais representam a principal matéria médica utilizada pelas chamadas medicinas tradicionais, ou não ocidentais, em suas práticas terapêuticas, sendo a medicina popular a que utiliza o maior número de espécies diferentes (HAMILTON, 2003).

Estas plantas têm contribuído fortemente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio do conhecimento dos seus metabólitos secundários, sendo conhecidos por atuarem de forma direta ou indireta no organismo, podendo inibir ou ativar importantes alvos moleculares e celulares (CALIXTO, 2005). O tratamento realizado com plantas medicinais é denominado fitoterapia, e os fitoterápicos representam os medicamentos produzidos a partir dessas plantas (SCHENKEL; GOSMAN; PETROVICK, 2003).

Entre os biomas brasileiros, destaca-se a Caatinga, como o único bioma exclusivamente nacional. Recentemente, tem sido descrito como um bioma rico, com uma diversidade vegetal de elevado potencial econômico e farmacológico, onde grande parte do seu patrimônio químico e biológico é encontrado na região nordeste do Brasil (IBAMA, 2010).

Quanto às plantas medicinais, a Caatinga atua como uma verdadeira farmácia viva, em que a maioria das espécies é destacada por inúmeras utilizações na medicina popular. Contudo, a diversidade de vegetais desse bioma poderia ser mais bem aproveitada economicamente, mediante a realização de estudos pormenorizados, especialmente explorando os princípios ativos de cada uma dessas espécies, com especial interesse para a indústria farmacêutica (DRUMONT, 2012).

A *Poincianella bracteosa* (Tul.) L. P. Queiroz, popularmente conhecida como Catingueira, Catinga de Porco Preta ou Pau de Rato, pertencente à família Fabaceae, apresenta característica arbórea de porte médio, sem espinhos, e se distribui amplamente no semiárido nordestino. As espécies deste gênero ocorrem em áreas de caatinga e são bastante utilizadas para aplicação medicinal, como combustível, para obtenção de lenha e carvão vegetal, nas construções rurais e outros usos não madeireiros (FERRAZ et al., 2012). Estudos etnobotânicos que visam o conhecimento das comunidades sobre o uso e a eficácia dessas plantas são importantes, para fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre estas plantas, com grande economia de tempo e dinheiro.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos brutos e das diferentes frações obtidas da *Poincianella bracteosa*, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM), bem como realizar a prospecção química dos extratos brutos obtidos da *P. bracteosa*, através de ensaios in vitro, visando avaliar seus principais metabólitos secundários.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características Ecológicas da Caatinga

A Caatinga é uma das maiores e mais distintas regiões fitogeográficas brasileiras, compreendendo uma área de aproximadamente 844.453 km², representando 11% do território nacional (**Figura 1**) (PALMEIRA et al., 2006). O nome “caatinga” é de origem Tupi-Guarani e significa floresta branca, que caracteriza bem o aspecto da vegetação na estação seca, quando as folhas caem (PRADO, 2005). A ciência, identificando sua fauna e flora, mostra que não existe apenas uma Caatinga, mas muitas formas criadas pela interação de seus seres vivos com o conjunto edafoclimático local. O clima é semiárido, com uma estação chuvosa curta e longos meses sem chuva (SCHISTEK, 2012).

A Caatinga sendo a única grande região natural brasileira que possui limites que estão inteiramente restritos ao território nacional é, proporcionalmente, a menos estudada entre as regiões naturais brasileiras e também a menos protegida, pois as unidades de conservação cobrem menos de 2% do seu território. Os extensos processos de alteração e deterioração ambiental que vem sendo provocado pelo uso insustentável dos recursos naturais, está levando a caatinga a rápida perda de espécies únicas, como também à eliminação de processos ecológicos chaves (LEAL, et., al, 2005).

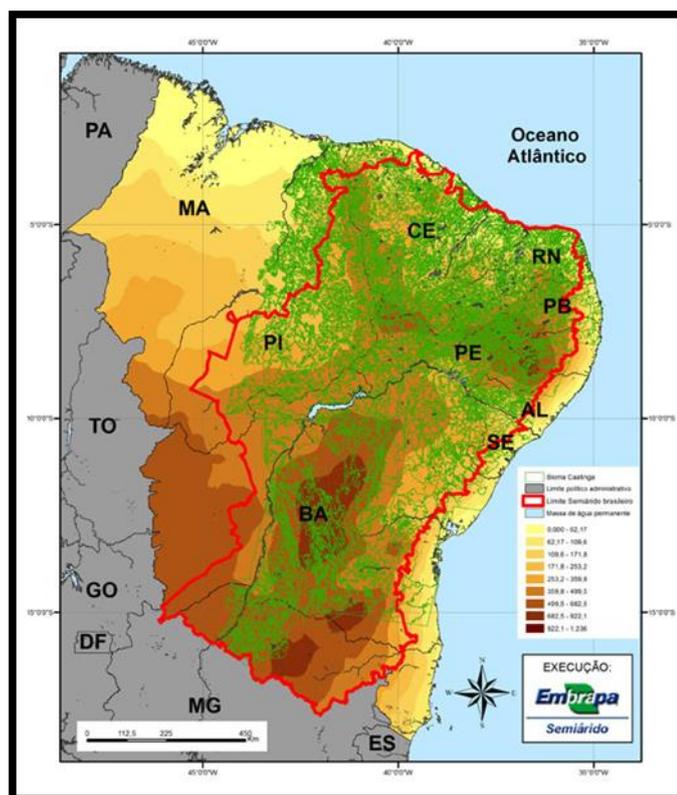


Figura 1. Extensão territorial ocupada pela caatinga no Brasil

Fonte: Embrapa

As plantas neste bioma não possuem características uniformes por se tratar de uma área muito ampla. Alguns caracteres, como o desenvolvimento de tolerância à seca, folhas transformadas em espinhos, suculência e raízes tuberosas são fatores comuns à maioria das espécies botânicas encontradas nesse bioma (PRADO, 2005; CHAVES e OLIVEIRA, 2004).

O período chuvoso (50-70%) é concentrado em três meses consecutivos, apesar da alta variação anual e de longos períodos de seca ser frequentes. O número de meses secos aumenta da periferia para o centro da região (PRADO, 2005). O período de chuvas extremamente irregular de ano para ano, resulta em secas severas periódicas (KROL et al., 2001; CHIANG e KOUTAVAS, 2004). Essas secas tornam a vida na Caatinga difícil para quem vive nesta região.

Apresenta heterogeneidade em relação aos tipos de solo, à topografia e à capacidade de retenção de água (ARAÚJO, 2007). A caatinga arbórea está restrita aos solos ricos em nutrientes. As florestas são mais úmidas e chamadas de brejos de altitude. Estas se estendem sobre as encostas e topos das chapadas e serras com mais de 500 m de altitude e que recebem mais de 1.200 mm de chuvas orográficas (ANDRADE-

LIMA, 1982; PRADO, 2005) Esses ambientes na caatinga encontram-se cada vez mais raros, esparsos e fragmentados. Essas florestas foram largamente destruídas para a construção de casas, cercas e fazendas de gado logo após a colonização europeia, já no início do século XVI (COIMBRA-FILHO e CÂMARA, 1996).

Apesar de ser a única grande região natural brasileira, cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional, tem recebido pouca atenção com relação à conservação da sua variada e marcante paisagem (SILVA et al., 2004). Mas a importância da Caatinga não está restrita somente à sua elevada biodiversidade e inúmeros endemismos. Como uma região semiárida altamente imprevisível e cercada de biomas tropicais méxicos, a Caatinga funciona como um importante laboratório para estudos de plantas e outros seres que se adaptam a um regime de chuvas altamente variável e estressante (LEAL et al., 2005).

2.2 Características Botânicas da *Poincianella bracteosa*

O gênero *Poincianella*, derivada do diminutivo Poinciana, pertence à família Fabaceae. Está presente em regiões áridas, sazonalmente secas, com solos arenosos ou calcários característicos da caatinga (BRITTON e ROSE, 1930).

A família Fabaceae compreende espécies que estão distribuídas em diversos ecossistemas e apresentam acentuada importância econômica. Com relação à química da família é caracterizada pela presença de isoflavonoides em grande variedade, sendo que estes apresentam importantes atividades biológicas, promovendo benefícios à saúde, como a genisteína, que possui atividade antitumoral, por inibir a topoisomerase II e tirosina quinase, além de atuarem como antioxidantes naturais (BRANDI, 1997; AKIYAMA et al., 1987; WANG et al., 2001).

Encontrada no semiárido do nordeste brasileiro, com porte herbáceo, arbustivo e arbóreo, endêmica do Bioma Caatinga, com múltiplas utilidades, tais como: potencial madeireiro, medicinal, uso veterinário, restauração florestal, forragem para o gado e aplicações industriais (MAIA, 2004). Algumas espécies são utilizadas para uso medicinal localmente, como também plantas ornamentais de jardim, árvores de rua e decorativas (BRITTON e ROSE, 1930).

Neste gênero inclui-se a *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz, conhecida popularmente como catingueira, catinga-de-porco; pau-de-rato, havendo sinônimos

botânicos *Ceasalpinia bracteosa* Tul. (SAMPAIO et al., 2005). Possui um porte arbóreo, podendo alcançar entre 4-12 metros de altura, apresentando uma copa irregular, sendo decídua durante a estação seca, o caule de cor acinzentado e abundância em lenticelas esbranquiçadas (**Figura 2**) (SAMPAIO et al., 2005; LIMA, 2012; MAIA-SILVA et al., 2012). As flores são amarelas com pontuações avermelhadas, dispostas em racinos curtos, estando reunidas em inflorescências terminais (LIMA, 2012).



Figura 2. *Poincianella bracteosa* no seu habitat natural

Fonte: ANJOS. Q.Q.A. (2015)

Essa espécie apresenta tolerância às condições de seca, devido à facilidade de adaptação aos solos da caatinga, o que possibilita a ocorrência da espécie em diversas associações vegetais. Após o corte, a *P. bracteosa* possui capacidade de brotar espontaneamente (SAMPAIO et al., 2005), no entanto, não possui tolerância às queimadas.

Bastante utilizada como combustível, lenha, carvão vegetal, construções rurais, e outros usos não madeireiros e também para aplicação medicinal (FERRAZ et al., 2012). Por apresentar um rápido crescimento é utilizada também como quebra-vento em sistemas agroflorestais (SAMPAIO et al., 2005; RESENDE e CHAER, 2010), contribuindo na recuperação de áreas degradadas, auxiliando na fertilidade natural do solo (RESENDE e CHAER, 2010) e em arborização urbana (ALVAREZ et al., 2012).

Suas folhas, flores e cascas são utilizadas na medicina popular, mesmo com suas folhas maduras apresentando odor desagradável bem característico. Já as folhas jovens servem de alimento para animais (LIMA, 2012; MAIA, 2012; MAIA-SILVA, 2012).

Segundo Castro (2010), suas folhas, bem como as cascas são utilizadas na preparação de chás para cura de diarreias, gases, dor de barriga, hepatite, anemia, dores estomacais e febre. Suas folhas quando imersas em cachaça são tidas como afrodisíacas, apresentando grande potencial para utilização pela indústria farmacêutica.

Ainda que as plantas apresentem uma grande diversidade em moléculas com diferentes estruturas, propriedades fisiológicas e físico-químicas, que justificam o seu uso popular, é importante conhecer a sua constituição química, uma vez que a ocorrência ou mesmo as concentrações dos metabólitos secundários produzidos são influenciadas por vários fatores ambientais, como sazonalidade, umidade, temperatura entre outros (SIMÕES et al., 2004; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

2.3 Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais

Trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940, onde, em 1943, Obson realizou pesquisas com cerca de 2.300 plantas superiores contra algumas bactérias. Ao longo das últimas décadas, desde a descoberta das penicilinas naturais, o avanço da indústria farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo (CUNICO et al., 2004). A descoberta dos antimicrobianos promoveu um grande avanço na medicina, devido à sua importância no tratamento de doenças infecciosas no homem e em uso veterinário (TORTORA, 2004).

Propriedades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de diversas espécies vegetais têm sido reconhecidas e estudadas experimentalmente durante séculos, mas foram cientificamente confirmadas apenas há pouco tempo (ARANA SANCHEZ et al., 2010; KARPANEN et al., 2010; LORENZI et al., 2009). O uso de plantas como medicamentos é uma prática comum em países em desenvolvimento, sendo uma solução alternativa para o tratamento de algumas doenças já está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África (SHALE et al., 1999).

Algumas plantas possuem substâncias que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica, sendo frequentemente utilizadas na medicina popular como profiláticos ou na cura de doenças causadas por microrganismos (SAKAGAMI, 1998). O potencial antimicrobiano das plantas está associado à composição química de tais espécies. Uma vez que as plantas medicinais possuem uma grande variedade de substâncias com propriedade antimicrobiana, espera-se que, através de programas de triagem, haja a possibilidade de descoberta de protótipos para o desenvolvimento de novos antibióticos.

Segundo o CLSI (2003), os testes de sensibilidade a antimicrobianos são indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso e exija uma terapia antimicrobiana, para prever a sensibilidade de alguns organismos, podendo ser utilizados para verificar a sensibilidade *in vitro* dos microrganismos frente aos agentes antimicrobianos.

Os métodos mais utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana são os de difusão em placa, diluição em ágar e microdiluição em caldo. Os resultados obtidos para cada um desses ensaios podem diferir por várias razões, principalmente aqueles que afetam o crescimento microbiano, como a exposição do microrganismo ao extrato, a solubilidade dos seus componentes em água e o uso de agentes emulsificadores (SILVEIRA, 2011).

Existem também outros métodos menos utilizados como a autobiografia, uma técnica útil para determinar compostos bioativos com atividade antimicrobiana de extratos de plantas, a partir da inibição do crescimento de microrganismos, através da detecção de anticorpos antimicrobianos (ALCERITO et al., 2002; AGRIPINO et al., 2004; SASIDHARAN et al., 2011) e a técnica Poison food, utilizada para determinar a atividade antifúngica a partir da inibição do crescimento micelial.

A técnica de microdiluição é amplamente utilizada, pois é extremamente vantajosa quando se refere a produtos naturais, uma vez que as amostras podem ser utilizadas em quantidades mínimas. É um teste de baixo custo, simples, rápido, de alto rendimento, sendo 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, permitindo determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos em estudo (GABRIELSON et al., 2002; ALVES et al., 2008; SALAZAR-ARANDA et al., 2009; PALOMBO, 2011). Mesmo havendo alguns contratempos, como células de alguns microrganismos que se aderem à base do poço ou precipitação de compostos presentes

em alguns extratos, como também, às vezes, a coloração forte do extrato em alta concentração pode interferir na análise, essa técnica é a mais adequada (OSTROSKY et al., 2008).

2.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A susceptibilidade a antimicrobianos é também avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima. Um método que está padronizado, possui detalhamento técnico bem definido e fornece resultados quantitativos (WOODS e WASHINGTON, 1995; NCCLS, 1997). Os resultados obtidos no teste podem ser interpretados considerando as características farmacológicas e farmacocinéticas dos antimicrobianos e a concentração mínima a ser alcançada (SUMANO e OCAMPO, 1992).

A atividade antimicrobiana de um agente pode ser medida determinando-se a menor quantidade (concentração) desse agente necessária para inibir o crescimento de um microrganismo-teste, sendo esta quantidade denominada Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para a determinação da CIM, uma série de poços com meio de cultura é preparada pela adição de uma concentração diferente do agente em cada poço, os quais são, posteriormente, inoculados com diferentes cepas de micro-organismos. Após a incubação, os poços são inspecionados, verificando-se a ocorrência de crescimento visível (turbidez). Os poços que apresentarem a menor concentração do agente capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo-teste definem a CIM. Esse procedimento é denominado técnica da diluição em poços (OLIVEIRA, 2009).

A leitura dos resultados é feita com a adição de um indicador, como a resazurina (0,01%), onde, no decorrer de 2-3 horas, a presença de cor púrpura representa ausência de crescimento e de cor rosa a presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido) é o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003).

O mecanismo se baseia na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), (**Figura 3**). A resarufina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

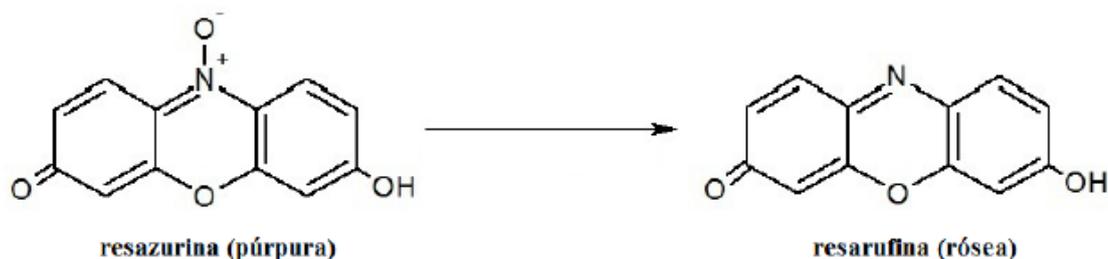


Figura 3. Reação de redução da resazurina

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) não é constante para um determinado agente antimicrobiano, uma vez que pode ser afetada pela natureza do micro-organismo teste utilizado, como também a quantidade do inóculo, composição do meio de cultura, tempo e condições de incubação, tais como temperatura, pH e aeração (MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2003). Se todas as condições são padronizadas, é possível comparar os diferentes agentes antimicrobianos, determinar qual o mais eficaz contra um determinado microrganismo, ou realizar a avaliação da atividade de um único agente contra vários microrganismos (OLIVEIRA, 2009).

2.4 Plantas medicinais como fontes de compostos bioativos

Muitos fármacos da atualidade são derivados direta ou indiretamente de substâncias produzidas por plantas superiores (GOTTLIEB e KAPLAN, 1993). As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às antigas escrituras e ao Papiro de Ébers. Este papiro foi descoberto e publicado por Georg Ebers, traduzido pela primeira vez em 1890, por H. Joachin. O material foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, mas pertence à época da XVIII Dinastia do Egito, e relata aproximadamente 100 doenças e um grande número de drogas de natureza animal, vegetal ou mineral (VILELA, 1997).

No século XX ocorreu um avanço muito grande na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas e microrganismos, no campo da oncologia, favorecendo a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica (COSTA-LOTUFO et al., 2010). O uso de plantas medicinais pode ser influenciado pela questão econômica, pelo fácil acesso, como também pelo alto custo dos medicamentos sintéticos e o difícil acesso às consultas pelo Sistema Único de Saúde

(SUS), pela dificuldade de locomoção daqueles que residem em áreas rurais ou pela tendência atual de utilização de recursos naturais como alternativa aos medicamentos sintéticos (BATTISTI et al., 2013). Assim, a utilização de plantas medicinais, prática tradicional entre os povos de todo o mundo, tem recebido incentivos da Organização Mundial da Saúde (OMS).

O interesse em se investigar novas moléculas eficazes no tratamento de doenças, inclui o potencial antimicrobiano de compostos extraídos de plantas. O Brasil oferece muitas possibilidades, pois possui uma das maiores diversidades vegetais do planeta, contando com aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores, distribuídas nos diferentes tipos de biomas (ALBERNAZ, 2010; VIEIRA et al., 2010).

A OMS considera fundamental que se realizem investigações científicas acerca das plantas utilizadas para fins medicinais e de seus princípios ativos, para assim garantir sua eficácia e segurança terapêutica (SANTOS et al., 2008). No processo de cultivo das espécies medicinais, há fatores que podem afetar de alguma forma a qualidade e a quantidade de princípios ativos produzidos pelas plantas. Isso se deve ao fato de que rotas metabólicas podem ser ativadas ou inativadas, levando à produção de diversos produtos do metabolismo secundário em cada situação (SILVA et al., 1995).

Segundo Molinari (2009), a evolução das rotas biossintéticas dos produtos naturais está ligada às necessidades funcionais de seus ligantes, por isso, há uma grande expectativa quanto à afinidade dos produtos naturais pelos diversos alvos biológicos existentes. Devido à atividade metabólica secundária, os vegetais são capazes de produzir substâncias antibióticas, utilizadas como mecanismo de defesa contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros.

Os antibióticos de origem vegetal possuem uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de microrganismos, o que pode vir a regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e a síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005).

Quando se fala em produção de extratos naturais, a bioprospecção possui grande importância, porém, em países em desenvolvimento e com grande potencial em termos de biodiversidade, as novas realidades legislativas e comerciais levam a busca de

produtos naturais bioativos por parte das grandes companhias farmacêuticas (KHOSLA e CHEMTRACTS, 1998).

Os principais passos para a obtenção de um composto bioativo a partir de recursos vegetais incluem a extração, a triagem farmacológica, o isolamento, a caracterização química, a avaliação toxicológica e a avaliação clínica. Todos estes passos são essenciais, principalmente este último, para garantir a eficácia de um composto bioativo, podendo ser investigados, também, a biodisponibilidade, a segurança e as interações medicamentosas (SASIDHARAN et al., 2011).

2.5 Utilização de Fitoterápicos: Os desafios para produção

Segundo a legislação sanitária brasileira, fitoterápico é o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, sendo caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2004). Em 1978, a Organização Mundial da Saúde reconheceu oficialmente o uso de fitoterápicos para o tratamento e prevenção das enfermidades (ANVISA, 2011).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com mais de 20% do número total de espécies do planeta. O comércio de plantas medicinais é utilizado tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos, pelo fato dessas plantas serem fontes importantes de produtos naturais biologicamente ativos, apresentando alta diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-química e biológica (WALL e WANI, 1996).

O avanço na área científica permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos confiáveis e seguros. No entanto, ainda faltam estudos científicos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas (VIEIRA et al., 2010).

Atualmente, a padronização de fitoterápicos é realizada baseada no teor de uma substância marcadora, que esteja presente no extrato, indicando que, se a mesma estiver presente em quantidade apropriada, também os demais componentes estarão igualmente representados (DAVID et al., 2004). Essa substância não necessariamente apresenta a atividade farmacológica esperada, ou para a qual o extrato é empregado.

Com o aumento da utilização de produtos naturais é observada a participação cada vez mais intensa da fitoterapia na assistência à saúde da população. Assim, a

tendência observada para a Fitoterapia é de que não se pode prescindir da avaliação dos efeitos terapêuticos de cada fitomedicamento, com base em estudos clínicos, conduzidos dentro de padrões éticos e científicos (KLEIN et al., 2009).

Os fitomedicamentos podem ser produzidos através da síntese química dos compostos bioativos. Assim, a transformação de uma planta em um medicamento prioriza a preservação da integridade química dos princípios ativos tendo por consequência, a ação farmacológica do vegetal, que garante a constância da ação biológica desejada (TOLEDO et al., 2003).

Segundo Carvalho (2007), o uso de fitoterápicos e de plantas medicinais deve ser orientada, para que não causem problemas à saúde, que vão desde a ineficácia terapêutica até reações adversas severas, dependendo do uso. Portanto, é necessário que se tenha um controle sanitário dos produtos e que se conscientize a população sobre os riscos que podem ocorrer (ANVISA, 2013).

2.6 Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana pode ser definida como um fenômeno ecológico que ocorre como resposta adaptativa das bactérias frente ao grande uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (LEVY, 2001). Ela ocorre quando as bactérias se multiplicam rapidamente, sofrem mutação e são promíscuas, podendo trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes. Antes do século XXI, a resistência bacteriana ocorria predominantemente em ambientes hospitalares. Hoje em dia, esta resistência está ligada a diversos ambientes e pode vir a atingir indivíduos que estejam saudáveis (GUIMARÃES, et al., 2010).

A resistência desenvolvida por patógenos humanos à medicamentos é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica, se tornando um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo exacerbado diário de antibióticos em alguns países da Europa tem causado resistência nas populações bacterianas, como também as más condições de higiene, fluxo contínuo de viajantes e a demora no diagnóstico das infecções bacterianas, têm favorecido o aumento da resistência microbiana (DUARTE, 2006; NUSSBAUM et al., 2006).

A penicilina, descoberta em 1928, por Alexandre Flemming, foi a primeira molécula com propriedades bactericidas a ser identificada. A sua utilização como agente terapêutico só foi possível 11 anos mais tarde, após Howard Foley e colaboradores

terem extraído, purificado e identificado a substância com atividade bactericida (SHAMA, 2008). A utilização da penicilina durante a segunda Guerra Mundial salvou muitas vidas, sendo o grande marco para o tratamento de infecções bacterianas, onde até então não havia cura. Depois das penicilinas, muitas outras classes de antibióticos foram desenvolvidas, passando as infecções bacterianas a serem consideradas patologias comuns e de fácil tratamento.

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é um dos principais fatores que estimulam a busca por novos antimicrobianos naturais. O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos no desenvolvimento da resistência é de grande importância para se entender como a bactéria pode desenvolvê-la. Apesar dos mecanismos variarem de patógeno para patógeno, a resistência é causada por alguns fatores básicos: inativação do antibiótico diretamente na molécula bioativa por alterações químicas; modificação do alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico; mudanças na bomba de efluxo e permeabilidade externa da membrana que promovem a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química e transmissão do alvo (GUIMARÃES, et al., 2010).

A resistência bacteriana também pode estar relacionada a alterações na parede celular. A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída majoritariamente por uma espessa camada de peptidoglicano, ao qual se ligam ácidos teicóicos (contendo resíduos de glicerol fosfato ou ribitol fosfato). Já a parede celular de bactérias Gram-negativas possui uma camada de peptidoglicano menos espessa que as Gram-positivas (**Figura 4**). Sobre esta camada encontra-se uma nova bicamada fosfolipídica que possui polissacáridos ligados covalentemente a lipídios, formando lipopolissacáridos (LPS). Esta segunda membrana é denominada membrana externa ou simplesmente LPS.

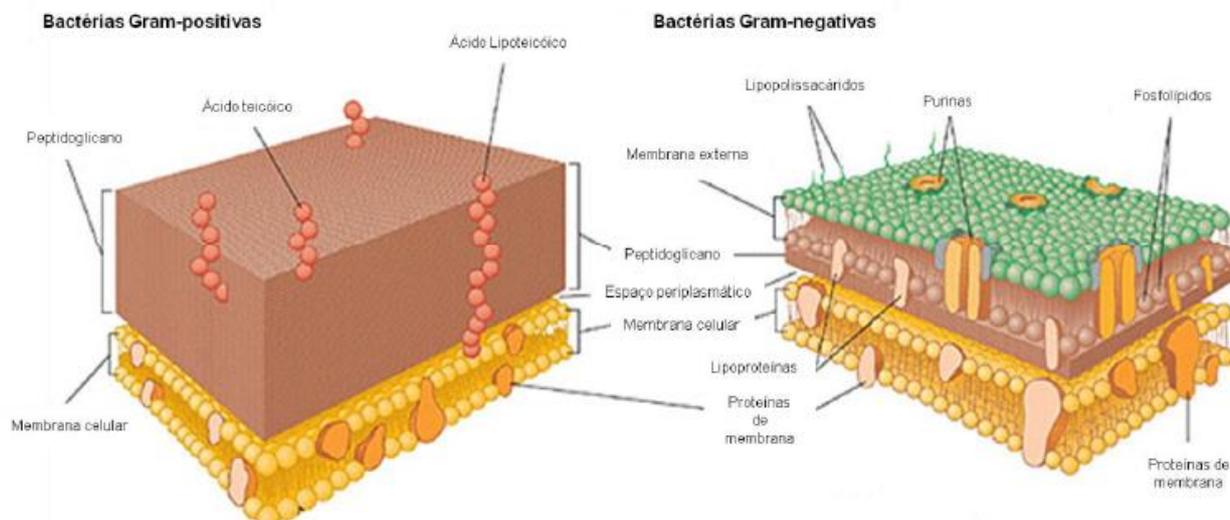


Figura 4. Parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

Devido a parede celular das bactérias Gram-negativas ser mais complexa, estes organismos são mais resistentes à ação de antibióticos, devido à dificuldade que encontram em cruzar efetivamente a barreira lipídica. Para acessar a célula bacteriana, os antibióticos devem cruzar a parede celular através de canais proteicos de porina, embebidos na estrutura lipídica, que apresentam o interior com características hidrofílicas. Sendo assim, os antibióticos com maior atividade contra bactérias Gram-negativas são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas (GUIMARÃES, et al., 2010).

Apesar do crescente aumento da resistência bacteriana, algumas medidas podem ser tomadas para evitar seu avanço, como o uso de vacinas para prevenir o surgimento de infecções bacterianas, uso racional de antibióticos, controle e prevenção da disseminação de microrganismos resistentes, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos menos agressivos (MOELLERING et al., 2008). Outra estratégia seria a caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como sua localização e diversidade, pois são de grande importância para o entendimento dos fatores envolvidos na resistência.

2.7 Metabólitos secundários de vegetais com ação antimicrobiana

O metabolismo representa o conjunto de reações químicas que está sempre ocorrendo em cada célula. Os compostos químicos que são formados, degradados ou transformados recebem o nome de metabólitos (SIMÕES et al., 2010), onde estes podem ser divididos em metabólitos primários e secundários.

Os metabólitos primários são encontrados em todos os vegetais e são essenciais ao desenvolvimento do indivíduo, a exemplo dos aminoácidos, nucleotídeos, ácidos orgânicos, acil-lipídeos e fitoesteróis (BUCHANAN, 2000).

O conjunto de reações onde os produtos, apesar de não serem necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para a sobrevivência e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema, é chamado de metabolismo secundário (SIMÕES et al., 2010). As plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra herbívoros, patógenos e outros agentes de estresse, através da síntese de metabólitos secundários com forte ação tóxica sobre predadores (OLIVEIRA, 2000). Alguns desses compostos podem atuar como antibióticos, antifúngicos, antivirais e, também, apresentar atividades tóxicas para outras plantas (**Figura 5**).

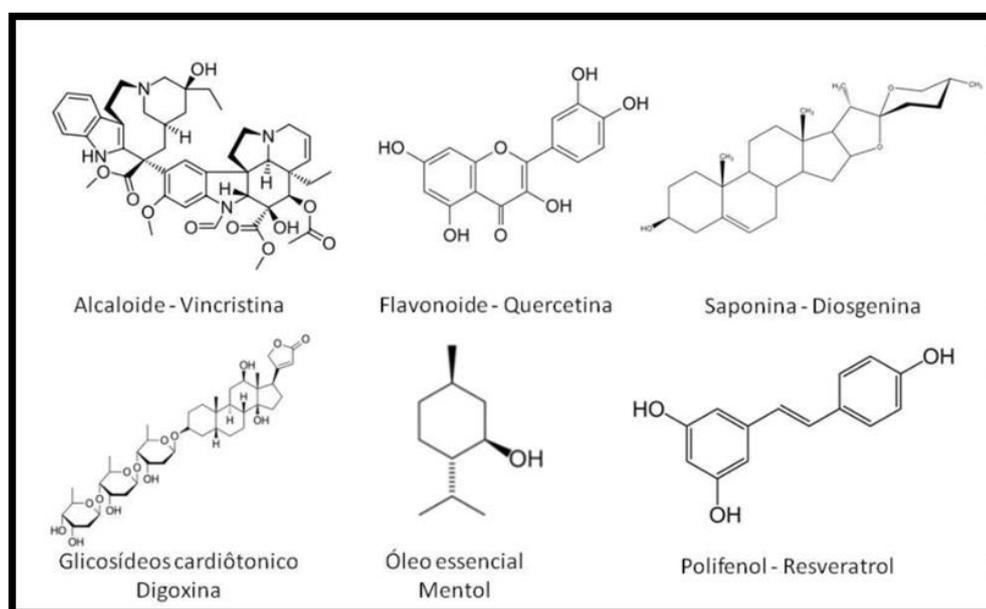


Figura 5. Estruturas de alguns constituintes químicos sintetizados pelos vegetais com ações farmacológicas

A composição dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre biossíntese e transformações que ocorrem durante o crescimento, em consequência principalmente de fatores genéticos, ambientais e do manejo agrônomico utilizado (BOTREL et. al., 2010). As principais classes de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais pertencem às classes dos policetídeos ou ácidos graxos, terpenoides e esteroides, fenilpropanoides, lignanas, flavonoides, alcaloides, aminoácidos e peptídeos especiais e carboidratos especiais (MEDRADO, 2011).

2.8 Perspectivas para obtenção de novos agentes antifúngicos

Fungos são organismos eucariontes e heterotróficos incluídos no Reino Fungi (DEACON, 2006). Apresentam parede celular espessa, constituída por glicoproteínas e polissacarídeos, principalmente glucano e quitina, além de uma membrana celular, cujo principal componente é o ergosterol (BOWMAN e FREE, 2006).

Sua relação com os humanos é variada, podendo desempenhar vários papéis, como causar doenças em culturas vegetais, gerando consideráveis perdas econômicas; decompor e reciclar matéria orgânica; produzir metabólitos tóxicos em alimentos e animais; desempenhar grande atividade bioquímica, produzindo antibióticos, esteroides, ciclosporinas e enzimas alimentares; auxiliar no processamento alimentar de pão, produtos lácteos e bebidas alcoólicas; (DEACON, 2006). Nos últimos dez anos, a incidência de infecções importantes causadas por fungos tem aumentado. Estas, estando com mais frequência em indivíduos com sistema imunológico baixo (CASE, FUNKE, TORTORA et al., 2010).

Visto a necessidade de tratamentos mais eficazes e menos tóxicos para os indivíduos acometidos, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na expectativa de se obter novos produtos antifúngicos. Assim, o acervo terapêutico antifúngico tem aumentado bastante nos últimos anos, buscando atender a essa demanda crescente de casos na micologia médica (SIDRIM, ROCHA, 2004).

Os agentes terapêuticos podem ser amplamente classificados em dois grupos, sendo os antibióticos antifúngicos que ocorrem naturalmente, como os poliênicos e as equinocandinas, e os fármacos sintéticos, incluindo os azóis e as pirimidinas fluoradas. Os principais alvos das drogas antifúngicas, são a parede celular, membrana e núcleo da célula fúngica (RANG, DALE, RITTER, 2007).

O surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais tem aumentado, o que intensifica a preocupação com o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos mais seguros e eficazes descobertos a partir de produtos naturais (Oliveira et al., 2011, Zapata et al., 2010; Coutinho et al., 2009).

A atividade antifúngica de óleos essenciais, cumarinas, terpenos, flavonóides, amidas e alcalóides tem sido cientificamente comprovada (AQUINO et al., 2003; MOREIRA et al., 2007).

3 METODOLOGIA

3.1 Material Vegetal

3.1.1 Coleta e Identificação do Material Botânico

Diferentes partes da *Poincianella bracteosa* (folhas, talos mais finos, caules e raízes) foram coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), Unidade de Conservação Federal, situada entre os municípios de Contendas do Sincorá-Ba e Tanhaçu-Ba, mesorregião do centro-sul baiano, no mês de Agosto de 2016. As coordenadas geográficas do local de coleta foram: S: 13° 57,622'; WO: 41° 6,685'; Elevação: 1.188m; Distância 13,93; AZ: N.

Exsicatas do material botânico foram encaminhadas para o Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (HUESB), para serem analisadas, identificadas e estão registradas no acervo sob nº HUESB 5894.

3.1.2 Preparação do Material Vegetal

O material vegetal coletado foi levado ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LAPRON) da UESB, para separação, pesagem e secagem. A pré-secagem foi realizada em estufa de circulação de ar a temperatura de 40°C, por um período de 48 horas, para a retirada da água superficial e, em seguida, as partes da planta foram trituradas, separadamente, em moinho de facas, para que a amostra adquirisse uma maior superfície de contato, facilitando a extração pelo solvente. O material vegetal foi pesado antes e após a secagem.

3.2 Obtenção do Extrato Etanólico (EE)

O material vegetal triturado foi colocado em um funil de separação de 2 litros, onde se adicionou aproximadamente 1 litro de solução hidroetanólica a 70%, e realizou-se a percolação exaustiva com o solvente.

O solvente permaneceu em contato com o material vegetal por cerca de 24 horas, a temperatura ambiente. Após esse período o solvente foi recolhido e evaporado em evaporador rotativo (Fisatom), a 45°C e 80 rpm, para a obtenção do extrato etanólico. Esse processo foi repetido até que o líquido recolhido apresentasse uma coloração amarela clara. O extrato etanólico obtido foi colocado em frasco âmbar e mantido em refrigerador, a 10°C, até o momento do fracionamento e das análises.

3.2.1 Obtenção das Frações

Os extratos etanólicos (EEs) obtidos das diferentes partes da planta foram fracionados por partição líquido-líquido, utilizando solventes menos polares. A partição foi realizada a partir de 50 g dos EEs diluídos em uma solução hidroetanólica a 70%. Iniciou-se o fracionamento dos extratos etanólicos utilizando-se como solvente o hexano, seguido do diclorometano e do acetato de etila, para obterem-se, respectivamente, as frações hexânica (FH), diclorometânica (FD), acetato de etila (FAE) e o que restou da solução hidroalcoólica passou a denominar-se fração hidroalcoólica (FHA).

Obtenção da Fração Hexânica (FH)

Às soluções hidroetanólicas dos extratos obtidos anteriormente foram adicionadas porções de 200 mL de hexano, agitando-se pelas paredes do funil com cuidado. O processo foi repetido até completa extração, sendo utilizados aproximadamente 2 litros de hexano (Synth). Os extratos hexânicos foram recolhidos em um erlemeyer e, posteriormente, evaporados em evaporador rotativo a temperatura de 40°C, para obtenção da Fração Hexânica (FH). As porções inferiores das soluções hidroetanólicas que não foram extraídas com o hexano foram reutilizadas para o fracionamento com o diclorometano.

Obtenção da Fração Diclorometânica (FD)

As soluções hidroetanólicas reservadas da partição anterior foram então fracionadas com porções de 100 mL de diclorometano, até completa extração, usando-se cerca de 700 mL de diclorometano. Para facilitar as extrações, foram adicionadas

soluções saturadas de NaCl (Synth) às misturas nos funis de separação. Após a separação das fases, foram recolhidas as porções inferiores (diclorometânicas), e as frações superiores, as hidroalcoólicas, permaneceram nos funis para a última etapa do fracionamento. Os extratos diclorometânicos reunidos foram evaporados em evaporador rotativo a temperatura de 40°C.

Obtenção da Fração Acetato de Etila (FAE)

Nas soluções reservadas da extração com o diclorometano (partes superiores), foram adicionadas porções de 100 mL de acetato de etila. As soluções hidroalcoólicas foram extraídas até a exaustão, correspondendo a um volume de 500 mL de acetato de etila. Os extratos superiores foram reunidos e evaporados em evaporador rotativo a temperatura de 40°C, para obtenção da Fração Acetato de Etila (FAE).

3.3 Avaliação da Atividade Antibacteriana

Os testes de avaliação da atividade antibacteriana dos extratos foram realizados utilizando o ensaio de susceptibilidade por microdiluição em caldo, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), recomendada pelo CLSI (2003), com algumas modificações.

3.3.1 Microrganismos Teste

As cepas padrão dos microrganismos utilizados neste estudo pertencem aos cultivos do “American Type Culture Collection” (ATCC), “Coleção de Bactérias da Amazônia” (CBAM) e (INCOS) cedida pelo laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC (**Tabela 1**). Os microrganismos foram cultivados em Ágar Mueller-Hinton (AMH), e incubados em estufa bacteriológica a 37°C, entre 18 e 24 horas.

Tabela 1. Informações sobre as cepas padrão de microrganismos utilizados nos testes

Microrganismos	Código do Isolado	Classificação quanto a parede celular
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 31299	Gram-positiva
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300	Gram-positiva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram-negativa
<i>Enterobacter cloacae</i>	INCOS 006	Gram-negativa
<i>Proteus vulgaris</i>	CBAM 0169	Gram-negativa
<i>Enterococcus faecalis</i>	CBAM 0278	Gram-positiva

3.3.2 Avaliação da atividade antibacteriana pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima dos extratos foi utilizado o ensaio de susceptibilidade. Foram utilizadas placas de poliestireno estéreis, com 96 poços, próprias para microdiuição.

Os extratos dos caules e das folhas foram diluídos em solução aquosa de Tween 80 a 10% e o extrato da raiz diluído em solução aquosa de etanol a 20%. Após a diluição, os extratos foram esterilizados por filtração através de membrana bacteriológica de acetato de celulose (0,22 μm).

Para a obtenção dos inóculos dos microrganismos, estes foram inicialmente diluídos em solução salina numa concentração equivalente a 1×10^8 células por mL, de acordo com a turbidez de 0,5 na escala McFarland e, posteriormente, diluídos até a concentração de 1×10^6 células por mL, sendo a quantidade utilizada.

Foram adicionados 90 μL de caldo Mueller Hinton (CMH) nos micropoços e, em seguida, foram acrescentados mais 90 μL dos extratos na concentração inicial de 5,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ nas cavidades da linha A até a coluna 9. Seguiu-se com 8 diluições seriadas dos extratos em CMH, retirando 90 μL do micropoço mais concentrado para o sucessor, obtendo-se, assim, concentrações decrescentes (5,0; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,15; 0,07; 0,03 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Depois de realizadas as diluições seriadas, inoculou-se, em cada micropoço, 10 μL da suspensão bacteriana e, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata. As colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas para os controles positivo e negativo dos microrganismos, caldo e extrato (**Figura 6**).

Para melhor garantir a confiabilidade do experimento foram feitos cinco controles: 1) para avaliar a esterilidade do meio de cultura; 2) para avaliar a esterilidade do extrato-teste; 3) para avaliar a atividade do antibiótico Cloranfenicol (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 4) para certificar a viabilidade dos microrganismos testados; 5) para verificar a interferência dos diluentes dos extratos acrescidos dos microrganismos-teste. Todos os testes foram realizados em triplicata.

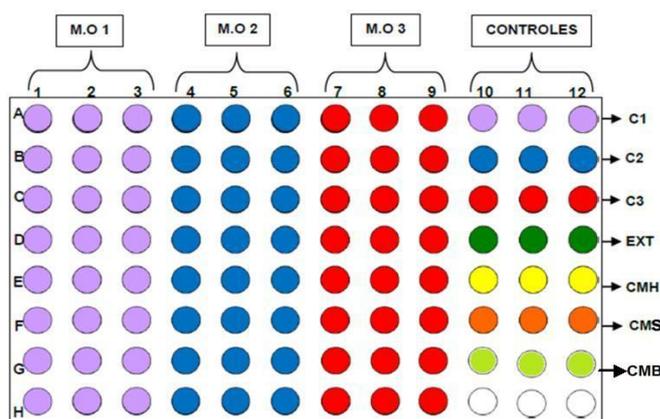


Figura 6. Esquema do ensaio antibacteriano realizado para a determinação da CIM. C1, C2 e C3: Controle dos microrganismos; EXT.: Controle do extrato; CMH: Controle do meio de cultura; CMS: Controle do diluente; CMB: Controle com antibiótico; M.O: Microrganismos.

Após o período de incubação, para a revelação final das bactérias adicionou-se 50 µL de resazurina (0,01%), como indicador de crescimento bacteriano nos poços de ensaio, o que permitiu detectar a viabilidade celular. As colorações rosa e vermelha indicam a presença de células viáveis em crescimento e a coloração azul indica a ausência. Para verificar se os extratos testados que deram resultado positivo possuíam efeito bactericida ou bacteriostático, foi realizado o teste da Concentração Microbicida Mínima (CMM).

3.3.3 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Para a determinação da CMM foram utilizadas placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (AMH). Para os poços que apresentaram resultados positivos no teste de CIM, foram retiradas alíquotas de 5,0 µL e plaqueadas sobre AMH, sendo as placas posteriormente incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. A CMM é considerada a menor concentração do extrato onde não há o crescimento celular sobre a superfície do AMH.

O crescimento de colônias de bactérias durante o desenvolvimento dos testes indica o efeito bacteriostático dos extratos, enquanto a ausência de crescimento dos microrganismos indica o efeito bactericida dos extratos.

3.4 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos

O efeito inibitório dos extratos sobre o crescimento de fungos filamentosos foi verificado utilizando-se o teste de difusão em discos, aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido pelo National Committee for Clinical Laboratory

Standards (NCCLS) (2013). Inicialmente, os fungos foram repicados em Agar Extract Malt (MEA). Para isso, foi utilizado um inóculo na concentração de 10^7 esporos/mL, com contagem em câmaras de Newbauer. O inóculo foi transferido para a placa contendo meio MEA, pela técnica de espalhamento em superfície.

Discos de papel-filtro de 5 mm de diâmetro embebidos com 10 μ L de extrato etanólico e suas frações, nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 μ g. mL⁻¹ foram colocados sobre o meio de cultura, como sugerido por Karaman et al. (2003). O controle negativo foi realizado por meio de discos embebidos em 10 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) e, para o controle positivo, foi utilizado um fungicida controle (hipoclorito de sódio a 2%). As placas foram incubadas em BOD a 25°C, por um período de 72 horas.

A avaliação foi feita comparativamente, a partir das medidas dos halos de inibição do crescimento dos micro-organismos, realizadas para as amostras e para o padrão de referência (controle positivo). Os halos de inibição correspondem às regiões de inibição do crescimento dos fungos, partindo-se da circunferência do disco, até a margem onde houve crescimento do fungo, realizando-se medições ortogonais do diâmetro, sendo cada medição correspondente à média de duas medidas diametralmente opostas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração dos extratos na qual se identificou a presença do halo de inibição (ZACARONI et al., 2011).

3.4.1 Microrganismos teste

As colônias dos fungos utilizadas nos experimentos foram cedidas pelo laboratório de Micologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, (**Tabela 2**). Os fungos foram repicados em meio Agar Extract Malt (MEA) e incubados em temperatura de 30°C.

Tabela 2. Fungos utilizados nos testes

Fungos
<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Aspergillus carbonarius</i>
<i>Aspergillus niger</i>
<i>Penicillium comune</i>
<i>Penicillium clodosporoides</i>

3.5 Testes de Prospecção Química

3.5.1 Testes *in vitro* para a identificação dos constituintes químicos

Os extratos etanólicos foram submetidos à triagem fitoquímica prévia, para a identificação das principais classes de metabólitos secundários presentes nas amostras, através de reações químicas *in vitro*, usando reagentes capazes de produzir complexos coloridos e/ou precipitação e efervescência típicos para cada classe de substâncias analisadas (MATOS, 1997, SIMÕES et al., 2004).

Para a realização dos testes, utilizou-se 2 g do extrato etanólico, que foi solubilizado em 40 mL de solução hidroetanólica a 70%. Porções de 5 mL dessa solução foram transferidas para diferentes tubos de ensaio enumerados e submetidos às análises, de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997), descritas a seguir.

Identificação de Alcaloides

No teste para identificação de alcaloides utilizou-se 2,0 mL da solução hidroetanólica dos extratos, adicionou-se 2,0 mL de HCl 0,1 M e essa mistura foi aquecida por 10 minutos. Esfriou-se, filtrou-se e dividiu-se o filtrado em três tubos de ensaio, adicionando-se algumas gotas dos reativos de reconhecimento: Dragendorff, Mayer e Wagner. Uma leve turbidez ou precipitado (respectivamente roxo a laranja, branco a creme e marrom) evidencia a possível presença de alcaloides.

Identificação de Taninos

Em tubos de ensaio adicionaram-se 2,0 mL das soluções hidroetanólicas dos extratos e adicionou-se 5,0 mL de água destilada. Filtrou-se e ao sobrenadante acrescentou-se 1 a 2 gotas de solução de cloreto férrico a 10%. O aparecimento de coloração azul indica a possível presença de taninos hidrolisáveis e coloração verde de taninos condensados.

Identificação de Saponinas

Em tubos de ensaio adicionaram-se 5,0 mL de água fervendo à 2,0 mL das soluções hidroetanólicas. Esfriou-se, agitou-se vigorosamente e deixou-se o líquido em repouso por 20 minutos. Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espumas.

Identificação de Flavonoides

Em tubos de ensaio adicionaram-se 2,0 mL das soluções hidroetanólicas e alguns fragmentos de magnésio metálico e agregou-se, pelas paredes do tubo, algumas gotas de HCl diluído. Observou-se a produção de coloração, que varia para as diferentes estruturas.

Identificação de Cumarinas

Em tubos de ensaio adicionaram-se 2,0 mL das soluções hidroetanólicas, tampou-se com papel de filtro impregnado com solução a 10% de NaOH e levou-se a banho-maria por 10 minutos. Removeu-se o papel filtro e examinou-se sob luz ultravioleta. A fluorescência amarela ou verde indica a presença de cumarinas.

Identificação de Glicosídeos Cardiotônicos

A 2,0 mL das soluções dos extratos adicionaram-se 3,0 mL de solução de acetato de chumbo a 10% e 2,0 mL de água destilada. As misturas foram aquecidas em banho-maria durante 10 minutos. Filtrou-se e adicionou-se aos filtrados 10,0 mL de clorofórmio, agitou-se com cuidado e deixou-se o funil em repouso para a separação da fase clorofórmica. Posteriormente, evaporou-se o solvente e adicionou-se 1,0 mL de Reativo de Baljet. O aparecimento de coloração roxa, laranja-arroxeadada ou violeta indica a presença de glicosídeos cardiotônicos.

Identificação de Catequinas

Palitos de fósforo de madeira foram umidecidos com os extratos e, posteriormente, em ácido clorídrico concentrado. Secou-se flambando ao calor de uma chama forte. Foi avaliada a formação de cor na madeira. O aparecimento de cor vermelha denota a presença de catequinas.

Heterosídeos antociânicos

Adicionou-se em 4 tubos de ensaio 1 mL do extrato hidroalcoólico. Um deles foi usado como padrão, os demais foram tratados da seguinte forma: o primeiro foi alcalinizado com solução de NaOH a 5%, o segundo foi acidificado com ácido clorídrico a 10% e o terceiro foi mantido a pH neutro. Para a verificação do pH dos extratos contidos nos tubos de ensaio foram usadas fitas de pH. A mudança de coloração ou o aparecimento de coloração nos diferentes tubos indica a presença de heterosídeos antociânicos.

Identificação de Gomas e Mucilagens

Adicionou-se 1 mL dos extratos hidroalcoólicos em tubos de ensaio e, aos poucos, foram adicionadas gotas de acetato de chumbo neutro, até cessar o aparecimento de precipitado. A mistura foi filtrada em papel de filtro e, aos filtrados, adicionados 0,5 mL de acetato de chumbo ácido. O aparecimento de precipitado indica reação positiva.

3.5.2 Determinação do teor de flavonoides totais

A concentração dos flavonoides totais foi determinada por ensaio colorimétrico usando cloreto de alumínio como agente cromofórico, de acordo com a metodologia descrita por Marinova et al. (2005), com modificações. Para a realização do ensaio foi utilizada a concentração de $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para o extrato etanólico dos caules e para as frações hexânica (FH), diclorometânica (FD) e hidroalcoólica (FHA), já para fração acetato de etila (FAE) foi utilizada a concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, usando-se metanol como solvente em todas as amostras. A leitura foi realizada a 510 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV mine 1240, sendo utilizada a quercetina como padrão de referência para obtenção da curva analítica.

Alíquotas de 1,0 mL de cada amostra foram adicionadas em balões volumétricos de 10,0 mL, contendo 4,0 mL de água deionizada. Em seguida, acrescentou-se 0,3 mL da solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO_2) a 5% e agitados em agitador de tubos. Após cinco minutos, 0,3 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10% foram adicionados e as soluções homogeneizadas. Após seis minutos, 2,0 mL de solução aquosa de NaOH a 1,0 M foram adicionados e o volume acertado para 10,0 mL com água deionizada. As soluções foram agitadas e as absorbâncias foram lidas a 510 nm, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos as amostras. Todas as amostras foram preparadas em triplicata e em ambiente escuro.

Para determinar o teor de flavonoides construiu-se a curva analítica com padrão de quercetina (20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e $100,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), sendo as absorbâncias das amostras interpoladas na curva padrão da quercetina. O teor de flavonoides totais foi expresso como mg de EQ (equivalente de quercetina) por g de extrato.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi definida como a menor concentração do material testado capaz de inibir totalmente o crescimento visual das bactérias. As frações obtidas dos extratos etanólicos da raiz da *P. bracteosa* mostraram-se mais eficientes na inibição das cepas bacterianas avaliadas nos testes. Os extratos etanólicos obtidos das partes aéreas e do caule da *P. bracteosa* não inibiram as cepas de microrganismos avaliados, em nenhuma das concentrações testadas.

A CIM encontrada para a fração diclorometânica das partes aéreas da *P. bracteosa* foi de 2,5 mg.mL⁻¹, para as cepas de *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (CBAM 0278). As cepas *E. cloacae* e *P. vulgaris* foram inibidas na concentração de 1,25 mg.mL⁻¹ do extrato. A fração acetato de etila não provocou a inibição dos microrganismos em nenhuma das concentrações testadas. A fração hexânica se mostrou eficiente na concentração de 0,15 mg.mL⁻¹ para *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (CBAM 0278), de 1,25 mg.mL⁻¹ para *E. cloacae* e *P. vulgaris* e de 0,62 mg.mL⁻¹ para as demais bactérias (**Tabela 3**).

De acordo os resultados descritos na Tabela 4, as frações obtidas do caule da *P. bracteosa* inibiram as cepas de *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* (CBAM 0278) na concentração de 2,5 mg.mL⁻¹ e as cepas de *E. cloacae* e *P. vulgaris* na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹. A fração acetato de etila, com exceção da cepa *E. cloacae*, que não foi inibida em nenhuma das concentrações testadas, inibiu todos os outros microrganismos na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹. E a fração hexânica não inibiu as cepas microbianas em nenhuma das concentrações testadas.

Tabela 3. Resultados dos testes de avaliação da atividade antibacteriana expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos das folhas da *Poincianella bracteosa* frente a diferentes cepas bacterianas

Microrganismos	CIM (mg.mL ⁻¹)			
	Extrato Etanólico	Fração Hexânica	Fração Diclorometânica	Fração Acetato de etila
<i>E. faecalis</i> (ATCC 31299)	NI	0,15	2,50	NI
<i>S. aureus</i> (ATCC 43300)	NI	0,31	2,50	NI
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NI	0,31	2,50	NI
<i>E. cloacae</i> (INCOS 006)	NI	0,62	1,25	NI
<i>P. vulgaris</i> (CBAM 0169)	NI	0,62	1,25	NI
<i>E. faecalis</i> (CBAM 0278)	NI	0,62	2,50	NI

*NI: Não ocorreu inibição.

Tabela 4. Resultados dos testes de avaliação da atividade antibacteriana expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos do caule da *Poincianella bracteosa* frente a diferentes cepas bacterianas

Microrganismos	CIM (mg.mL ⁻¹)			
	Extrato Etanólico	Fração Hexânica	Fração Diclorometânica	Fração Acetato de etila
<i>E. faecalis</i> (ATCC 31299)	NI	NI	2,5	5,0
<i>S. aureus</i> (ATCC 43300)	NI	NI	2,5	5,0
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NI	NI	2,5	5,0
<i>E. cloacae</i> (INCOS 006)	NI	NI	5,0	NI
<i>P. vulgaris</i> (CBAM 0169)	NI	NI	5,0	5,0
<i>E. faecalis</i> (CBAM 0278)	NI	NI	2,5	5,0

*NI: Não ocorreu inibição.

Os extratos da raiz da *P. bracteosa* foram os que apresentaram melhores resultados na avaliação da atividade antibacteriana, em comparação com os demais. O extrato etanólico mostrou-se eficiente na concentração de 0,62 mg.mL⁻¹ para a cepa de *E. faecalis*. Já para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* e *E. faecalis* (CBAM 0278) foi ativo na concentração de 1,25 mg.mL⁻¹ e não foi capaz de inibir a cepa de *E. cloacae* em nenhuma das concentrações testadas.

A fração diclorometânica da raiz da *P. bracteosa* foi a que apresentou os melhores resultados nos testes de inibição do crescimento bacteriano. Inibiu as cepas de *E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* na concentração de $0,03 \text{ mg.mL}^{-1}$, as cepas de *P. vulgaris* e *E. faecalis* (CBAM 0278) na concentração de $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ e de *E. cloacae* na concentração de $5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (**Figura 7**).

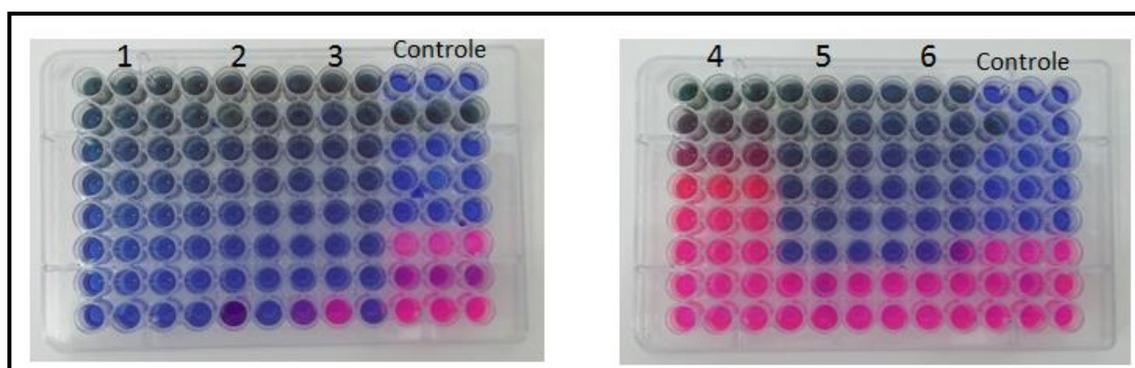


Figura 7. Fotos das microplacas onde foram realizados os testes de avaliação da atividade antibacteriana da fração diclorometânica da raiz de *P. bracteosa*. **1:** *E. faecalis*; **2:** *S.aureus*; **3:** *P. aeruginosa*; **4:** *E. cloacae*; **5:** *P.vulgaris*; **6:** *E. faecalis*

A fração acetato de etila da raiz da *P. bracteosa* inibiu a cepa de *E. faecalis* na concentração de $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a cepa de *E. cloacae* na concentração de $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. A fração hexânica da raiz da *P. bracteosa* inibiu as cepas de *E. faecalis* e de *E. cloacae* na concentração de $0,62 \text{ mg.mL}^{-1}$ e as demais cepas na concentração de $1,25 \text{ mg/mL}$ (**Tabela 5**).

Tabela 5. Resultados dos testes de avaliação da atividade antibacteriana expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos da raiz da *Poincianella bracteosa* frente a diferentes cepas bacterianas

Microrganismos	CIM (mg.mL^{-1})			
	Extrato Etanólico	Fração Hexânica	Fração Diclorometânica	Fração Acetato de etila
<i>E. faecalis</i> (ATCC 31299)	0,62	0,62	0,03	0,15
<i>S. aureus</i> (ATCC 43300)	1,25	1,25	0,03	0,31
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1,25	1,25	0,03	0,31
<i>E. cloacae</i> (INCOS 006)	NI	1,25	5,0	2,50
<i>P. vulgaris</i> (CBAM 0169)	1,25	1,25	0,15	0,62
<i>E. faecalis</i> (CBAM 0278)	1,25	0,62	0,15	0,31

*NI: Não ocorreu inibição.

O fato das frações e não dos extratos brutos da *P. bracteosa* terem apresentado os melhores resultados nos testes de atividade antibacteriana, pode ser explicado pela maior concentração dos compostos ativos nas frações. Posteriormente, será necessário o isolamento e a elucidação dos constituintes responsáveis pela inibição do crescimento dos microrganismos.

Ensaio larvicidas realizados com o extrato etanólico da raiz da *Poincianella bracteosa* demonstraram potencial atividade, especialmente a fração diclorometânica, que quando comparada às demais frações e com o extrato etanólico, apresentou maior toxicidade sobre as larvas do *A. aegypti* (CRUZ et al., 2015).

Testes de avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *Caesalpinia pyramidalis* (*Poincianella pyramidalis*), frente a *P. aeruginosa*, mostraram valores de CIM de 0,125 mg.mL⁻¹. O extrato metanólico da raiz, frente à cepa de *E. faecalis* (AM128) foi moderadamente ativo. Para a fração acetato de etila da raiz da mesma espécie os valores de CIM foram de 0,50 e 0,25 mg/mL⁻¹, respectivamente, frente às cepas de *E. coli* e *S. aureus*, resultados estes semelhantes aos obtidos no presente trabalho (SARAIVA et al., 2012). Em todos os extratos foi observada a presença de metabólitos secundários com reconhecida propriedade antimicrobiana, tais como: flavonóides (COWAN, 1999), sitosterol (VIRTUOSO, 2005) e derivados cinâmicos (ALMEIDA, 2002).

Mazzutti et al. (2012) indicam a seguinte classificação antimicrobiana para produtos naturais a partir dos valores de CIM encontrados para seus extratos: CIM de até 0,5 mg.mL⁻¹ são inibidores potentes, entre 0,6 e 1,5 mg./mL⁻¹ são inibidores moderados, acima de 1,6 mg.mL⁻¹ são inibidores fracos. O potencial antimicrobiano de vários produtos naturais é determinado a partir desta classificação.

Estudos comparativos com plantas medicinais são de difícil realização, tendo em vista os vários fatores abióticos envolvidos no crescimento dos vegetais, que vão desde os aspectos climáticos, exercendo influência na composição química do vegetal, como o estágio do seu desenvolvimento na coleta, a parte da planta estudada, preparo do material para estudo, até os protocolos seguidos nos experimentos (AURICCHIO et al., 2003).

Para analisar os resultados da atividade antimicrobiana é necessário levar em consideração que fatores naturais podem influenciar no metabolismo e na produção de

metabólitos secundários pelos vegetais, como radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, temperatura, solo, nutrientes e estação do ano. Outros fatores também podem influenciar na produção de metabólitos secundários, como a presença de poluentes e mecanismos de defesa contra patógenos como vírus, bactérias, fungos e insetos (BECHO et al., 2010; SILVA Jr. et al., 2009).

As bactérias desenvolvem mecanismos que incluem a resistência, a tolerância e a persistência, que as tornam capazes de sobreviver à ação letal dos antibióticos e quimioterápicos (FREITAS, 1989; VAN ASSETT, 1996). A diversidade de compostos encontrados nos extratos vegetais e seus distintos mecanismos de ação inibem a adaptação microbiana, dificultando que os microrganismos se tornem resistentes aos antimicrobianos naturais (MATIAS et al., 2013).

4.2 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Após a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), os poços em que os extratos se mostraram eficientes foram testados para determinar a Concentração Microbicida Mínima (CMM).

Os resultados dos testes bacteriostáticos/bactericidas revelaram que tanto os extratos etanólicos quanto as frações da *Poincianella bracteosa*, de todas as partes da planta estudadas, apresentaram ação bacteriostática nas concentrações onde ocorreu a inibição dos microrganismos, isto é, os extratos ativos nas concentrações verificadas nos testes de microdiluição em caldo, não provocaram a morte das bactérias testadas, apenas houve a inibição da sua multiplicação. A fração hexânica da folha foi a única que apresentou atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* na avaliação da CMM.

Os antibióticos podem agir sobre as bactérias susceptíveis afetando seu crescimento e reprodução, causando, assim, um efeito bacteriostático, e/ou induzindo sua morte, provocando um efeito bactericida (FERREIRA et al., 2007).

Quando um microrganismo desenvolve resistência a um antibiótico significa que este, antes sensível à ação de um antibiótico, não é mais afetado por ele. Um fato relevante na resistência dos microrganismos aos antibióticos é que muitas drogas são bacteriostáticas (BLACK, 2002).

4.3 Avaliação da atividade antifúngica dos extratos de *P. bracteosa*

Os extratos das folhas da *P. bracteosa* não apresentaram atividade antifúngica frente aos micro-organismos testados. A fração acetato de etila se mostrou eficiente na inibição da *A. carbonarius*, *P. comune* e *P. cladosporioides* (**Tabela 6**).

Tabela 6. Resultados dos testes antifúngicos dos extratos das folhas da *Poincianella bracteosa* frente a diferentes cepas de fungos

Fungos	CIM ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)				HP
	Extrato Etanólico	Fração Hexânica	Fração Diclorometânica	Fração Acetato de etila	
<i>A. flavus</i>	NI	NI	NI	NI	100
<i>A. carbonarius</i>	NI	NI	NI	1000	100
<i>A. niger</i>	NI	NI	NI	NI	100
<i>P. comune</i>	NI	250	1000	250	100
<i>P.cladosporioides</i>	500	500	250	500	100

*NI: Não ocorreu inibição; HP: Hipoclorito 2%.

Os extratos do caule da *P. bracteosa* apresentaram melhores resultados para *P. comune* e *P. cladosporioides*, onde os resultados variaram de 31,25 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Tabela 7**). Já para o fungo *A. flavus* não foi observada inibição em nenhuma das concentrações testadas, se mostrando mais resistente.

Tabela 7. Resultados dos testes antifúngicos dos extratos do caule da *Poincianella bracteosa* frente a diferentes cepas de fungos

Fungos	CIM ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)				HP
	Extrato Etanólico	Fração Hexânica	Fração Diclorometânica	Fração Acetato de etila	
<i>A. flavus</i>	NI	NI	NI	NI	100
<i>A. carbonarius</i>	500	1000	NI	1000	100
<i>A. niger</i>	NI	NI	NI	1000	100
<i>P. comune</i>	62,5	250	125	125	100
<i>P.cladosporioides</i>	250	500	250	31,25	100

*NI: Não ocorreu inibição; HP: Hipoclorito 2%.

Os extratos da raiz foram os que se mostraram mais ativos nos testes de atividade antifúngica, estando em concordância com os resultados encontrados nos testes antibacterianos (**Tabela 8**). O extrato bruto da raiz foi o único que conseguiu

inibir o fungo *A. flavus*, na concentração de 500 µg mL⁻¹. Tanto o extrato bruto quanto as frações foram eficientes na inibição do *P. comune* e *P. cladosporioides*.

Tabela 8. Resultados dos testes antifúngicos dos extratos da raiz da *Poincianella bracteosa* frente a diferentes cepas de fungos

Fungos	CIM (µg. mL ⁻¹)				HP
	Extrato Etanólico	Fração Hexânica	Fração Diclorometânica	Fração Acetato de etila	
<i>A. flavus</i>	500	NI	NI	NI	100
<i>A. carbonarius</i>	500	1000	500	1000	100
<i>A. niger</i>	NI	NI	1000	1000	100
<i>P. comune</i>	62,5	250	125	125	100
<i>P.cladosporioides</i>	31,25	500	250	31,25	100

*NI: Não ocorreu inibição; HP: Hipoclorito 2%.

4.4 Prospecção Química

Os resultados dos testes de prospecção química realizados no extrato etanólico das folhas da *P. bracteosa* indicaram a presença de glicosídeos, flavonoides, gomas e mucilagens, taninos e heterosídeos antocianicos (**Tabela 9**).

Tabela 9. Resultados da prospecção química *in vitro* do extrato etanólico obtido das folhas da *Poincianella bracteosa*

Constituintes	Resultados
Cumarinas	-
Saponinas	-
Glicosídeos	+
Alcaloides	-
Flavonoides	+
Catequinas	-
Gomas e mucilagens	+
Taninos condensados	+
Heterosídeos antocianicos	+

(+) Resultado positivo (-) Resultado negativo

Na prospecção feita com o extrato etanólico do caule da *P. bracteosa* foram encontrados flavonóis, flavonas, taninos e esteroides terpenoides (**Tabela 10**).

Tabela 10. Resultados da prospecção química *in vitro* do extrato etanólico obtido do caule da *Poincianella bracteosa*

Constituintes	Resultados
Antocianinas	-
Flavonas	+
Flavonóis	+
Xantonas	+
Saponinas	-
Taninos pirogálicos	+
Antocianinas	-
Alcaloides	-
Esteróides terpenoides	+
Catequinas	-

(+) Resultado positivo (-) Resultado negativo

Nos testes realizados com o extrato etanólico da raiz, identificou-se a presença de catequinas, flavonas e xantonas (**Tabela 11**).

Tabela 11. Resultados da prospecção química *in vitro* do extrato etanólico obtido da raiz da *Poincianella bracteosa*

Constituintes	Resultados
Saponinas	-
Heterosídeos Cardiotônicos	-
Antocionas e antocionidinas	-
Catequinas	+
Flavonas	+
Xantonas	+
Chalconas	-
Auronas	-
Flavonóis	-
Alcaloides	-

(+) Resultado positivo (-) Resultado negativo

Os taninos apresentam uma grande importância nas interações entre a planta e o meio, onde exercem papel relevante na inibição de herbívoros, atuando, também, no papel de agentes antimicrobianos, sendo compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico (SANT'ANA et al., 2002).

Estudos sobre a bioatividade dos taninos demonstraram que eles possuem importante ação antibacteriana, ação sobre protozoários, na reparação de tecidos, regulação enzimática e protéica, entre outros. Estes efeitos vão depender da dose, tipo de tanino estudado e período de ingestão. De acordo com Mello e Santos (2004), diversas atividades biológicas têm sido atribuídas aos taninos, como ação bactericida, fungicida e antiviral. Contribuem também no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações, através da formação de uma camada protetora sobre a pele ou mucosa danificada. Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos devam-se a três propriedades: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos.

Os terpenos também apresentam funções variadas nos vegetais, podendo atuar desde a atração de polinizadores até a proteção das plantas contra fungos e bactérias. São também precursores de hormônios de crescimento vegetal (GERSHENZON e DUDAVERA, 2007).

Nos testes fitoquímicos realizados por Cruz et al. (2015), utilizando o extrato etanólico da raiz da *Poincianella bracteosa*, indicou-se a presença de ácidos fixos fortes, alcaloides, bases quaternárias, flavonóis, flavanonóis, flavanonas, resinas, taninos condensados, triterpenóides e xantonas, sendo alguns destes metabólitos encontrados também no presente trabalho.

Os resultados das prospecções químicas realizadas em todas as partes da *P. bracteosa* demonstraram a presença de compostos da classe dos flavonoides. A atividade antibacteriana destes compostos é comprovada por vários autores. Cushnie e Lamb (2011) propõem que a atividade dos flavonoides está relacionada à danos provocados na membrana citoplasmática (causada por perfuração e/ ou redução da fluidez da membrana) e inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase) (CUSHNIE e LAMB, 2011).

No estudo fitoquímico de diferentes partes de *Caesalpinia pyramidalis* (folha, casca do caule e da raiz, exocarpo do fruto e flor) revelou-se a presença, em todos os extratos testados, de vários polifenóis (flavonóides e derivados cinâmicos), esteróides (sitosterol) e açúcares (glicose).

A determinação dos teores de flavonoides nos diferentes extratos da planta demonstrou que esta classe de compostos está presente em alta concentração nas amostras analisadas. A fração diclorometânica foi a que apresentou os maiores teores de flavonoides. Os extratos das folhas mostraram os menores teores de flavonoides, quando comparados às outras partes da *P. bracteosa* (**Tabela 12**).

Tabela 12. Teores de flavonoides encontrados nos extratos das folhas da *Poincianella bracteosa*

Extratos	Atividade Antibacteriana mg.mL ⁻¹	Flavonoides totais (mg EQ g ⁻¹ de extrato)
Extrato Etanólico	-	186,67
Fração Diclorometânica	1,25 – 2,5	240,70
Fração Acetato de Etila	-	543,16
Fração Hexânica	0,15 – 0,31 – 0,62	-

Na tabela 13, é possível observar que, as frações obtidas dos caules da *Poincianella bracteosa* com atividade antimicrobiana, foram as que apresentaram maiores teores de flavonoides, demonstrando, assim, que há uma relação entre a presença de flavonoides nos extratos e o efeito inibitório nas bactérias.

Tabela 13. Teores de flavonoides encontrados nos extratos do caule obtidos da *Poincianella bracteosa*

Extratos	Atividade Antibacteriana mg.mL ⁻¹	Flavonoides totais (mg EQ g ⁻¹ de extrato)
Etanólico	-	86,66
Fração Diclorometânica	2,5 – 5	579,62
Fração Acetato de Etila	5,0	723,10
Fração Hexânica	-	81,90

Os extratos da raiz da *P. bracteosa* apresentaram maiores teores de flavonoides em relação aos extratos das outras partes da planta (folha e caule) e, também, foram os que promoveram uma maior inibição do crescimento das cepas bacterianas avaliadas (**Tabela 14**). A fração diclorometânica foi a que se mostrou mais ativa frente às bactérias avaliadas. Dessa forma, pode-se inferir que a atividade antimicrobiana deve estar relacionada à composição dos flavonoides presentes na planta estudada.

Tabela 14. Teores de flavonoides encontrados nos extratos da raiz obtidos da *Poincianella bracteosa*

Extratos	Atividade Antibacteriana mg.mL⁻¹	Flavonoides totais (mg EQ g⁻¹ de extrato)
Etanólico	0,62 – 1,25	280,00
Fração Diclorometânica	0,03 – 0,15 – 5,0	837,0
Fração Acetato de Etila	0,15 – 0,31 – 0,62 – 2,5	453,7
Fração Hexânica	0,62 – 1,25	587,0

Segundo Cowan (1999), o efeito inibitório dos flavonoides contra microrganismos pode ser devido à interação destes com a membrana celular dos microrganismos alvo, provavelmente devido à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares e com a parede celular.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a espécie *Poincianella bracteosa* apresenta efeito antimicrobiano frente a várias cepas de bactérias e fungos testadas.

O extrato etanólico obtido da raiz da espécie, bem como suas frações foram os que apresentaram os resultados mais promissores nos testes de avaliação da atividade antibacteriana realizados.

A fração diclorometânica obtida do extrato etanólico da raiz da *P. bracteosa* foi a que se mostrou mais ativa contra os microrganismos testados, apresentando um valor de CIM de 0,03 mg.mL⁻¹, frente às cepas de *E. faecalis*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e de 0,15 mg.mL⁻¹ frente as cepas de *P. vulgaris* e *E. faecalis* (CBAM 0278).

A fração hexânica obtida a partir do extrato etanólico das folhas de *P. bracteosa* foi a única que apresentou atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*, nas concentrações de 0,15 mg.mL⁻¹ a 0,62 mg.mL⁻¹. Os demais extratos ativos contra os microrganismos testados mostraram atividade bacteriostática nas concentrações avaliadas.

Nos testes de avaliação da atividade antifúngica das amostras, o extrato etanólico da raiz e suas frações foram os que apresentaram melhores resultados quando comparados aos demais extratos das outras partes da *Poincianella bracetosa*.

Com relação à prospecção fitoquímica, foram encontrados flavonoides (flavonas, favonóis), taninos, glicosídeos, esteroides, entre outros compostos nos extratos etanólicos avaliados.

Observou-se uma relação positiva entre a atividade antimicrobiana e o teor de flavonoides presentes nos extratos avaliados, podendo-se inferir que esta classe de

metabólitos secundários deve estar relacionada à atividade antimicrobiana da espécie estudada.

6 REFERÊNCIAS

AGRIPINO, D.G.; LIMA, M.E.L.; SILVA, M.R.; MEDA, C.I.; BOLZANI, V.S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R.H. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and dnadamaging activities: I. Atlantic rain forest. Ecological station juréia-itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2004.

AKIYAMA, T. et al. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5592-5595, 1987.

ALBAGLI, S. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. **Parcerias estratégicas**, v. 6, n. 12, p. 05-19, 2010.

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

ALMEIDA, E. C., MENEZES, h. Anti-inflammatory activity of própolis extracts: A review. **J. Venom. Anim. Toxins**. V. 8, 2002

ALVAREZ, I. A. et al. Arborização urbana no semiárido: espécies potenciais na Caatinga. **Embrapa Florestas-Documents (INFOTECA-E)**, 2012.

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

ANDRADE-LIMA, D.D.E. The caatingas dominium. **Revista Brasileira Botânica**, v. 4, n. 2, p. 149-163, 1981.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos fitoterápicos**. 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Medicamentos/Assunto+de+Interesse/Medicamentos+fitoterapicos>.

AQUINO, P. L. P.; LIMA, E. O.; FARIAS, M. P.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L.; CECHINEL FILHO, V.; CORRÊA, R.; ANDRICOPULO, A. Atividade antifúngica de maleimidias contra dermatófitos isolados de *Tinea capitis*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 4, p.191-194, 2003.

ARANA-SÁNCHEZ, A., ESTARRÓN-ESPINOSA, M., OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N., PADILLA-CAMBEROS, E., SILVA-VÁZQUEZ, R., LUGO-CERVANTES, E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* HBK) with different composition when microencapsulated in β -cyclodextrin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 585-590, 2010.

ARAÚJO, E. L.; CASTRO, C. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of Brazilian Caatinga—A review concerning the plants, environment and people. **Functional Ecosystems and communities**, v. 1, n. 1, p. 15-28, 2007.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L.(pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, p. 55-61, 2003.

BATTISTI, C.; GARLET, T. M. B.; ESSI, L.; HORBACH, R. K.; ANDRADE, A.; BADKE, M. R. Plantas medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 3, 2013.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; DE OLIVEIRA GUERRA, Martha. Rutina—estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, 2010.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

BOTREL, P. P. ; PINTO, J. E. B. P.; ARAÚJO, A. C. C. de; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C.; FERRI, P. H.; COSTA, D. P. da. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* epl. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**. v. 33, n. 1, p.33-37. 2010.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall.

BRANDI, M. L. Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. **Calcified tissue international**, v. 61, n. 1, p. S5-S8, 1997.

BRASIL 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRITTON, N. L. ROSE, J. N. Poincianella. Real Jardim Botânico Kew. 1930

BUCHANAN, B.; GRUISSEM ,W.; JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Eds 2000, American Society of Plant Physiologists.

CALIXTO, J. B. Vinte e cinco anos de Pesquisa sobre Plantas Medicinais na América Latina: Uma visão pessoal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, NS. M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 26-32, 2007.

CASE, C. L.; FUNKE, B. R.; TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010.

CASTRO, A. S.; CAVALCANTE, A. Flores da Caatinga-Caatinga Flowers. **Edição Bilingue, Instituto Nacional do Semiárido, Campina Grande, Brasil**, 2011.

CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.407, p.2365-2384, 2004.

CHIANG, J. C. H; KOUTAVAS, A. Climate change: tropical flip-flop connections. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 684-685, 2004.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6.**

CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003.

COIMBRA FILHO, A. F. **Os limites originais do bioma Mata Atlântica na região Nordeste do Brasil.** FBCN, 1996.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COUTINHO H. D. M., COSTA J. G. M., LIMA E. O., SILVA V. S. F., SIQUEIRA Jr J. P., Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. *In vivo* 23:287-290, 2009.

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

CRUZ, R.C.D; CARVALHO, K.S.; SILVA, S.L.C; GUALBERTO, S.A.G; MACEDO, E.L. Bioatividade da raiz de *Poincianella bracteosa* (Tul.) L.P. Queiroz (Fabaceae) sobre larvas do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 4, p. 259-264, out./dez. 2015.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 14:: 97-103. 2004.

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

DAS, K.; TIWARI, R. K. S.; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. **Journal of medicinal plants research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9-10, p. 71-6, 2004.

DEACON, J. **Fungal Biology** (4th edition). Blackwell Publishing, Inglaterra, 2006.

DORIGONI, P.A., GHEDINI, P.C., FRÓES, L.F., BAPTISTA, K.C., ETHUR, A.B.M., BALDISSEROTTO, B., BÜRGER, M.E., ALMEIDA, C.E., LOPES, A.M. e ZÁCHIA, R.A. 2001. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil. I – Relação entre enfermidades e espécies utilizadas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** 4: 69–79. 2001

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DRUMONT, M. A. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro e o mais frágil. *Revista do Instituto Humanitas Unisinos* N° 389 - Ano XII, 2012.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7::1-16. 2006.

FERRAZ, J. S. F.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, M. V. F.; MEUNIER, I. M. J. Usos de espécies leñosas de la caatinga del municipio de Floresta en Pernambuco, Brasil: conocimiento de los indios de la aldea. *Travessão do Ouro. Bosque*, v. 33, n. 2, p. 183-190, 2012.

FERREIRA, B. L. A. Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia). **Universidade federal Fluminense**, 2007.

FRACARO, S. N. Potencial de toxicidade reprodutiva do extrato de *Tillandsia usneoides* Linnaeus, 1762 (barba-de-pau) em coelhas gestantes. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FREITAS, C. C. et al., Resistência e Tolerância a antibióticos em cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de pacientes do HUAP-UFF. *Revista Brasileira de Medicina*. V.46 (7), 1989.

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

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 1, p. 63-73, 2002.

GHEDINI, P. C. et al. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS. II-Emprego de preparações caseiras de uso medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 5, n. 1, p. 46-55, 2002.

GIULIETTI, A. M. et al. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Conservação Internacional Brasil**. 2005. p. 52-61.

GOTTLIEB, O. R. New and underutilized plants in the Americas: Solutions to problems of inventory through systematics. **Interciencia**, v. 6, n. 1, p. 22-29, 1981.

GOTTLIEB, O.; KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência hoje**, v. 15, n. 89, p. 51-54, 1993.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. 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.

HAMILTON, A. Medicinal plants and conservation: issues and approaches. **International Plants Conservation Unit, WWF-UK**, v. 51, 2003.

IBAMA. Monitoramento dos biomas brasileiros: bioma caatinga. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2010

IMMING, P.; SINNING, C.; MEYER, A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 10, p. 821, 2006.

KARPANEN, T. J., CONWAY, B. R., WORTHINGTON, T., HILTON, A. C., ELLIOTT, T. S., & LAMBERT, P. A. Enhanced chlorhexidine skin penetration with eucalyptus oil. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 278, 2010.

KHOSLA, C. Combinatorial biosynthesis: new tools for the medicinal chemist. **ChemInform**, v. 29, n. 22, 1998.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2010.

KROL, M. S. JAEGAR, A.; BRONSTERT & KRYWKOW, J. The semi-arid integrated model (SIM), a regional integrated model assessing water availability, vulnerability of ecosystems and society in NE-Brazil. **Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere**, v. 26, n. 7, p. 529-533, 2001.

LEAL, I. R.; SILVA, J.M. C.; TABARELLI, M. LACHER JR., T. E. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga do Nordeste do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 139-146, 2005.

LEVY, S. B.; *Clin. Infect. Dis.* **2001**, 33, S124; Demain, A. L.; *Nat. Biotechnol.* **2002**; Woodford, N.; *Clin. Microbiol. Infec.* **2005**.

LIMA, B. G.de **Caatinga: espécies lenhosas e herbáceas**. 2012.

LOGUERCIO, A. P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LORENZI, V., MUSELLI, A., BERNARDINI, A. F., BERTI, L., PAGÈS, J. M., AMARAL, L., BOLLA, J. M. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2209-2211, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock biology of microorganisms. **International Edition**, 2003.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. **Computação Gráfica e Editora: São Paulo**, 2004. 413 p.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. Fortaleza: **Printcolor**, 2.ed. 2012.

MAIA-SILVA, C. et al. Guia de plantas visitadas por abelhas na Caatinga. **Fundação Brasil Cidadão, Fortaleza**, 2012.

MARINOVA, D., RIBAROVA, F., ATANASOVA, M., Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. **Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy**, v. 40, n. 3, p. 255-260. 2005.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D. M.; CATELLANE, D.C.; DIAS, J. E. **Plantas Medicinais**. Viçosa: Editora Universidade / UFV, 2000.

MATIAS, E. F. F. et al. Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

MATOS, FJ de A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2. ed. edições UFC, 1997.

MAZZUTTI, S. FERREIRA, S. R. S., RIEHL, C. A. S. , SAMANIA JUNIOR, A.SMANIA, F. A., MARTINEZ, J. Supercritical fluid extraction of *Agaricus brasiliensis*: Antioxidant and antimicrobial activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 70, p. 48-56, 2012.

MEDRADO, H. H. S. Podofilotoxina e derivados: das mandrágoras aos anticancerígenos. 2011. 77p. Monografia (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal da Bahia, Salvador – Ba.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. Taninos. In: C. M. O. Simões; E. P. Schenkel; G. Gosmann; et al. (Eds.); **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5a Ed. ed., p.615–656, 2004. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC.

MICHELIN, D. C., MORESCHI, P. E., LIMA, A. C., NASCIMENTO, G. G. F., PAGANELLI, M. O., E CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev Bras Farmacogn**, v. 15, n. 4, p. 316-20, 2005.

MOELLERING, R. C. Jr.; *Clin. Infect. Dis.* 1998, 27, S135; Dzidic, S.; Suskovic, J.; Kos, B.; **Food Technol. Biotech.** 2008, 46, 11.

MOLINARI, G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology**, p. 13-27, 2009.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VAN DINGENEN, M. A.; TRAJANO, V. N. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential Oil and beta-pinene on the growth of dematiaceous moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2007.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standards. Waine: NCCLS, Document M31-T, 1997. 64p

NIMER, E. Climatologia da região Nordeste do Brasil. Introdução à climatologia dinâmica. **Revista Brasileira de Geografia**, v. 34, n. 1, p. 3-51, 1972.

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

OLIVEIRA W. A., PEREIRA F. O., LUNA G. D. G., LIMA I. O., WANDERLEY P. A., LIMA R. B., LIMA E. O. Antifungal activity of *Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor against *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 42(2):433-41, 2011.

OLIVEIRA, M. M. Aplicações e Avanços na Área da Biotecnologia Vegetal. In: Biotecnologia Molecular: Avanços e Aplicações. **Boletim de Biotecnologia**. Vol. 22, 2000.

OLIVEIRA, T.F.; FERREIRA, J.S.; BOA SORTE, P.M.F.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I; SCHWAB, S. Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 16 p. **Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento**, 49.

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

PALMEIRA-JR, R. S. F. et al. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v 16, 2006.

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

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

PRADO, D. E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. da (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. 2 ed. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 2005. p. 3-74.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier. Cap. 48, p. 692-697, 2007.

RESENDE, A. S.; CHAER, G. M. Manual para recuperação de áreas degradadas por extração de piçarra na Caatinga. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 78p.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant Enterococci. *Journal of Hospital Infection*, v. 50, p.140-144, jun. 2002.

SALAZAR-ARANDA, R.; PÉREZ-LÓPEZ, L.A.; LÓPEZ-ARROYO, J.; ALANÍS-GARZA, B.A.; TORRES, N.W. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast of Mexico. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 30, 2009.

SAMPAIO, E. V.S.B. **Espécies da flora nordestina de importância econômica potencial**. Associação Plantas do Nordeste, 2005.

SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 97(2):199-206, 2005.

SANTOS M. R. A.; LIMA M. R. ; FERREIRA M. G. R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira** 26: 244-250, 2008.

SARAIVA A. M.; SARAIVA , M. G.; GONÇALVES, A. M.;SENA FILHO, J. G.; XAVIER, H. S.; PISCIOTTANO, M. N. C. Avaliação da Atividade Antimicrobiana e perfil Fitoquímico de *Caesalpinia pyramidalis* Tull. (FABACEAE). **Revista de Biologia e Farmácia**. V. 07, N. 02, 2012.

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

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. **et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 371-400, 2003.

SCHISTEK, H. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro... e o mais frágil. **Revista do Instituto de Humanitas Usininos**, n. 389, p. 1-60, 2012.

SHALE, T. L.; STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 3, p. 347-354, 1999.

SHAMA. G. A antibiotics: the BBC, penicillin, and the second world war, *Bmj* 337 , 2008. a2746.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica á luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.

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

SILVA, I. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Assoeste, 1995.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-7, 2007.

SILVA, J.M.C., M. TABARELLI, M.T. FONSECA & L.V. LINS (orgs.) Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. **Ministério do Meio Ambiente, Brasília**, 2004.

SIMÕES C. M. O, SCHENKEL E. P, GOSMANN G, MELLO C.P, MENTZ L.A, PETROVICK P.R. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5 ed Florianópolis: Ed. UFRGS: 2004. 821p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

SONAGLIO D, PETROVICK P.R, BASSANI V.L. Padronização de extratos vegetais: extrato hidroalcoólico de *Achyrocline satureoides* (LAM.) DC., compositae (Marcela): comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em papel/ultravioleta. **Cad Farm.** 1986.

SUMANO, H.; OCAMPO, L. The pharmacological basis for the treatment of bovine mastitis-a review. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, p. 127-127, 1992.

TABARELLI, MARCELO et al. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132-138, 2005.

TOLEDO A.C.O., HIRATA L. L, BUFFON M. C. M. , MIGUEL M. D. , MIGUEL O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Microbiologia. 8a. ed. Porto Alegre, Brasil: ARTMED, 2004.920p.

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

VILELA, J. D.; Rev. Paul. Med. 1977, 89, 115.

VIRTUOSO, S., DAVET, A. DIAS, J.F.G., CUNICO, M. M., MIGUEL, M. D., OLIVEIRA, A. D., MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas da *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V. 15, 2015.

VON NUSSBAUM, F.; BRANDS, M.; HINZEN, B.; WEIGAND, S.; HÄBICH, D.; **Angew. Chem., Int. Ed.** **2006**, *45*, 5072.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2, p. 97-110, 2009.

WALL, M. E.; WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of ethnopharmacology**, v. 51, n. 1-3, p. 239-254, 1996.

WANG, S. Y. et al. The differential inhibitory effects of genistein on the growth of cervical cancer cells in vitro. **Neoplasma**, v. 48, n. 3, p. 227-233, 2001.

WOODS, G.L., WASHINGTON, J.A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A. et al. (Ed.) *Manual of clinical microbiology*. Washington: American Society for Microbiology Press, 1995. p.1327-1341.

YANG YL, WANG AH, WANG CW, CHENG WT, LI SY, LO HJ. Susceptibilidades à anfotericina B e fluconazol de espécies de *Candida* em Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 61:175-180, 2008.

ZAPATA B, DURAN C, STASHENKO E, BETANCUR-GALVIS L, ARANGO ACM. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*. 27(2):101-103, 2010.