



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de
triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter*
*pylori***

LEONARDO GORLA NOGUEIRA

Orientadora: Prof^a Dr^a Tais Maria Bauab

Araraquara – SP

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de
triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter
pylori***

LEONARDO GORLA NOGUEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Microbiologia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tais Maria Bauab

Araraquara – SP

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

N778a Nogueira, Leonardo Gorla
Avaliação do potencial de *Pouteria* spp . e de triterpenos
quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori* / Leonardo Gorla
Nogueira. – Araraquara, 2012
106 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Taís Maria Bauab

1. Triterpenos quinonametídeos. 2. *Pouteria* spp. 3. *Helicobacter pylori*. 4.
Checkerboard ensaio. 5. Time Kiil. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

*Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de
Fisiologia do Micro-organismo do Departamento de
Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista
(UNESP) - Campus de Araraquara-SP*

“ ...os sonhos não determinam o lugar aonde chegaremos, mas produzem a força necessária para tirar-nos do lugar em que estamos. Devemos sonhar com as estrelas para que possamos pisar pelo menos na Lua. Devemos sonhar com a Lua para que possamos pisar pelo menos nos altos montes. Devemos sonhar com os altos montes para que possamos ter dignidade quando atravessarmos os vales das perdas e das frustrações. Se nossos sonhos são pequenos, nossa visão será pequena, nossas metas serão limitadas, nossos alvos serão diminutos, nossa estrada será estreita, nossa capacidade de suportar as tormentas será frágil.

Os sonhos regam a existência com sentido. Se nossos sonhos são frágeis, nossa comida não terá sabor, nossas primaveras não terão flores, nossas manhãs não terão orvalho, nossa emoção não terá romance.

A presença dos sonhos transforma os miseráveis em reis, faz dos idosos, jovens, e a ausência deles transforma milionários em mendigos, faz dos jovens idosos. Os sonhos trazem saúde para a emoção, equipam o frágil para ser autor da sua história, fazem os tímidos terem golpes de ousadia e os derrotados serem construtores de oportunidades.

O destino não é frequentemente inevitável, mas uma questão de escolha. Quem faz uma escolha, escreve sua própria história e constrói seus próprios caminhos.”

Augusto Cury

Dedicatória

“Dedico este trabalho a toda a minha família, alicerce da minha vida, e em especial a um grande homem de Deus, que enquanto viveu formou homens poderosos no Senhor Jesus Cristo, meu tio Luiz Alberto Gorla.”

*“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que
se gosta, mas gostar daquilo que se faz.”*

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

A Deus na pessoa de Jesus Cristo, este que é o Doutor dos Doutores, que pensou em mim antes mesmo de eu nascer, por me carregar nos braços, aliviar o meu fardo e me dar a vida...

Ao meu Pai, João Roberto Bettoni Nogueira, por ter me apresentado Jesus, por ter me ensinado a ser questionador, por mostrar a paixão pela profissão e nunca esquecendo que sonhar é bom e vale a pena... Amo você!

À minha Mãe, Angela Maria Gorla Nogueira, por doar-se por inteira para que nossa casa seja sempre um lugar aconchegante, tranquila e alegre... Amo você!

Ao meu irmão Caio, por ser o precursor da vida acadêmica na minha casa, por ter aberto vários caminhos para que eu passasse... Deus te abençoe, amo você!

À minha irmã Camila, por cuidar de mim de uma maneira única e especial e por ser tão importante em minha vida... Deus te abençoe, amo você!

Ao meu primo-irmão, Rafael (Piru) por desde o início da minha vida estar ao meu lado, sendo um amigo fiel para todas as horas e sempre disposto a me ouvir, mesmo durante as madrugadas... Amo você!

À minha cunhada Camila Lusnick Nogueira por torcer por mim, muito obrigado.

À minha sobrinha Lorena, que em tão pouco tempo trouxe tanta alegria para minha casa... Amo você!

À minha família (Gorla e Nogueira) pela união, momentos de alegria, descontração e por me amarem...

À minha orientadora Prof. Dra. Tais Maria Bauab, que nesses 5 anos me aguentou, me ensinou e também se tornou uma grande amiga. Me ajudou a continuar quando tudo parecia não ter saída, e mostrou-me que a Microbiologia é a melhor ciência do mundo fazendo-me apaixonar cada vez mais por esta ciência... Deus continue-lhe abençoando, muitooooo obrigado!

Em um mundo onde amigos verdadeiros estão escassos, agradeço a três que Deus me deu:

Lucas Pugliezi, pelas conversas no meio das tardes, por sempre me incentivar e acreditar no meu trabalho... Obrigado!

Jairo Toledo, por ter me apresentado à música como arte, com ela minha vida ficou mais calma e tranquila... Obrigado!

Diego Nyko, são inúmeros anos juntos, e amizade fica cada vez mais forte, juntos lutamos, choramos, sorrimos e vencemos... Obrigado!

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Pizzolitto, por há 9 anos ter aberto as portas do seu laboratório e acreditado em mim... Obrigado!

Às companheiras do laboratório de Fisiologia do Micro-organismo, Bruna, Kamila, Mariana e Michele por sempre torcerem por mim e acreditar que tudo daria certo... Obrigado!

À professora Dra. Maysa Furlan e sua aluna pós- doutorado Vânia, do Instituto de Química da Unesp, por terem cedidos as amostras vegetais, de *Salacia* e *Maytenus*, para a realização dos testes.

À professora Dra. Lourdes Campagner dos Santos e sua aluna de doutorado Daryne, do Instituto de Química da Unesp, por terem cedido as amostras vegetais de *Pouteria* para a realização dos testes.

Às técnicas Marisa, Néia e Silvia por estarem sempre dispostas a me auxiliar em que fosse necessário... Obrigado!

Às meninas da Pós-Graduação por sempre me atenderem, pela dedicação, simpatia e tranquilidade dedicadas a mim... Obrigado!

À secretária do departamento de Ciências biológicas, Margarete, por sempre, com muito bom humor e uma risada inconfundível, me ajudar quando eu precisei ... Obrigado!

À biblioteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelas correções.

À todos os funcionários da Unesp.

À Unesp como instituição de ensino.

E por fim... mas com uma imensa importância na minha vida... À minha noiva Flávia Aparecida Resende, que fez com que eu acreditasse que era possível vencer quando eu já estava disposto a desistir, que cuidou de mim esses anos de doutorado, sempre me alegrando e me dando forças para seguir em frente... essa conquista é tão minha quanto sua, e tenho a certeza de que seremos felizes para todo o sempre... muito obrigado... Amo você!

A CAPES pelos meses de bolsa concedida.

No final SEMPRE dá certo!!

SUMÁRIO

	Pag.
RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Produtos naturais.....	19
1.2. O gênero <i>Pouteria</i> (Sapotaceae).....	20
1.3. Triterpenos quinonametídeos.....	23
1.4. Antimicrobianos e a resistência microbiana.....	27
1.5. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana.....	33
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral.....	38
2.2. Objetivos Específicos.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Obtenção dos extratos de <i>P. torta</i> e <i>P. ramiflora</i>	42
3.2. Obtenção da maitenina.....	42
3.3. Obtenção da fração enriquecida contendo maitenina e netzaucoieno (FrMN) e isolamento do netzaucoieno.....	44
3.4. Ensaio de atividade antimicrobiana.....	47
3.4.1. Preparo dos extratos, FrMN e substâncias isoladas.....	47
3.4.2. Meios de cultura e soluções.....	48
3.4.3. Micro-organismos.....	48
3.4.3.1. Cepas bacterianas.....	48
3.4.3.2. Cepa fúngica.....	48
3.4.4. Estocagem dos micro-organismos.....	48
3.4.4.1. Cepas bacterianas.....	48

3.4.4.2. Cepa fúngica.....	49
3.4.5. Padronização dos micro-organismos.....	49
3.4.5.1. Cepas bacterianas.....	49
3.4.5.2. Cepa fúngica.....	49
3.4.6. Controles positivos (bactérias e levedura).....	50
3.4.7. Ensaio de microdiluição para bactérias.....	50
3.4.7.1. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM).....	51
3.4.8. Ensaio de microdiluição para leveduras.....	52
3.4.8.1. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	53
3.4.9. Determinação da porcentagem de inibição dos micro-organismos.....	53
3.4.10. Leitura dos ensaios de microdiluição.....	54
3.4.10.1. Para as bactérias - revelação com resazurina.....	54
3.4.10.2 Para a levedura – revelação com TTC.....	54
3.4.11. Ensaio <i>Checkerboard</i>	55
3.4.12. Ensaios <i>Time Kill</i>	57
 4. RESULTADOS	
4.1. Ensaios de microdiluição.....	59
4.2. Ensaios <i>Chekerboard</i>	63
4.3. Ensaios <i>Time Kill</i>	65
 5. DISCUSSÃO	72
 6. CONCLUSÕES	85
 7. REFERÊNCIAS	87
 ANEXOS	
ANEXO I.....	104

RESUMO

A resistência aos antibióticos é reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a maior ameaça para o tratamento de doenças infecciosas. Uma estratégia importante para ajudar a combater o problema da resistência envolve a descoberta e desenvolvimento de novos agentes capazes de suprimir parcial ou totalmente os mecanismos de resistência microbiana. As plantas de cerrado são conhecidas como uma fonte de compostos de interesse biotecnológico elevado com aplicações na indústria farmacêutica e de alimentos. Dessa maneira, tornou-se relevante avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae), da fração enriquecida de *Salacia campestris* contendo netzaucoieno e maitenina (FrMN) e das substâncias isoladas netzaucoieno de *Salacia campestris* (Hippocrateaceae) e maitenina de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), pela técnica de diluição em microplacas frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* sp. ATCC 19196, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* multi-resistente isolado de paciente hospitalizado, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 e *Candida albicans* ATCC 18804. Além disso, também foi utilizada a técnica de *Checkerboard* frente ao *H. pylori* e *Time Kill* frente aos micro-organismos que apresentaram sensibilidade às substâncias testadas. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato de *P. torta* inibiu o crescimento das cepas de *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli*, enquanto as cepas de *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. setubal* e *C. albicans* foram mais sensíveis frente ao extrato de *P. ramiflora*. Das amostras avaliadas, a maitenina e a FrMN foram as que apresentaram as atividades mais promissoras contra bactérias Gram-positivas *S. aureus* (ATCC), *S. aureus* multi-resistente e *B. subtilis*. Além disso, a maitenina apresentou atividade anti-*C. albicans* e a FrMN anti-*H. pylori*. O netzaucoieno não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhum dos micro-organismos testados, nas condições utilizadas neste estudo. O ensaio *Time Kill* confirmou os resultados obtidos no ensaio de microdiluição. Com relação ao ensaio *Checkerboard*, todas as combinações avaliadas (FrMN + Amoxicilina, FrMN + Claritromicina, FrMN + Omeprazol e FrMN + Tríplice) apresentaram efeito sinérgico. Esse estudo contribui para o *screening* de atividade antimicrobiana dos compostos avaliados, uma vez que o crescente problema da resistência aos antibióticos exige a busca por novos agentes antimicrobianos. Estudos complementares devem ser realizados a fim de elucidar os mecanismos de ação dos compostos utilizados neste estudo.

Palavras-chave: *Pouteria torta*, *Pouteria ramiflora*, triterpenos quinonametídeos, resistência microbiana, ensaio *Checkerboard*, ensaio *Time Kill*.

ABSTRACT

The antibiotic resistance is known by the World Health Organization (WHO) as the biggest threat to the treatment of infectious diseases. An important strategy to help tackle resistance involves the discovery and development of new agents able to partially or totally suppress the microbial resistance mechanisms. “Cerrado” plants are known as a source of compounds of high biotechnological interest with applications in the pharmaceutical industry and the food industry. In this manner, it has become relevant to evaluate the antimicrobial activity of the extracts of the *Pouteria torta* and *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae), of the enriched fraction of *Salacia campestris* containing netzaucoien and maytenin (FrMN) and of the isolated substances netzaucoien of *Salacia campestris* (Hippocrateaceae) and maytenin of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae), through the technique of dilution in microplates against microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* sp. ATCC 19196, *Bacillus subtilis* ATCC 19659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* multi-resistant isolated of a hospitalized patient, *Helicobacter pylori* ATCC 43504 and *Candida albicans* ATCC 18804. Other than that, the *Checkerboard* technique against the *H. pylori* and *Time Kill* against the microorganisms that were sensitive to the tested substances. The obtained results demonstrated that the *P. torta* extract inhibited the *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli* growth, while the *P. ramiflora* extract, the strain *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. setubal* and *C. albicans* were more sensitive. Of the evaluated compounds, the maytenin and the FrMN were within those who presented the most prominent activities against the bacteria Gram-positive *S. aureus* (ATCC) and *S. aureus* multi-resistant, and *B. subtilis*. Besides, the maytenin presented anti-*C. albicans* activity and the FrMN anti-*H. pylori*. The netzaucoien did not presented antimicrobial activity against none of the microorganisms tested, in the conditions used in this study. The assay *Time Kill* confirmed the obtained results in the microdilution assay. Regarding the assay *Checkerboard* all the evaluated combinations (FrMN + Amoxicillin, FrMN + Clarithromycin, FrMN + Omeprazole and FrMN +Triple) presented a synergistic effect. This study contributes to the *screening* of the evaluated compound antimicrobial activities, once the growing problem of the resistance to antibiotic demands a search for new antimicrobial agents. Complementary studies ought to be performed in order to elucidate the action mechanisms of the compounds utilised this studie.

Key-words: *Pouteria torta*, *Pouteria ramiflora*, triterpenes quinone-methides, microbial resistance, *Checkerboard* assay, *Time Kill* assay.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMH – Agar Müller-Hinton

AMP - Ampicilina

AMX - Amoxicilina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

CBM - Concentração bactericida mínima

CCPC – Cromatografia de partição centrífuga

CDC - Centros de Prevenção e Controle de Doenças

CFM - Concentração fungicida mínima

CIF - Concentração inibitória fracionada

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector no ultravioleta

CLR - Claritromicina

CLSI- *Clinical Laboratory Standard Institute*

CMH - Caldo Müller-Hinton

EtOH - Etanol

FrMN – Fração enriquecida contendo maitenina e netzaucioeno

HPLC-DAD - *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detector*

(Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos)

HPLC-UV - *High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet Detector*

H₂O - Água

ICIF - Índice de concentração inibitória fracionada

MeOH - Metanol

MOPS- Tampão ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico

NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

OMP - Omeprazol

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Solução salina tamponada com fosfatos

PPI - Inibidor da bomba de prótons

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute* (meio de cultura – série 1640)

TTC - Cloreto de 2,3,5- trifenil tetrazólio

TTF- 1,3,5- trifenilformazan

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 – (A) <i>Pouteria torta</i> e (B) <i>Pouteria ramiflora</i>	23
Figura 2 – Estruturas químicas da (A) maitenina e (B) netzaucioeno.....	27
Figura 3 – Estados de replicação do <i>H. pylori</i> (sensibilidade aos antibióticos) e um estado não replicativo (insensibilidade aos antibióticos) de acordo com os pH nos microambientes. PPI: inibidor da bomba de prótons, A: amoxicilina, C: claritromicina.....	31
Figura 4 - (A) Colônia de coloração branca, superfície lisa, textura glabrosa úmida, característica das espécies de <i>Candida</i> e micromorfologia; (B) mostrando clamidoconídios de <i>Candida albicans</i>	32
Figura 5 – HPLC da substância isolada maitenina.....	43
Figura 6 – HPLC (420 nm) da fração enriquecida contendo maitenina e netzaucioeno.....	45
Figura 7 – HPLC (254 nm) da fração enriquecida contendo maitenina e netzaucioeno.....	45
Figura 8 –HPLC da substância isolada netzaucioeno.....	46
Figura 9 - Esquema da diluição empregada no teste de microplacas para avaliação da atividade antibacteriana.....	50
Figura 10 - Esquema de diluição seriada no ensaio <i>Checkerboard</i> para avaliação da atividade sinérgica da FrMN, frente ao <i>H. pylori</i>	55
Figura 11 – Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com <i>Pouteria torta</i>	60
Figura 12 - Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com <i>Pouteria ramiflora</i>	61
Figura 13 - Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com maitenina.....	61
Figura 14 - Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com a FrMN.....	62
Figura 15 - Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com	

netzaucoieno.....	62
Figura 16 - Atividade antibacteriana dos extratos de <i>P. torta</i> (125 µg/mL), <i>P. ramiflora</i> (125 µg/mL), maitenina (0,49 µg/mL) e FrMN (0,98 µg/mL) contra <i>S. aureus</i> (ATCC) pelo ensaio <i>Time Kill</i> . (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).....	66
Figura 17 - Atividade antibacteriana da maitenina (0,49 µg/mL) e FrMN (0,98 µg/mL) contra <i>S. aureus</i> multi-resistente pelo ensaio <i>Time Kill</i> . (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).....	67
Figura 18 - Atividade antibacteriana dos extratos de <i>P. torta</i> (500 µg/mL), <i>P. ramiflora</i> (250 µg/mL), maitenina (31,3 µg/mL) e FrMN (62,5 µg/mL) contra <i>B. subtilis</i> pelo ensaio <i>Time Kill</i> . (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).....	67
Figura 19 - Atividade antibacteriana dos extratos de <i>P. torta</i> (500 µg/mL) e <i>P. ramiflora</i> (500 µg/mL) contra <i>E. coli</i> pelo ensaio <i>Time Kill</i> . (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).....	68
Figura 20 - Atividade antibacteriana dos extratos de <i>P. ramiflora</i> (62,5 µg/mL) contra <i>P. aeruginosa</i> pelo ensaio <i>Time Kill</i> . (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).....	68
Figura 21 - Atividade antibacteriana dos extratos de <i>P. ramiflora</i> (250 µg/mL) contra <i>S. setubal</i> pelo ensaio <i>Time Kill</i> . (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Amcilina Controle positivo - 1250 µg/mL).....	69
Figura 22 - Atividade antibacteriana dos extratos de <i>P. ramiflora</i> (500 µg/mL) e maitenina (125 µg/mL) contra <i>C. albicans</i> pelo ensaio <i>Time Kill</i> . (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Anfotericina B Controle positivo - 32 µg/mL).....	69
Figura 23 - Atividade antibacteriana da FrMN (125 µg/mL) contra <i>H. pylori</i> pelo ensaio <i>Time Kill</i> . (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Tríplice Controle positivo - AMX, CLR e OMP: 250, 125 e 5 µg/mL, respectivamente).....	70

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1 – Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações.....	56
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM em µg/mL) das amostras vegetais avaliadas pela técnica de diluição em microplaca.....	60
Tabela 3 - Efeito sinérgico da FrMN com AMX, CLR e OMP (tríplice) contra <i>H. pylori</i>	64

1. *Introdução*

*“Nós nascemos para a dor? Não? O destino é difícil,
e podemos escolher nossos caminhos, no entanto o
destino diz que podemos não escolhê-los. Portanto, se o
destino é real, nós temos alguma opção?”*

1.1. Produtos naturais

Desde antiguidade os produtos naturais parecem exercer uma influência benéfica sobre a saúde humana e assim são utilizados como adjuvantes terapêuticos (Ching *et al.*, 2006; Hendrich, 2006). Por isso, o uso de plantas com propriedades farmacêuticas tem recebido crescente interesse na terapêutica homeopática e alopática (Mossi *et al.*, 2009). Nesse sentido, a pesquisa de produtos naturais é cada vez mais incentivada. O interesse por produtos de plantas pode ser devido a várias razões como a ineficiência da medicina convencional em alguns casos (por exemplo, efeitos colaterais e terapia ineficaz), uso abusivo ou incorreto de medicamentos sintéticos, falta de acesso de uma grande porcentagem da população mundial ao tratamento farmacológico convencional. Adicionalmente, a medicina popular e a consciência ecológica sugerem que produtos “naturais” são inofensivos, ou seja, não produzem efeitos tóxicos. No entanto, a utilização destas substâncias nem sempre é autorizada pelas autoridades legais que lidam com procedimentos de eficácia e segurança, além de apontar a falta de qualidade na produção, comércio e prescrição de produtos fitoterápicos (Rates, 2001).

A busca por opções terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo fértil em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas (Hostettmann *et al.*, 2003). No entanto, apesar do grande número de trabalhos publicados, é pouco explorada a utilização potencial de plantas superiores como uma fonte de novos fármacos. (Rates, 2001; Mahesh e Satish, 2008). De acordo com dados na literatura, são estimadas 250.000-500.000 espécies de vegetais superiores em todo o mundo e, deste total, apenas uma pequena porcentagem é estudada fitoquimicamente e uma porcentagem menor ainda é devidamente estudada com relação às propriedades farmacológicas; na maioria dos casos, apenas estudos preliminares são

realizados, não tendo sua potencialidade terapêutica comprovada (Chadwick e Marsh, 1990; Newman & Cragg, 2012).

A exploração dos recursos vegetais pode levar à identificação de metabólitos secundários valiosos que podem servir como fármacos ou conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). O metabolismo das plantas é composto por um conjunto de reações químicas que estão ocorrendo continuamente nas células (Morais e Braz-Filho, 2007). A síntese de compostos como aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e nucleotídeos, essenciais para a sobrevivência dos vegetais, faz parte do metabolismo primário. Já os compostos sintetizados por outras vias, que aparentam não ter relação direta com a sobrevivência do vegetal, fazem parte do metabolismo secundário (Simões *et al.*, 2003; Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Sabe-se que muitas das substâncias produzidas pelo metabolismo secundário possuem propriedades biológicas importantes e estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio. As substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos possuem diversas funções biológicas, tais como defesa contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra raios UV e atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Fumagali *et al.*, 2008). Para o homem, estes compostos têm se destacado por apresentarem diversas propriedades terapêuticas como: antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, inseticida dentre outros, que se aplicam à indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e química (Acamovic e Booker, 2005).

1.2. O gênero *Pouteria* (Sapotaceae)

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e suporta uma grande variedade de espécies. As plantas de cerrado são conhecidas como uma fonte de compostos de interesse biotecnológico elevado com aplicações em indústrias médicas e de alimentos.

Plantas de famílias encontradas no Cerrado, como Apocynaceae, Sapotaceae, Fabaceae, entre outras, apresentam interessantes atividades biológicas, dentre estas, atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antifúngica (Roy *et al.*, 2010; Darwish e Aburjai, 2011; Souza *et al.*, 2012).

A família Sapotaceae possui 107 gêneros e mais de 1000 espécies com representantes desde o sul dos Estados Unidos até Paraguai, Uruguai e Chile. Existem muitos gêneros de Sapotaceae que produzem frutos comestíveis, tais como *Chrysophyllum*, *Manilkara*, *Mimusops* e *Pouteria* (Ma *et al.*, 2004), além de produzirem madeira, látex, matéria-prima da especiaria canistel e substâncias utilizadas para a produção de fármacos (Santana *et al.*, 2008).

O gênero *Pouteria*, com cerca de 430 espécies no Brasil (Almeida *et al.*, 1998), possui fruto ovoide ou globoso, com epicarpo de textura firme, de cor amarela quando maduro, com poucas sementes que são envolvidas por polpa gelatinosa, possivelmente de origem placentar (Barroso *et al.*, 1999; Santana *et al.*, 2008).

Das espécies de *Pouteria*, várias têm sido utilizadas na medicina popular para tratar febre, inflamação, erupções na pele, úlceras, diabetes, diarreia, náuseas, vômitos, dores nas costas, e para estimular a lactação. No entanto, para fins científicos a rica flora do Cerrado tem sido pouco estudada para avaliar a eficácia e efeitos terapêuticos de extratos ou substâncias isoladas (Souza *et al.*, 2012).

Pouteria torta (Mart.) Radlk. (Fig. 1A) tem porte arbóreo, podendo medir de 8 a 14 m de altura (Lorenzi, 1992) e tem distribuição desde México, América Central e América do Sul até o Paraguai (Pennington, 1990). No Brasil, pode ser encontrada em florestas semidecíduas e sua transição para o Cerrado e em Florestas Pluviais, desde a região amazônica até Goiás, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Bahia e Paraná. É conhecida popularmente como abiu-piloso, curriola, grão-de-galo, pêssego-do-mato,

guapeba, guapeva e acá (Lorenzi, 1992). Sua madeira pode ser utilizada para tabuado e acabamento interno, possuindo também algumas aplicações na construção civil (Almeida *et al.*, 1998). Por apresentar características ornamentais úteis para arborização (Lorenzi, 1992; Almeida *et al.*, 1998) e produzir muitos frutos anualmente, que servem de alimento para as espécies da fauna, é considerada importante em plantios para recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente (Lorenzi, 1992).

De um estudo sobre a composição química de extratos hexânicos e diclorometânicos a partir das flores e frutos de *P. torta*, foram obtidos misturas de ácidos graxos, compostos poliisoprenoides, misturas de hidrocarbonetos e triterpenos (Perfeito *et al.*, 2005).

Alves *et al.* (2000) relataram que o extrato metanólico das folhas de *P. torta* apresenta atividade antimicrobiana contra *Cladosporium sphaerospermum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. (Fig. 1B) é uma árvore que mede cerca de 10 m de altura e que está distribuída no centro e no sul do Brasil, estendendo-se ao norte para a Amazônia e à oeste para a Bolívia, com um pequeno registro no Paraguai (Pennington, 1990). Ocorre nas fisionomias de cerradão, cerrado sentido restrito, cerrado ralo, borda de vereda, mata mesofítica (Almeida *et al.*, 1998) e floresta estacional semidecidual (Durigan *et al.*, 2004). É popularmente conhecida como abúdo-cerrado, bacupari liso, curriola, fruta-de-veado, grão-de-galo, massaranduba, gunjara, mandapuca e pitomba-de-leite (Almeida *et al.*, 1998). Tem diversas aplicações econômicas na construção civil e também é indicada para plantio em áreas de preservação permanente por apresentar crescimento moderado e adaptação a lugares abertos (Lorenzi, 1992). À época de frutificação, entre novembro e janeiro, é muito

visitada pela fauna, devido ao cheiro forte e sabor agradável do fruto, sendo a zoocoria sua principal forma de dispersão (Dalponte e Lima, 1999; Santana *et al.*, 2008).

Embora já existam estudos sobre as espécies *P. torta* e *P. ramiflora* (Perfeito *et al.*, 2005; Santana *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2012), as suas atividades biológicas não têm sido bem investigadas, e poucos dados podem ser encontrados sobre a composição química, o que torna relevante a avaliação da atividade antimicrobiana realizada neste trabalho para enriquecer as informações sobre suas propriedades terapêuticas.



Figura 1 – (A) *Pouteria torta* e (B) *Pouteria ramiflora*

Fonte: <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Sapotaceae.htm>

1.3. Triterpenos quinonametídeos

Dentre os inúmeros compostos bioativos encontrados na família Celastraceae e Hippocrateaceae estão os triterpenos quinonametídeos que ocupam o lugar de maior destaque, nestas famílias, devido a sua vasta gama de atividades biológicas, principalmente citotóxica frente a várias linhagens tumorais, incluindo: mama, próstata, leucemia, e outras. No entanto, esses metabólitos são acumulados apenas nas cascas das raízes da planta, ocorrendo assim, como componentes minoritários (Paz *et al.*, 2011). Estes compostos são metabólitos secundários restritos às famílias, Celastraceae e Hippocrateaceae (Jeller *et al.*, 2004).

Segundo Carvalho-Okano (1992), o gênero *Maytenus* (Celastraceae) é um dos maiores da família, está inserido na subfamília Celastroideae e é constituído por cerca de 225 espécies distribuídas nos trópicos. Na flora brasileira estão representados 77 espécies ocorrendo desde a Amazônia até o sul do país, ocupando as mais diferentes formações vegetais.

Das espécies do gênero, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek é a mais conhecida e explorada economicamente, devido à sua aplicabilidade na medicina popular, cujo uso é amplamente referenciado em bibliografia sobre plantas medicinais (Carvalho-Okano, 1992; Montanari e Bevilacqua, 2002; Velloso *et al.*, 2006; Crestani *et al.*, 2009).

M. ilicifolia é nativa da região sul do Brasil, Uruguai, Paraguai e norte da Argentina (Montanari e Bevilacqua, 2002). Tem preferência por solos argilosos, porém bem drenados e com alto teor de matéria orgânica, além de apresentar predileção por climas temperado e subtropical (Santos Oliveira *et al.*, 2009). *M. ilicifolia* é popularmente conhecida como espinheira-santa, espinheira-diva, salva-vidas, sombra-de-touro, cancerosa e coromilho-do-campo, e é comercializada sob autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (RDC 14/2010) como fitoterápico para o tratamento de distúrbios gástricos (Crestani *et al.*, 2009).

Devido a crescente demanda por seu alto valor medicinal, a intensa exploração das populações naturais tem levado ao extrativismo predatório, resultando em uma perda da variabilidade genética. Por este motivo, a espinheira-santa é considerada como prioritária para coleta e conservação (Vieira, 1999).

Vários compostos isolados de *M. ilicifolia* foram testados por sua atividade antitumoral, no entanto, no Brasil, a infusão das folhas dessa espécie é que tem sido tradicionalmente utilizada na medicina popular por seus efeitos analgésico, anti-inflamatório, anti-ácido e anti-ulcerogênico (Velloso *et al.*, 2006).

Além das propriedades farmacológicas citadas, estudos pré-clínicos incluem atividade antiproliferativa (Costa *et al.*, 2008), antioxidante (Velloso *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2010), hipotensora (Crestani *et al.*, 2009), efeitos citotóxicos e antimutagênicos (Horn e Vargas, 2003), entre outros.

Estudos sugerem que as propriedades terapêuticas de *M. ilicifolia* podem ser atribuídas à produção de maitenina e pristimerina, tanto pelas raízes (Itokawa *et al.*, 1991), como em ramos de folhas (Jorge *et al.*, 2004); assim como fenóis, taninos gálicos (Camparoto *et al.*, 2002), flavonoides e outros compostos (Silva *et al.*, 1991; Leite *et al.*, 2001). No entanto, mais estudos devem ser realizados na tentativa de elucidar a importância farmacológica de *M. ilicifolia* e definir quais metabólitos secundários estão envolvidos na ação terapêutica.

A maitenina (Fig. 2A), um triterpeno quinonametídico, apresenta forte atividade antimicrobiana principalmente contra várias bactérias Gram-positivas (Lima *et al.*, 1971) e potencial atividade anticancerígena (Bavovada *et al.*, 1990). A ligação da maitenina ao DNA sugere uma interação celular que pode justificar a atividade antitumoral (Campanelli *et al.*, 1980; Corsino *et al.*, 1998).

A família Hippocrateaceae A.L. Juss. que inclui plantas conhecidas vulgarmente como “bacupari-cipó”, apresenta cerca de 25 gêneros e aproximadamente 300 espécies, também distribuídos nos trópicos e subtropicais de todo o mundo. No Brasil é representada por 12 gêneros com cerca de 90 espécies, e o estudo palinológico realizado por Gonçalves Esteves em 1994 (*apud* Gonçalves Esteves *et al.*, 2000) a manteve como um táxon independente com relação às espécies brasileiras. Estão incluídos nesta família, os gêneros *Salacia* e *Hippocratea* (Milward de Azevedo *et al.*, 2006).

Esses gêneros encontram-se distribuídos em regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios e são pouco representados nas zonas temperadas, sendo encontrados no

Norte, Nordeste e Sudeste do Brasil, principalmente. Dos gêneros brasileiros, *Salacia* é o maior, com mais de 20 espécies (Almeida, 1998).

Do ponto de vista químico, observam-se metabólitos secundários de ocorrência restrita às famílias Celastraceae e Hippocrateaceae, destacando-se os alcalóides piridínicos sesquiterpênicos (Rodrigues-Fo *et al.*; 2001) e os triterpenos quinonametídeos, com potente atividade antioxidante (Jeller *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2005).

Um estudo realizado por Velloso *et al.*, (2006) demonstrou que o extrato etanólico de *S. campestris* é ativo quando avaliado em diversas matrizes antioxidantes e anti-radicais livres, além de inibir a mieloperoxidase, uma enzima envolvida em muitos estudos fisiológicos e patológicos. É comprovada a contribuição destes antioxidantes para o dano tecidual durante inflamação (Roman, 2006).

Recentemente, tem sido observado um aumento acentuado de infecções causadas por fungos, as quais contribuem para uma elevada taxa de mortalidade em pacientes, principalmente, imunocomprometidos, como transplantados, portadores do vírus HIV, dentre outros, (Canton *et al.*; 2001, Rubin *et al.*; 1993, Couto *et al.*; 2001; Avrella & Goulart, 2008; Araújo *et al.*, 2011). Dessa forma, verifica-se um grande aumento na busca por antifúngicos que possuam alta eficiência e menos efeitos colaterais, já que os que estão no mercado apresentam-se resistentes frente a alguns patógenos humanos resistentes (Zambolim *et al.*, 2007).

Outra substância de grande interesse é o triterpeno quinonametídico denominado netzaucoieno (Fig. 2B). Esta substância é isolada do gênero *Salacia* e também tem mostrado atividade de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e leveduras, mas não contra bactérias Gram-negativas (Moujir *et al.*, 1991).

A avaliação da atividade antimicrobiana por diferentes metodologias desses triterpenos quinonametídicos tornou-se ainda mais relevante, em vista dos resultados obtidos em estudos anteriores demonstrando que a maitenina e o netzaucoieno são substâncias promissoras quanto à atividade antimicrobiana e considerando que um extrato é uma mistura complexa de vários compostos orgânicos desconhecidos. (NOGUEIRA, *et al.*, 2009).

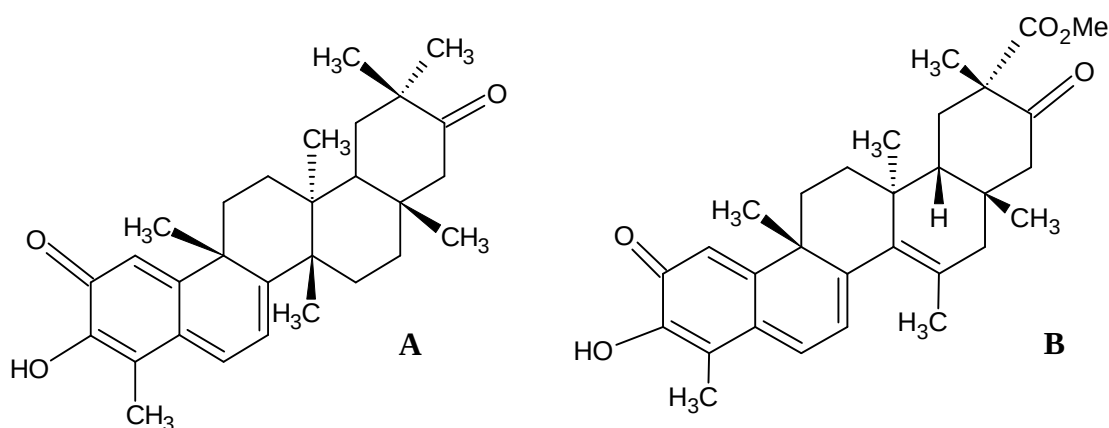


Figura 2 – Estruturas químicas da (A) maitenina e (B) netzaucoieno

1.4. Antimicrobianos e a resistência microbiana

A microbiota normal é formada por micro-organismos que estão presentes no hospedeiro e que em condições normais do organismo não são patogênicos. A relação que o homem tem com os micro-organismos da microbiota normal da pele, membrana de revestimento e mucosas, permite que eles vivam juntos sem qualquer efeito negativo sobre cada um dos ciclos de vida (Mims *et al.*, 2002; Bonato *et al.*, 2007).

As infecções bacterianas podem ser diagnosticadas a partir da demonstração direta da bactéria ou de seus antígenos e de outras substâncias bacterianas nas secreções e nos fluidos do organismo, pela identificação e isolamento da bactéria, pela dosagem de anticorpos séricos e pela pesquisa de hipersensibilidade tardia. Os procedimentos

para demonstração das bactérias, de seus antígenos e de outras substâncias provenientes das mesmas diretamente no material clínico, são conhecidos como métodos rápidos de diagnóstico e apresentam grande interesse clínico (Trabulsi, 2011).

Os termos antimicrobiano, antibiótico e anti-infeccioso englobam uma grande variedade de agentes farmacêuticos que incluem drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias. Destes, os agentes antibacterianos são os mais comumente utilizados e, portanto, é o foco de trabalhos científicos (Leekha *et al.*, 2011).

O termo antibiótico definido em 1942 por Selman A. Waksman, originalmente referia-se a qualquer produto microbiano antagônico ao crescimento do micro-organismo (Hughes e Fenical, 2010). Atualmente, no entanto, uma distinção comum utilizada entre os agentes antibacterianos é a de agentes bactericidas e bacteriostáticos. Substâncias bactericidas causam a morte e a desagregação da célula bacteriana, incluem drogas que atuam principalmente sobre a parede celular (por exemplo, β -lactâmicas), membrana celular (por exemplo, a daptomicina), ou DNA bacteriano (por exemplo, fluoroquinolonas). Os agentes bacteriostáticos inibem a replicação bacteriana sem matar o micro-organismo. A maioria dos medicamentos bacteriostáticos, incluindo sulfonamidas, tetraciclina e macrolídeos, age por inibição da síntese proteica. A distinção não é absoluta, e alguns agentes que são bactericidas contra determinados micro-organismos podem ser bacteriostáticos contra outros e vice-versa. Na maioria dos casos, esta distinção não é significativa *in vivo*, no entanto, agentes bactericidas são preferidos no caso de infecções graves, tais como endocardite e meningite visando atingir a cura rápida (Leekha *et al.*, 2011).

Os agentes antimicrobianos são divididos em várias classes, como os β -lactâmicos, inibidores de β -lactamases, aminoglicosídeos, tetraciclina, rifamicina, macrolídeos, lincosamidas, glicopeptídeos, estreptograminas, sulfonamidas,

oxazolidinonas, quinolonas, gramicidinas e outros. Cada classe tem suas especificidades, incluindo a replicação de DNA, transcrição, metabolismo do ácido fólico, síntese de proteínas e síntese/ integridade da parede celular. O meio pelo qual as bactérias adquirem resistência aos agentes antibacterianos é altamente variável e complexo. Tem sido proposto que os agentes antimicrobianos que atingem enzimas são os mais susceptíveis de induzir a resistência, enquanto que os que atingem irreversivelmente várias estruturas geram resistência mais lenta. Os mecanismos de resistência genética possivelmente incluem: inativação da droga, modificação do sítio ativo alvo, modificação da permeabilidade da parede celular ou regulação da enzima alvo (Marques *et al.*, 2007). No entanto, é necessário ter uma compreensão precisa da relação entre o uso de antimicrobiano e resistência (MacDougall e Polk, 2005).

A resistência bacteriana emerge como um problema mundial de saúde pública atraindo a atenção de órgãos governamentais nacionais e internacionais como Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Organização Mundial de Saúde (OMS), Centros de Prevenção e Controle de Doenças (CDC), associações de controladores de infecções hospitalares, além da indústria farmacêutica internacional (Becker *et al.*, 2006; Hambræus, 2006), uma vez que o elevado potencial de recombinação genética das bactérias e o uso indiscriminado de antibacterianos e antifúngicos tem provocado o aumento de cepas multirresistentes e, conseqüentemente, vem tornando ineficazes muitos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado (Penna *et al.*, 2001).

Fármacos que eram restritos às bactérias altamente resistentes como vancomicina, daptomicina, estreptograminas e linezolida estão com a eficácia limitada. Além disso, há uma menor motivação por parte de empresas farmacêuticas que gastam bilhões de dólares em pesquisa e desenvolvimento de um novo antibiótico, quando a resistência bacteriana é provável de ocorrer rapidamente (Marques *et al.*, 2007). No

entanto, esse crescente problema da resistência aos antibióticos exige além da busca por novos agentes antimicrobianos, a otimização destes agentes para reduzir a prevalência da resistência crescente (Tam e Nikolaou, 2011).

Dentre as espécies bacterianas de interesse para a saúde em humanos destaca-se o *Helicobacter pylori*, é um bacilo Gram-negativo microaerófilo, helicoidal com flagelos, tem sido considerado o principal agente etiológico da gastrite crônica, úlcera péptica e neoplasias gástricas (Manyi-Loh *et al.*, 2012). A terapia tripla para a erradicação deste agente patogênico implica em combinar dois antibióticos, por exemplo, claritromicina (CLR), metronidazol ou amoxicilina (AMX) com um fármaco inibidor da bomba de prótons. No entanto, este tratamento pode falhar, pois as bactérias podem oscilar entre um estado de replicação (micro-organismo permanece susceptível ao antibiótico) e um estado não replicativo (micro-organismo torna-se resistente fenotipicamente) de acordo com os pHs nos microambientes. Assim, elas podem entrar para o ciclo não replicativo, mas em estado viável quando o pH for entre 4,0 e 6,0. Estes micro-organismos serão difíceis de erradicar por apresentar o estado fenotipicamente resistente (Fig. 3) (Wu *et al.*, 2012). Além da resistência aos antibióticos, a falha no tratamento pode ser devido aos efeitos colaterais, como náusea, dor epigástrica, desconforto abdominal, diarreia, entre outros (Mazzolin *et al.*, 2010), e custo elevado que incentivam a busca por formas alternativas para o tratamento de infecções estomacais (Cogo *et al.*, 2010). Em consequência, a gestão das infecções causadas por *H. pylori* ainda é um desafio, porque as taxas na falha de erradicação permanecem elevadas juntamente com as frequentes recidivas de úlceras gástricas. Portanto, é desejável a busca de um novo agente que seja eficaz e livre de efeitos colaterais (Mazzolin *et al.*, 2010; Manyi-Loh *et al.*, 2012).

Diversos estudos em todo mundo, com extratos e/ou compostos isolados de plantas utilizadas na medicina popular, vêm sendo realizados e demonstrando ser fontes de compostos anti- *H. pylori* (Castillo-Juarez *et al.*, 2009; Cogo *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2010; Rozza *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012).

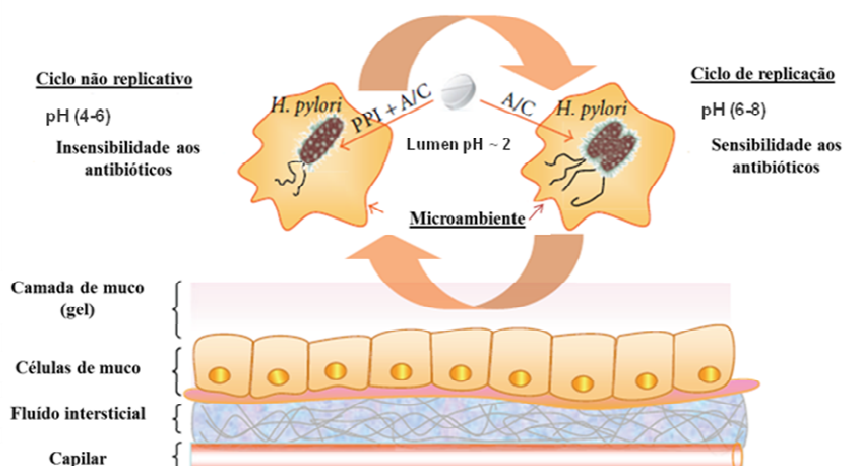


Figura 3 – Estados de replicação do *H. pylori* (sensibilidade aos antibióticos) e um estado não replicativo (insensibilidade aos antibióticos) de acordo com o pH nos microambientes. PPI: inibidor da bomba de prótons, A: amoxicilina, C: claritromicina.

Fonte: WU *et al.*, Gastroenterol Res Pract., v. 2012, p. 1-8, 2012.

Além do grande interesse com relação à resistência bacteriana, o surgimento da resistência antifúngica em espécies de *Candida* tem gerado preocupação, especialmente a resistência para triazol. Novos agentes antifúngicos triazóis com amplo espectro foram introduzidos para infecções fúngicas, tais como voriconazol. No entanto, a resistência cruzada entre triazóis é uma grande preocupação em relação à sua aplicação clínica (Chen *et al.*, 2012).

Candida albicans (Fig. 4) é um fungo comensal da microbiota humana, que vive na cavidade oral, trato gastrointestinal e genitourinário, desempenhando um papel importante como um patógeno oportunista. As infecções mais comuns causadas por este patógeno são estomatite e nas genitais femininas (Weckwerth *et al.*, 2012). Em pacientes imunodeprimidos, a *C. albicans* pode alcançar a corrente sanguínea,

colonizando e formando lesões em órgãos internos, tornando parte destas infecções sistêmicas fatais (Ene *et al.*, 2012).



Figura 4 - (A) Colônia de coloração branca, superfície lisa, textura glabrosa úmida, característica das espécies de *Candida* e micromorfologia; (B) mostrando clamidoconídios de *Candida albicans*.

Fonte: <http://www.flickrriver.com/photos/estafilococa/4120195878/>

Infecções por *Candida* tornaram-se mais prevalente nas últimas décadas devido ao crescente número de pacientes imunodeprimidos e em estado crítico. O fluconazol tem sido o agente antifúngico mais utilizado para candidíase invasiva desde os anos 1990, e a preocupação com o surgimento de resistência ao fluconazol aumentou especialmente devido ao aumento do uso de fluconazol para o tratamento e principalmente profilaxia da candidíase. Além disso, a co-resistência à anfotericina B e ao fluconazol tem sido observada, indicando um problema sério para o tratamento destas infecções (Chen *et al.*, 2012).

Dessa maneira, a investigação da potencialidade antimicrobiana de produtos naturais é um item relevante na caracterização biológica de extratos vegetais, visto que as plantas produzem um vasto número de substâncias com potencial antimicrobiano na tentativa de adaptarem-se às agressões do meio ambiente (Williams, 2001; Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Vários trabalhos são desenvolvidos para investigar as propriedades

antimicrobianas de plantas, a fim de utilizá-las em fitoterápicos que melhoram a saúde e o bem-estar dos seres humanos e outros animais.

1.5. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos oriundos de triagem de fontes naturais, tais como fermentações microbianas e extratos de plantas levaram à descoberta de muitos fármacos clinicamente úteis que desempenham um papel importante no tratamento de doenças humanas. Testes *in vitro*, conhecidos como bioensaios, são utilizados em muitos laboratórios em todo o mundo para a avaliação de novos compostos na investigação etnofarmacológica, devido, em parte, às restrições éticas e financeiras do uso de animais ou de tecido animal, bem como pela facilidade no biomonitoramento de compostos ativos (Souza *et al.*, 2012).

Os métodos de ensaio de susceptibilidade geralmente realizados em laboratórios de microbiologia (por exemplo, diluição em caldo e difusão em ágar) avaliam a atividade inibitória de um agente antimicrobiano (CLSI, 2006). Na maioria das situações clínicas, isto é suficiente, já que o papel do antibiótico é evitar a propagação de bactérias a partir do foco da infecção, impedindo a replicação microbiana em novos sítios; a participação ativa de mecanismos de defesa do hospedeiro e finalmente atingir a erradicação bacteriana e a cura clínica.

O método mais comum utilizado para avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas é o método de difusão em ágar. Tem sido muito utilizado devido à facilidade de uso, baixo custo, reprodutibilidade, e flexibilidade no tipo e número de amostras que podem ser testadas. No entanto, é um método sensível a mudanças nas técnicas do operador, à capacidade de difusão das amostras e na interpretação do diâmetro da zona de inibição. Portanto, para relacionar os resultados

qualitativos com diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos, são necessários resultados quantitativos sob a forma de Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Saini *et al.*, 2011). A CIM é a menor concentração de um antimicrobiano que inibe o crescimento de um micro-organismo e é interpretada pelos laboratórios como sensível, intermediário e resistente, de acordo com o critério do CLSI (Leekha *et al.*, 2011).

Um dos ensaios mais utilizado para determinação da CIM é o método de microdiluição. Esse ensaio permite a avaliação de um grande número de amostras e requer pequenas quantidades e/ou volumes de extratos ou substâncias isoladas, o que é extremamente importante se a amostra é escassa, como é o caso, geralmente de produtos naturais. Outro aspecto vantajoso desta metodologia é a possibilidade de se utilizar mais de uma substância-teste, bem como diferentes micro-organismos em um mesmo ensaio, além de apresentar resultados reprodutíveis (Langfield *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2011; Lorenzon *et al.*, 2012).

No entanto, é cada vez maior a necessidade de métodos laboratoriais que podem avaliar a atividade bactericida das novas classes de agentes antimicrobianos que são introduzidos ou a combinação desses agentes devido ao crescente número de pacientes com infecções que não tem o sistema imune completamente normal e as classes de antibióticos considerados bactericidas que já não podem controlar todos os isolados clínicos, devido à possibilidade de resistência (CLSI, 2006).

A terapia de combinação de agentes antimicrobianos pode ser usada para aumentar o espectro de ação, prevenir a emergência de mutantes resistentes e promover o sinergismo entre antimicrobianos. A terapia combinada é frequentemente recomendada para o tratamento de infecções bacterianas em unidades de terapia intensiva, onde a monoterapia não é susceptível a todos os patógenos possivelmente envolvidos e o surgimento de resistência é uma ameaça (Drago *et al.*, 2007). No

entanto, a seleção de uma combinação adequada requer uma compreensão do potencial de interação entre os agentes antimicrobianos. Assim, foram desenvolvidos métodos que quantificam o efeito dessas combinações antimicrobianas sob o crescimento bacteriano *in vitro* (Jackson *et al.*, 2009).

Os ensaios antimicrobianos *Time Kill* e *Checkerboard* são exemplos de metodologias desenvolvidas para esta finalidade, no entanto não são rotineiramente aplicados por serem dispendiosos em tempo e materiais (Sueke *et al.*, 2010).

O método *Time Kill* é utilizado para avaliar os tempos em que as concentrações de um determinado agente antimicrobiano matam um isolado bacteriano. Esse ensaio tem sido classificado como dependente da concentração ou do tempo, e é usado para avaliar novos agentes antimicrobianos e combinações destes. Além disso, confirmam o efeito paradoxal, persistentes de tolerância e resistência fenotípica; e ajudam a explicar as falhas de tratamento em situações clínicas em que a atividade bactericida pode ser crucial para a evolução dos doentes (Eliopoulos e Eliopoulos, 1988; Eliopoulos e Moellering Jr, 1996; Mitchell *et al.*, 2012).

O ensaio *Checkerboard* é um teste de microdiluição que avalia combinações de agentes antimicrobianos contra diferentes micro-organismos. Os métodos de diluição em ágar ou de difusão em ágar utilizando discos também podem ser usados para essa finalidade. Esses testes avaliam a atividade de inibição ou bactericida de diferentes combinações com concentrações específicas em um tempo fixo. As interações são calculadas algebricamente e interpretadas como sinérgica, indiferente ou antagonista, comparando-as com as atividades dos agentes antimicrobianos testados individualmente. As interações também podem ser representadas geometricamente com isobologramas. Apesar destes testes não serem utilizados na rotina, devem ser considerados quando a previsibilidade de sinergismo é desconhecida, como com um

novo agente antimicrobiano, ou quando a previsibilidade não é viável devido ao desenvolvimento de fatores de resistência bacteriana ou falhas no tratamento (Berenbaum, 1978; Rahal, 1978; Eliopoulos e Eliopoulos, 1988; Eliopoulos e Moellering Jr, 1996, Pillai e Moellering, 2005; Mitchell *et al.*, 2012).

Assim, para promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais do uso de plantas medicinais e remédios caseiros, e ampliar o número de plantas que poderão ser utilizadas como fitoterápicos, neste trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*, dos triterpenos quinomametídeos (maitenina e netzaucoieno) e da fração enriquecida com maitenina e netzaucoieno de *Salacia campestris*.

2. *Objetivos*

“A tarefa aqui, não é tentar ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou, sobre aquilo que todo mundo vê”.

Arthur Schopenhauer

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*, dos triterpenos quinomametídeos (maitenina e netzaucoieno) e da fração enriquecida contendo maitenina e netzaucoieno (FrMN).

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*, da FrMN; de substâncias isoladas de *Maytenus ilicifolia* e *Salacia campestris*, respectivamente maitenina e netzaucoieno frente a *Staphylococcus aureus*, *S. aureus multi-resistente*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella setubal*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Helicobacter pylori*.

- Avaliar a atividade antifúngica de extratos etanólicos de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora*, da FrMN e das substâncias isoladas maitenina e netzaucoieno frente à *Candida albicans*.

- Avaliar, a partir da CIM das amostras vegetais com potencial atividade antimicrobiana, o tempo de morte dos micro-organismos.

- Avaliar a eficiência da combinação das amostras vegetais com potencial atividade anti-*H. pylori* com amoxicilina (AMX), claritromicina (CLR) e omeprazol (OMP) (terapia tripla).

3. Material e Métodos

*“Senhores, a única forma de alcançar o impossível, é
pensar que é possível.”*

Alice no País das Maravilhas

Lewis Carroll

3.1. Obtenção dos extratos de *P. torta* e *P. ramiflora*

As folhas de *P. torta* e *P. ramiflora* foram coletadas no município de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil, em maio de 2011. As plantas foram autenticadas pelo Prof. Dr. Luiz Fernando Rolim do Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Unesp, campus de Botucatu. As exsiccatas foram depositadas no Herbário BOTU, do mesmo instituto, sob o registro 27806.

Folhas de ambas as espécies foram secas e pulverizadas. Parte deste material (500 g) foi percolado com etanol (EtOH) 70% fornecendo aproximadamente 150,0 g de extrato etanólico 70% (30,0%, m/m).

A vazão do percolador ficou entre 1,0 e 2,0 mL/min/kg de droga vegetal com tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm. A percolação ocorreu da seguinte maneira: O material triturado (500 g) foi previamente intumescido com 2 L de EtOH 70% (v/v) durante 2 horas em béquer de 2 litros. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70%), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção 5:1 (cada 5 referente ao percolador 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador.

Os extratos de *P. torta* e *P. ramiflora*, utilizados no presente estudo, bem como as informações sobre o processo de extração foram fornecidas pela Prof^a Dr^a Lourdes Campaner dos Santos do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo.

3.2. Obtenção da maitenina

A maitenina foi isolada de cascas de raízes de *M. ilicifolia*, coletada na Fazenda Experimental da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto-SP e

identificada pela Prof^a Rita Maria de Carvalho do Instituto de Biociências da Universidade de Campinas – SP, onde uma exsicata da espécie foi depositada (HPM-BR 0059).

As cascas da raiz de *M. ilicifolia* foi seca a 40°C e triturada em moinho de facas. O material (671,0 g) foi submetido à extração por maceração com EtOH (1000 mL) por 20 min. A extração foi repetida 3 vezes com o mesmo material. O extrato etanólico foi filtrado, evaporado e submetido a uma partição líquido-líquido com hexano (3 x 100 mL), hexano (Hex): acetato de etila (AcOEt) (2:8) (3 x 100 mL) e diclorometano (DCM) (3 x 100 mL), resultando em frações Hex (4,74g), Hex: AcOEt (4,72 g), DCM (12,63 g) e hidroalcóolica (125,19 g). Dez gramas da fração DCM foram submetidos ao fracionamento por extração em fase sólida em coluna de 20 x 4.5 cm, contendo sílica C₁₈ adsorvente com carvão comprimido (2 cm). Água e metanol foram usados como solventes em ordem de crescimento de polaridade, resultando em um total de 36 frações de 200 mL cada.

Alíquotas de extrato DCM foram fracionadas por CCDP, com Hex:AcOEt (7:3) como fase móvel. Estas placas foram eluídas 3 vezes. As cinco frações coletadas foram extraídas por ultrassonificação em MeOH:AcOEt (95:5), filtrada a vácuo e então concentradas. Após a determinação das melhores condições isocráticas de cromatografia por HPLC-DAD das frações coletadas, duas (F2 e F3) foram selecionadas para purificação. A fração F3 (240,0 mg) foi submetida ao HPLC-UV (Condições: Phenomenex® coluna C₁₈ de 10 µm (250 x 21,2 mm), eluente: MeOH:H₂O (8:2), a vazão de 12 mL min⁻¹, tempo de análise: 30 min e λ = 254 nm) e cinco frações foram coletadas. A subfração F3.5.3 foi identificada como maitenina (Fig. 5) (Santos *et al.*, 2010).

A maitenina, utilizada no presente estudo, bem como as informações sobre o seu isolamento foram fornecidas pela Prof^a Dr^a Maysa Furlan do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo.

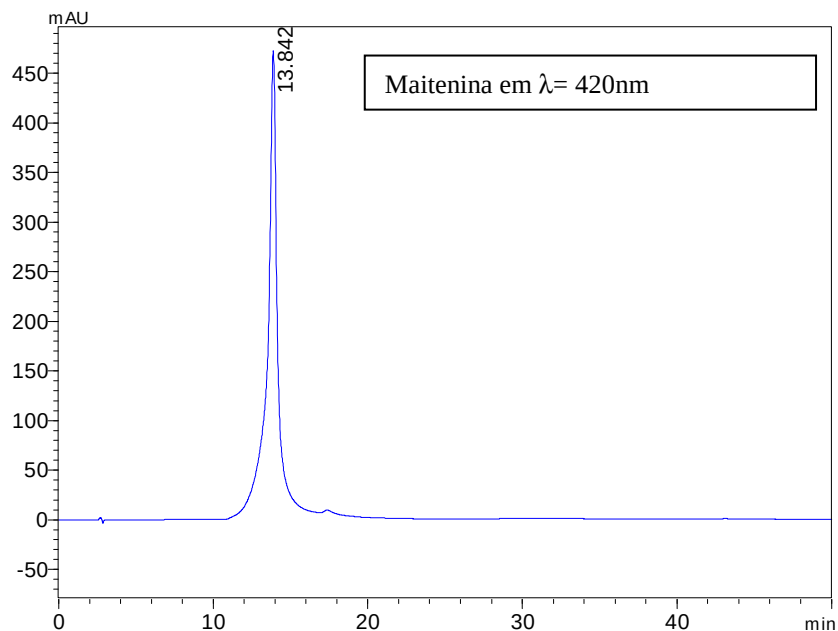


Figura 5 –HPLC da substância isolada maitenina.

Fonte: Imagem cedida pelo laboratório da Prof. Dra. Maysa Furlan do Instituto de Química, Unesp- Araraquara

3.3. Obtenção da fração enriquecida contendo maitenina e netzaucoieno (FrMN) e isolamento do netzaucoieno

O estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Salacia campestris* foi realizado tendo como objetivo o isolamento de outros triterpenos quinonametídeos.

As cascas das raízes de *Salacia campestris* foram secas em estufa a 30°C e trituradas em liquidificador. Foram obtidos 360,0 g de material vegetal seco e moído. O material obtido foi submetido à extração por maceração com CHCl_3 , sendo repetido por três vezes. Posteriormente, o extrato clorofórmico foi filtrado e evaporado, obtendo-se 25,67 g. Esse extrato foi submetido a fracionamento por CC a vácuo. Foi utilizada coluna de 57 x 6 cm de diâmetro, empregando como adsorvente sílica gel e utilizando

um gradiente de eluição com Hex e AcOEt, inicialmente na proporção de 75:25 (v/v) resultando num total de 23 frações (F1-F24).

Todas as frações coletadas foram secas em evaporador rotativo e após tratamento estas foram analisadas por HPLC-DAD. A análise no UV evidenciou bandas características dos triterpenos quinonametídeos corroboradas pelo máximo de absorção em 420 nm (Fig. 6), correspondente às frações F4-F8.

A análise por HPLC-DAD evidenciou que a FrMNs encontrava-se presente nas frações F4-F8. A identificação dos triterpenos quinonametídeos maitenina e netzaucoieno foram feitas pela comparação do tempo de análise de padrões autênticos com o tempo de análise das frações F4-F8, além das bandas de absorção no UV.

Das frações analisadas por HPLC-DAD, a fração F8 foi selecionada para ser purificada por HPLC-UV preparativa com o intuito de se isolar o netzaucoieno. Sendo assim, fração F8 (98,0 mg) foi submetida a HPLC-UV preparativa (condições: coluna Phenomenex[®] C₁₈ 10μm (250 x 21,2 mm); eluente MeOH:H₂O (8:2); fluxo de 9 mL min⁻¹; tempo de análise de 30 min e λ= 254nm) (Fig. 7). Foram coletadas 6 frações, as quais foram analisadas por HPLC-DAD, sendo que a fração 6 levou ao isolamento do netzaucoieno (Fig. 8).

O netzaucoieno, utilizado no presente estudo, bem como as informações sobre o seu isolamento foram fornecidas pela Prof^a Dr^a Maysa Furlan do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo.

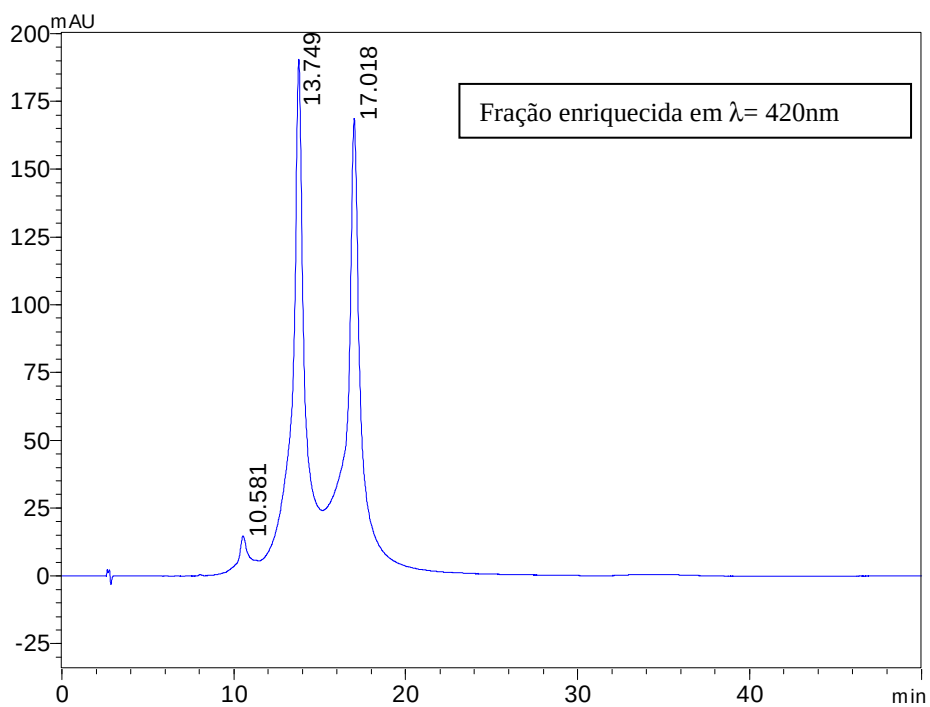


Figura 6 – HPLC (420 nm) da fração enriquecida contendo maitenina e netzaucoieno

Fonte: Imagem cedida pelo laboratório da Prof. Dra. Maysa Furlan do Instituto de Química, Unesp- Araraquara

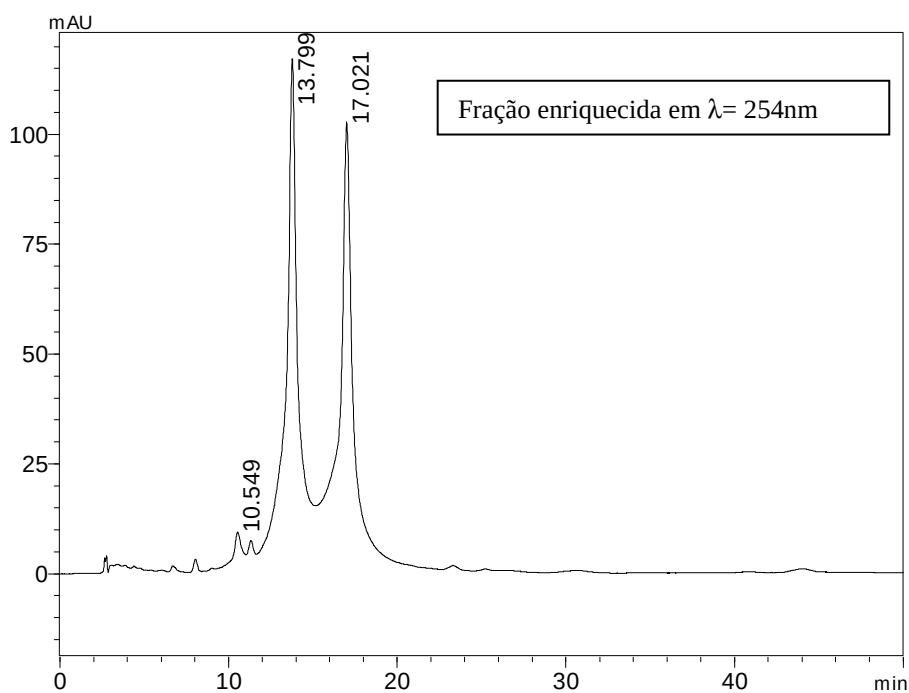


Figura 7 – HPLC (254 nm) da fração enriquecida contendo maitenina e netzaucoieno

Fonte: Imagem cedida pelo laboratório da Prof. Dra. Maysa Furlan do Instituto de Química, Unesp- Araraquara

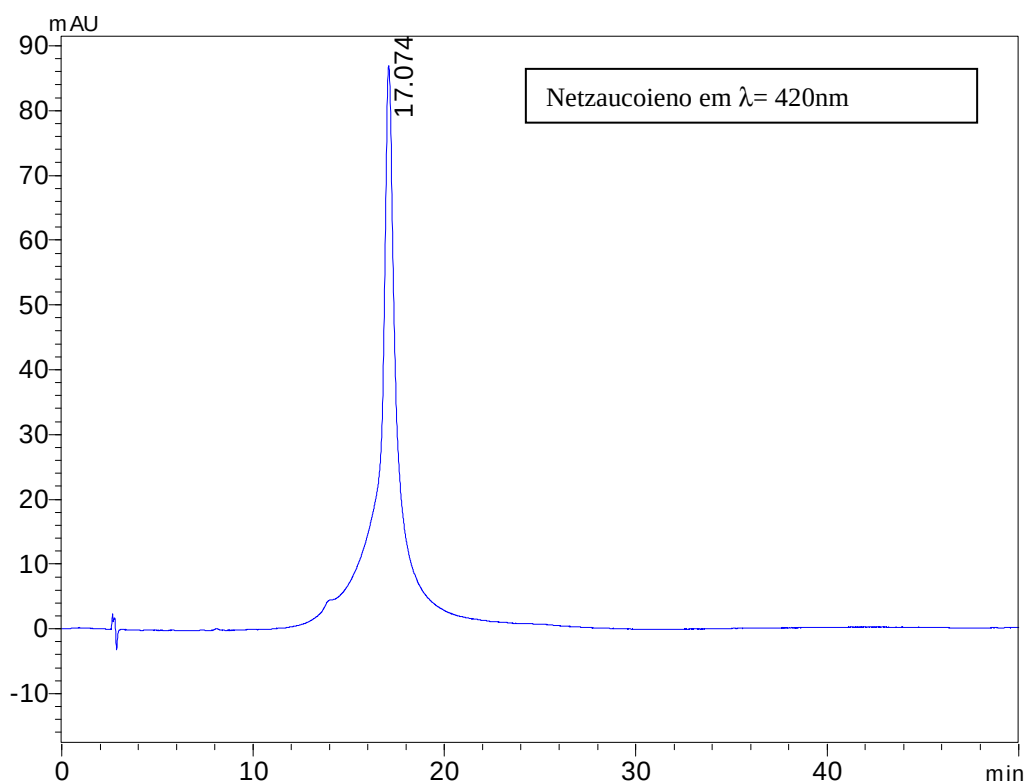


Figura 8 – HPLC da substância isolada netzaucioeno

Fonte: Imagem cedida pelo laboratório da Prof. Dra. Maysa Furlan do Instituto de Química, Unesp- Araraquara

3.4. Ensaios de atividade antimicrobiana

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada segundo a norma do CLSI documento M7- A7 (CLSI, 2006) para bactérias aeróbicas; CLSI documento M45-A2, suplemento M100-516 para bactérias fastidiosas e *H. pylori* (CLSI, 2006) e CLSI documento M27-A3 para levedura (CLSI, 2008), com modificações.

3.4.1. Preparo dos extratos, FrMN e substâncias isoladas

Os extratos de *P. torta* e *P. ramiflora* foram solubilizados em EtOH:H₂O (30:70, v/v), enquanto que a FrMN e as substâncias isoladas maitenina e netzaucioeno foram solubilizados em MeOH:Tween 80:H₂O (20:10:70, v/v/v) e preparados para o uso em uma concentração de 2000 µg/mL em água Milli-Q.

3.4.2. Meios de cultura e soluções

A composição e o preparo dos meios de cultura e soluções estão descritos no anexo I desse trabalho.

3.4.3. Micro-organismos

3.4.3.1. Cepas Bacterianas

Para os ensaios microbiológicos foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* multi-resistente e *B. subtilis* ATCC 19659, e as bactérias Gram-negativas *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella setubal* ATCC 19196 e *H. pylori* ATCC 43504. A cepa de *S. aureus* multi-resistente é um isolado clínico (cedida pelo Prof. Dr. André Gonzaga da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, câmpus Araraquara-SP). A cepa apresentou resistência contra amoxicilina (β -lactâmico), clindamicina (lincosamida), eritromicina (macrolídeo), imipenem (β -lactâmico - carbapenemas), oxacilina (β -lactâmico), penicilina (β -lactâmico) e piperacilina + tozabactam.

3.4.3.2. Cepa Fúngica

Para a determinação da atividade anti-*Candida* foi utilizada a levedura *C. albicans* ATCC 18804.

3.4.4. Estocagem dos Micro-organismos

3.4.4.1. Cepas Bacterianas

As amostras bacterianas foram mantidas em caldo Müller-Hinton (CMH - Difco) acrescido de 20% de glicerol a -20°C. Para o uso, foram repicadas em 2 mL de CMH e

incubadas por 24 horas à 37°C, para padronização do inóculo, exceto o *H. pylori*. A cepa de *H. pylori* foi semeada em CMH com 50% de soro fetal bovino e incubado por 72 horas à 37°C em condições microaerofilia (10% CO₂).

3.4.4.1. Cepa Fúngica

A amostra fúngica de *C. albicans* foi mantida em caldo Sabouraud dextrose (Difco) acrescido de 20% de glicerol a -20°C. Para o uso, foi repicada em 2 mL caldo Sabouraud dextrose e incubada por 48 horas à 37°C.

3.4.5. Padronização dos Micro-organismos

3.4.5.1. Cepas Bacterianas

As culturas bacterianas foram transferidas à solução salina tamponada (PBS) e ajustada a turbidez com a escala 0,5 de McFarland, seguida de leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorbância entre 0,08 a 0,10 ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), exceto para o *H. pylori*, cuja turbidez foi ajustada com a escala 2 de McFarland. Posteriormente a suspensão foi diluída na proporção 1:10 para obter-se a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, que foram utilizados nos ensaios (CLSI, 2006).

3.4.5.2. Cepa Fúngica

A cultura de 48 horas da *C. albicans*, cultivada em caldo Sabouraud dextrose (Difco) foi transferida à solução de PBS e ajustada a turbidez com a escala 0,5 de McFarland, seguida de leitura espectrofotométrica a 530 nm até obtenção de absorbância entre 0,08 a 0,10 ($5,0 \times 10^6$ UFC/mL). Posteriormente a suspensão foi diluída até obter-se a concentração de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, que foi, então, utilizado nos ensaios.

3.4.6. Controles positivos (bactérias e levedura)

Como controle positivo foi utilizada solução de ampicilina (AMP) à concentração final de 1250 µg/mL para todas as bactérias, exceto nos ensaios com *H. pylori* que foi utilizada amoxicilina (AMX) à concentração final de 1000 µg/mL.

Como controle positivo nos ensaios com *C. albicans* foi utilizado anfotericina B e fluconazol à concentração inicial de 32 e 256 µg/ mL, respectivamente.

3.4.7. Ensaio de microdiluição para bactérias

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH e em seguida acrescidos de 100 µL das soluções das substâncias-teste no primeiro poço para realização da diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Subsequentemente, foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos em cada poço, exceto nos poços que correspondem ao branco - apenas CMH e nos poços de controle das substâncias.

Além das substâncias-teste, foram realizados controle positivo (AMX para *H. pylori* e AMP para as demais bactérias), controle de esterilidade do meio, controle de crescimento bacteriano, controle de cor e esterilidade da amostra e controle negativo/ solvente.

As microplacas foram incubadas por 24 horas à 37°C e após esse período cada microplaca foi avaliada sob 3 parâmetros diferentes: a) leitura visual do crescimento bacteriano; b) leitura espectrofotométrica em 590 nm; c) adição de 50µL de uma solução de resazurina (5 µg/mL - Sigma), utilizada como indicador de crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que em cada microplaca foram testadas duas substâncias-teste em triplicata.

A Figura 9 esquematiza a realização do teste em microplacas.

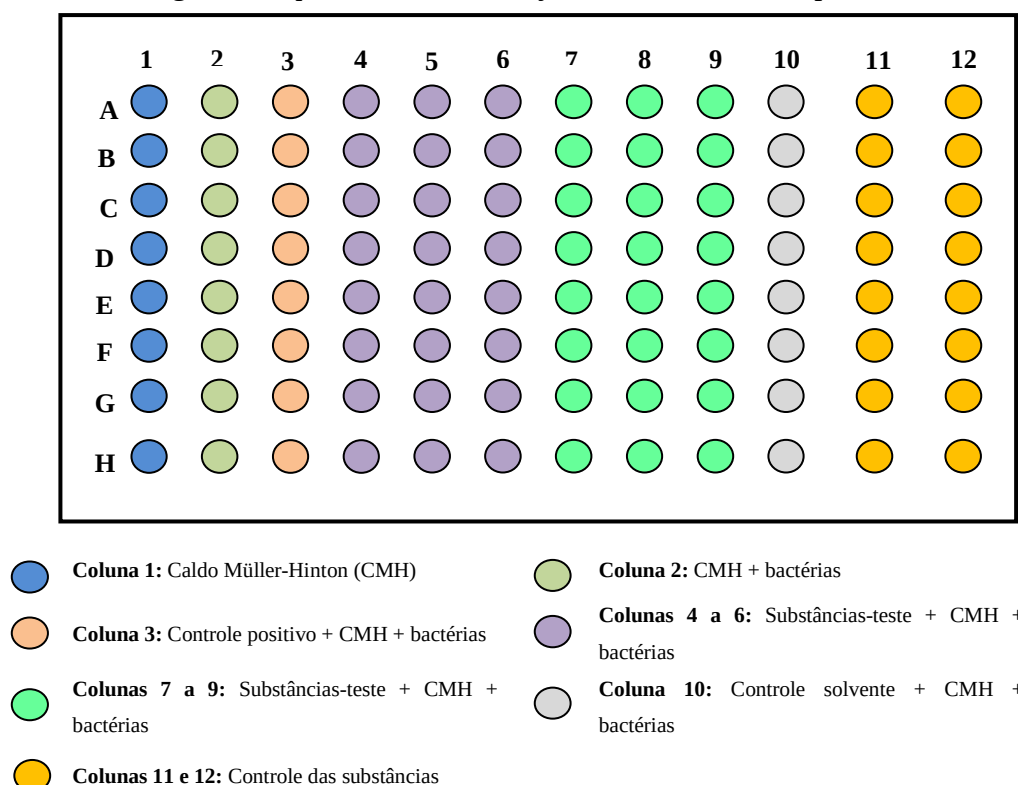


Figura 9 - Esquema da diluição empregada no teste de microplacas para avaliação da atividade antibacteriana.

3.4.7.1. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Antes da adição do indicador resazurina nas microplacas, uma alíquota dos poços em que não foi observado o crescimento bacteriano foi semeada em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton (MH), e incubadas durante 24 horas a 37°C, exceto para *H. pylori* que foi utilizado placas de Petri contendo ágar sangue e incubados por 72 horas a 37° C em condições de microaerofilia (10% de CO₂). Após esse período foi observado os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a CBM que é definida como a menor concentração testada onde não ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura (Yamaguchi *et al.*, 2009). Nos casos em que

todas as concentrações testadas apresentaram crescimento bacteriano determinou-se que o efeito do antimicrobiano foi bacteriostático para a linhagem testada.

3.4.8. Ensaios de microdiluição para levedura

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 µL de meio líquido RPMI 1640 (pH 7,0) com tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico), esterilizado por membrana filtrante. Em seguida, foram acrescidos de 100 µL das soluções das substâncias-teste no primeiro poço para realização da diluição seriada de 1000 a 7,8 µg/mL. Subsequentemente, foram distribuídos 100 µL da suspensão de *C. albicans* em cada poço, exceto nos poços que correspondem ao branco - apenas meio RPMI 1640 e nos poços de controle das substâncias.

Além das substâncias-teste, foram realizados controle positivo (anfotecina B e fluconazol), controle de esterilidade do meio, controle de crescimento do inóculo, controle de cor e esterilidade da amostra e controle negativo/solvente.

As microplacas foram incubadas por 48 horas à 37°C e após esse período foi realizada a leitura visual observando-se a turbidez ocorrida nos poços teste. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo que em cada microplaca foram testados duas substâncias-teste.

3.4.8.1. Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

Antes da adição do indicador TTC nas microplacas, uma alíquota dos poços correspondentes em que não foi constatado o crescimento da levedura foi semeada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, e incubadas por 48 horas à 37°C. Após esse período foi observado os pontos onde ocorreu crescimento microbiano, determinando assim a CFM que é definida como a menor concentração testada onde não

ocorreu crescimento microbiano após a realização da subcultura. Nos casos em que todas as concentrações testadas apresentaram crescimento da levedura determinou-se que o efeito do antimicrobiano foi fungistático.

3.4.9. Determinação da porcentagem de inibição dos micro-organismos

Após incubação as microplacas foram submetidas à leitura espectrofotométrica. A CIM foi determinada para cada micro-organismo, como a menor concentração da amostra que inibe completamente o crescimento mensurável ($A_{590} = 0$) (Araújo *et al.*, 2011).

A determinação da viabilidade dos micro-organismos foi calculada através da média da absorbância de três determinações por concentração de substância testada e subtraída do valor da absorbância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo, para que assim possa ser obtido o valor real de absorbância de bactérias, sem interferência das substâncias-teste. O resultado assim obtido foi, então, convertido em porcentagem de viabilidade celular, utilizando como 100% de viabilidade o valor médio da absorbância obtida nos poços de controle de crescimento, conforme apresenta a equação:

$$\text{Crescimento celular (\%)} = \frac{(\text{Abs T} - \text{Abs ST})}{\text{Abs Cb}} \times 100$$

em que Abs T = absorbância do teste; Abs ST = absorbância da substância teste (sem inóculo); Abs Cb = absorbância do controle de crescimento dos micro-organismos.

3.4.10. Leitura dos ensaios de microdiluição

3.4.10.1. Para as bactérias - revelação com resazurina

A resazurina é um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de óxido-redução, que tem sido utilizado na determinação da atividade antibacteriana. Na sua forma oxidada apresenta coloração azul e na forma reduzida cor rósea. Foram pipetados 50 µL de solução de resazurina a concentração de 5 µg/mL nos poços das microplacas que foram incubadas em temperatura ambiente por duas horas ou até que ocorra mudança de coloração. A manutenção da cor azul nos poços é interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa, como ocorrência de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração da substância-teste sem a mudança de coloração para rosa (Palomino *et al.*, 2002).

3.4.10.2. Para a levedura – revelação com TTC

A avaliação colorimétrica foi realizada utilizando cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC a concentração de 1 mg mL⁻¹) que é um indicador de redox na viabilidade celular. O composto incolor (TTC) é reduzido a 1,3,5- trifenilformazan (TTF) de cor avermelhada indicando metabolismo celular. Os poços da microplaca que apresentaram atividade (sem crescimento) permanecem incolores, enquanto os poços onde houve crescimento microbiano se coram de vermelho (GABRIELSON, *et al.*, 2002)

3.4.11. Ensaio Checkerboard

O efeito sinérgico da FrMN com AMX, CLR e OMP (tríplice) foi avaliado contra *H. pylori* pela técnica de microdiluição modificado para o ensaio *Checkerboard* de acordo com a metodologia descrita em Pillai e Moellering (2005). A FrMN foi

escolhida para esse ensaio, pois foi a única amostra que apresentou potencial anti-*H. pylori* quando testado individualmente no ensaio de microdiluição.

Para a realização dos experimentos, além da solução da FrMN, as soluções de antibióticos (AMX e CLR) e OMP (inibidor de bomba de prótons) foram preparadas. A FrMN foi solubilizada em MeOH:Tween 80:H₂O (20:10:70, v/v/v) e preparada para o uso em uma concentração de 2000 µg/mL em água Milli-Q. A AMX, CLR e OMP foram preparados individualmente, solubilizando-os em água Milli-Q a uma concentração de 250, 125 e 5 µg/mL, respectivamente. Essas concentrações foram determinadas a partir de dados da literatura (Luther *et al.*, 2010). A FrMN foi avaliada combinada com cada agente antimicrobiano (AMX e CLR) ou OMP de maneira individual e simultânea (tríplice).

Para os ensaios, a cultura de *H. pylori* foi transferida à solução de PBS e ajustada a turbidez com a escala 2 de McFarland, seguida de leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorbância entre 0,08 a 0,10 ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), e posteriormente diluída na proporção 1:10 para obter-se a concentração de $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, que foi, então, utilizada nos ensaios.

Os poços das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH. Na última coluna (nº 12) adicionaram-se 100 µL das soluções de AMX, CLR, OMP ou da combinação tripla para realização da diluição seriada, transferindo-se sequencialmente 100 µL do poço anterior para o próximo até a coluna 2. De maneira semelhante, na primeira linha (A) adicionou-se 100 µL da solução de FrMN para posterior realização da diluição seriada até a linha G. Dessa maneira, a coluna 1 contém apenas a FrMN e a linha H apenas a AMX, CLR, OMP ou a combinação tripla. No poço H1 foi feito o controle de crescimento bacteriano. Subsequentemente, foram distribuídos 20 µL da suspensão de *H. pylori* em cada poço.

As microplacas foram incubadas por 72 horas à 37°C em condições de microaerofilia (10% de CO₂) e após esse período foi realizada a leitura visual do crescimento bacteriano, leitura espectrofotométrica em 590 nm e adição de solução de resazurina (5 µg/mL), utilizada como indicador de crescimento bacteriano. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A Figura 10 esquematiza a realização do teste em microplacas.

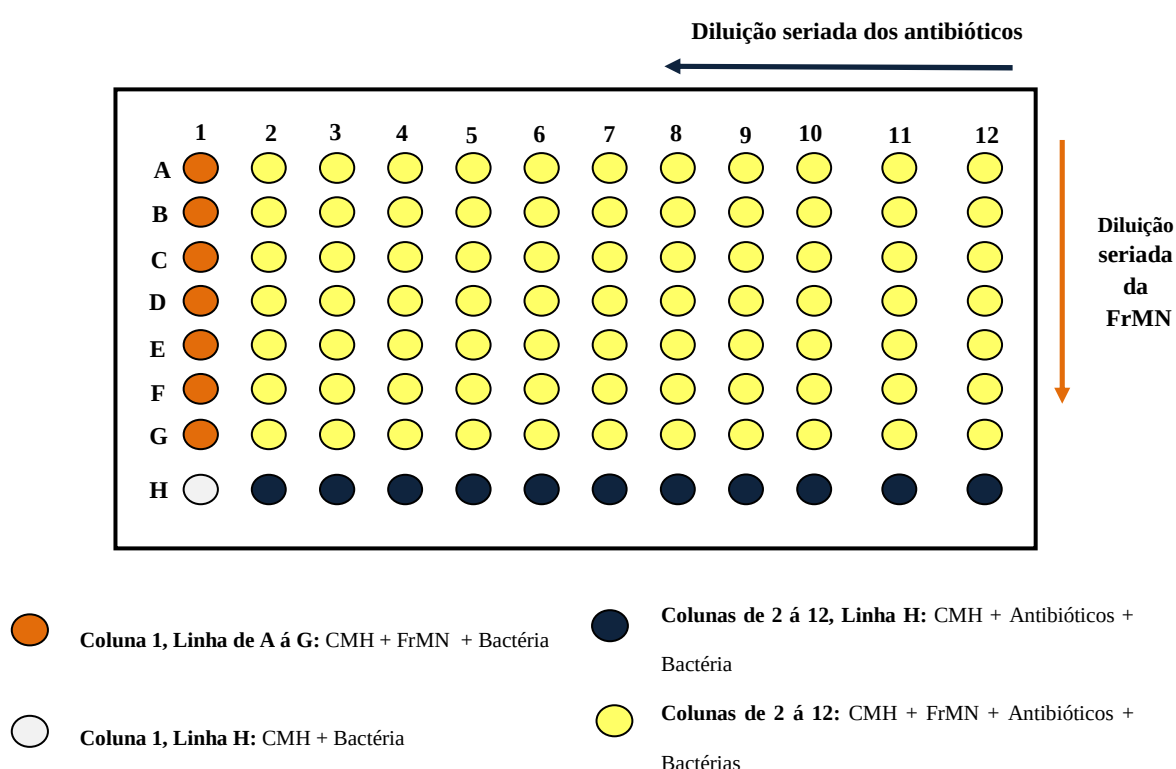


Figura 10 - Esquema de diluição seriada no ensaio *Checkerboard* para avaliação da atividade sinérgica da FrMN, frente ao *H. pylori*.

Para avaliar a interação entre os diferentes tratamentos foi calculado o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de acordo com a seguinte fórmula (Eq2):

$$\text{ICIF: } \text{CIF}_{(\text{FrMN})} + \text{CIF}_{(\text{AMX, CLR, OMP ou combinação tripla})} \quad (\text{Eq1})$$

$$\text{ICIF: } \frac{(\text{CIM}_{\text{FrMN na combinação}})}{(\text{CIM}_{\text{FrMN}})} + \frac{(\text{CIM}_{\text{AMX, CLR, OMP ou combinação tripla na combinação}})}{(\text{CIM}_{\text{da AMX, CLR, OMP ou combinação tripla}})} \quad (\text{Eq2})$$

A partir do ICIF obtido foi avaliada a interação seguindo a classificação descrita por Kumar *et al.* (2012), na Tabela 1.

Tabela 1– Valores de ICIF correspondentes às diferentes interações

Interação	ICIF
Sinergismo	$\text{CIF} \leq 0,5$
Aditivo	$0,5 < \text{CIF} \leq 1$
Indiferente	$1 < \text{CIF} \leq 2$
Antagonismo	$\text{CIF} > 2$

ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; CIF: concentração inibitória fracionada

3.4.12. Ensaios *Time Kill*

O ensaio *Time Kill in vitro* foi conduzido de acordo com a metodologia descrita na norma M26-A do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1999) e realizado a partir da CIM determinada nos testes de microdiluição, sendo CIM e duas vezes a CIM. Além dos testes, foram feitos o controle de crescimento (CMH + inóculo), controle de esterilidade (somente CMH) e controle positivo com a tríplice (AMX, CLR e OMP: 250, 125 e 5 µg/mL, respectivamente) para *H. pylori*, anfotericina B (32 µg/mL) para *C. albicans* e AMP (1250 µg/mL) para os demais micro-organismos. Para realização dos experimentos, o inóculo foi padronizado com a escala 0,5 de

McFarland, seguida de leitura espectrofotométrica a 620 nm até obtenção de absorbância entre 0,08 a 0,10 ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL).

O ensaio é realizado em tubos de ensaio adicionando-se 800 µL de CMH, acrescidos de 100 µL das soluções das substâncias-teste, e em seguida homogeneizados em vortex. Após este procedimento 100 µL desta solução (CMH + substância-teste) são desprezados, e então é adicionado o inóculo padronizado (200 µL em cada tubo). Posteriormente, 10 µL desse homogeneizado são adicionados em 990 µL de PBS e então incubados em tempos pré-determinados, a fim de preparar a solução usada nos ensaios, nomeada dessa maneira como solução-teste.

Para a realização dos experimentos uma alíquota de 100 µL da solução-teste foi plaqueada em meio de ágar sangue para *H. pylori*, ágar Sabouraud para *C. albicans* e ágar MH para as demais bactérias, com o auxílio de alça de Drigalski. O plaqueamento ocorreu nos tempos de 0, 3, 6, 12, 24 e 36 horas para *H. pylori*, 0, 6, 12, 24 e 36 horas para *C. albicans* e 0, 1, 2, 3 e 6 horas para as demais bactérias. As placas foram incubadas por 72 horas à 37°C em condições de microaerofilia (10% de CO₂) para *H. pylori*, 48 horas à 37°C para *C. albicans* e 24 horas a 37 °C para as demais bactérias. Após a incubação as colônias foram contadas manualmente, e o resultado obtido foi multiplicado por 1000, obtendo-se assim a concentração de UFC/mL.

4. Resultados

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos, não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor, se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

4.1. Ensaios de microdiluição

Os resultados obtidos neste ensaio estão apresentados na Tabela 2 e nas figuras correspondentes (Fig. 11 – 15).

Os resultados obtidos mostram que o extrato de *P. torta* inibiu *S. aureus* ATCC (CIM de 125 µg/mL), *B. subtilis* (CIM de 500 µg/mL) e *E. coli* (CIM de 500 µg/mL) (Fig. 11). Com relação ao extrato de *P. ramiflora*, as cepas *S. aureus* (ATCC), *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. setubal* e *C. albicans* foram mais sensíveis com CIM de 125, 250, 500, 62,5, 250 e 500 µg/mL, respectivamente (Fig. 12).

A maitenina mostrou-se um promissor agente antibacteriano contra as bactérias Gram-positivas testadas com CIM de 0,49 µg/mL para as cepas de *S. aureus* e 31,3 µg/mL para *B. subtilis*. *C. albicans* também foi sensível a esta substância com CIM de 125 µg/mL (Fig. 13).

A FrMN foi a única que apresentou atividade anti-*H. pylori* com CIM de 125 µg/mL. *S. aureus* ATCC (CIM de 0,98 µg/mL), *S. aureus* multi-resistente (CIM de 0,98 µg/mL) e *B. subtilis* (CIM de 62,5 µg/mL) também foram sensíveis a este composto (Fig. 14).

O netzaucoieno não apresentou atividade contra nenhum dos micro-organismos testados (Fig. 15), nas condições utilizadas neste estudo.

Os controles negativos contendo EtOH:H₂O (30:70, v/v) ou MeOH:Tween 80:H₂O (20:10:70, v/v/v) não apresentaram atividade para as linhagens testadas (dados não mostrados).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM em µg/mL) das amostras vegetais avaliadas pela técnica de diluição em microplaca.

Micro-organismos	Amostras					
	vegetais	<i>P. torta</i>	<i>P. ramiflora</i>	FrMN	Maitenina	Netzaucoieno
<i>S. aureus</i> (ATCC)		125	125	0,98	0,49	> 1000
<i>S. aureus</i> (MR)		> 1000	> 1000	0,98	0,49	> 1000
<i>B. subtilis</i>		500	250	62,5	31,3	> 1000
<i>E. coli</i>		500	500	> 1000	> 1000	> 1000
<i>P. aeruginosa</i>		> 1000	62,5	> 1000	> 1000	> 1000
<i>S. setubal</i>		> 1000	250	> 1000	> 1000	> 1000
<i>H. pylori</i>		> 1000	> 1000	125	> 1000	> 1000
<i>C. albicans</i>		> 1000	500	> 1000	125	> 1000

MR: multi-resistente

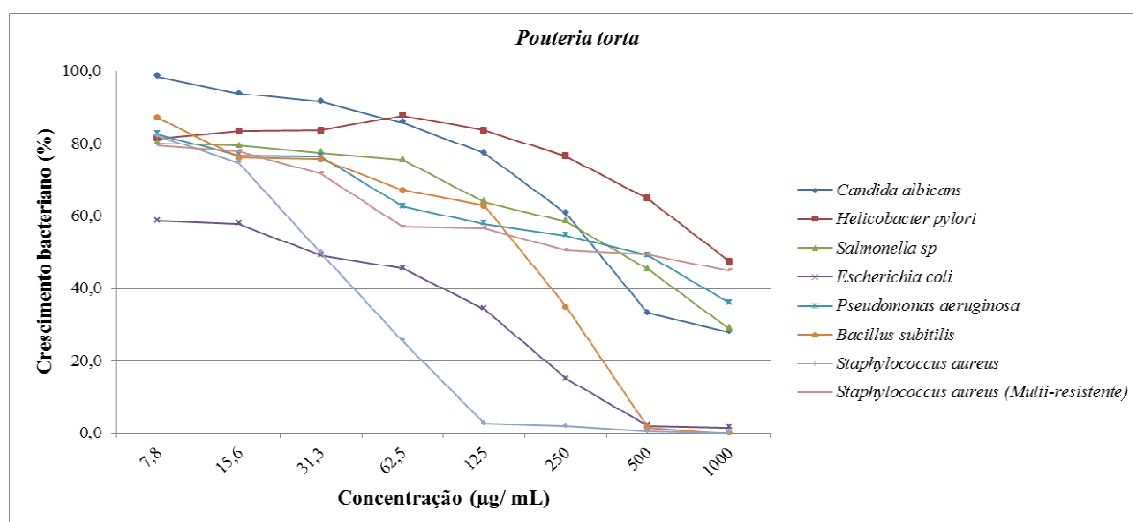


Figura 11 – Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com extrato etanólico de *Pouteria torta*.

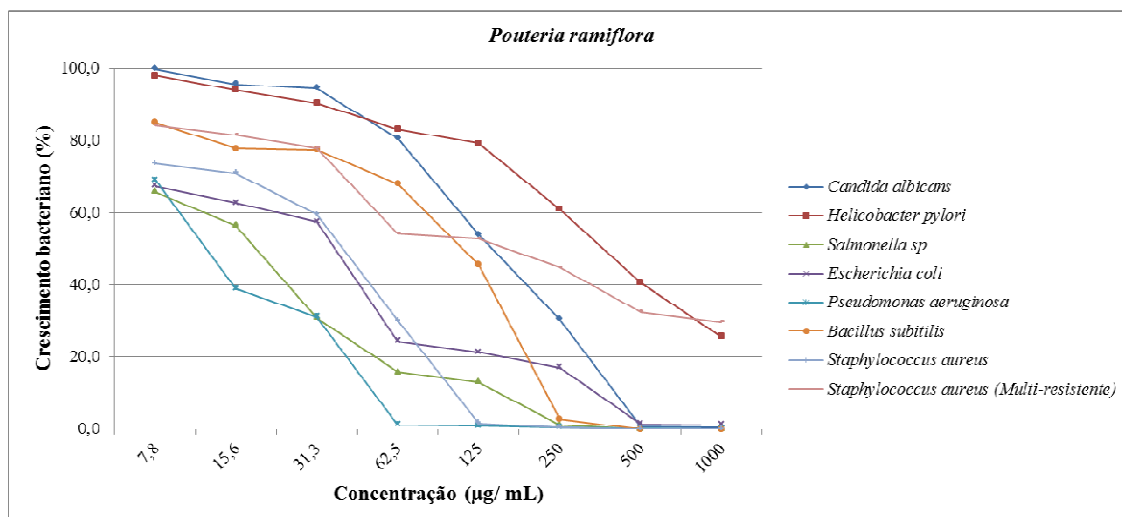


Figura 12 - Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com extrato etanólico de *Pouteria ramiflora*.

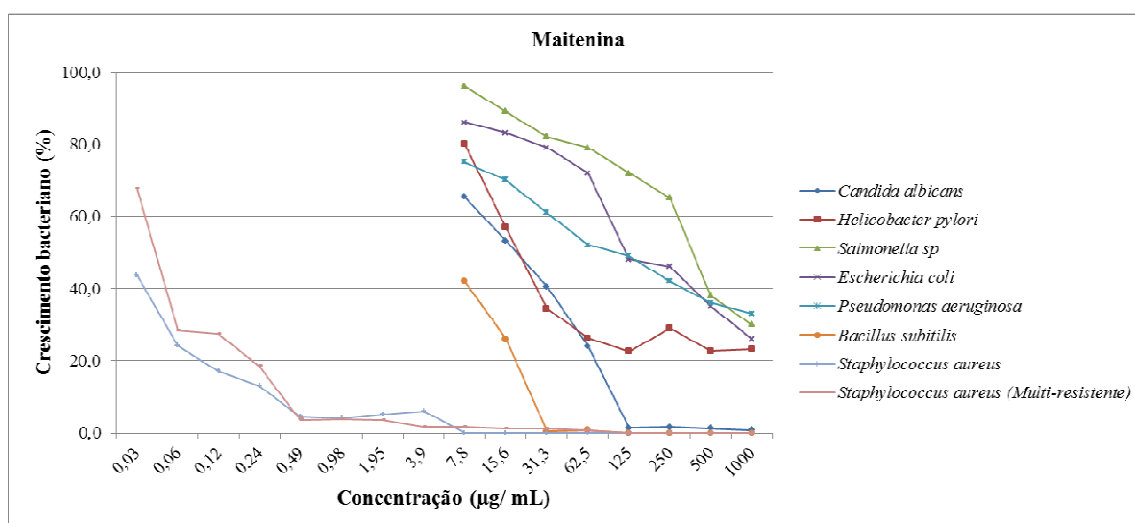


Figura 13 - Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com maitenina.

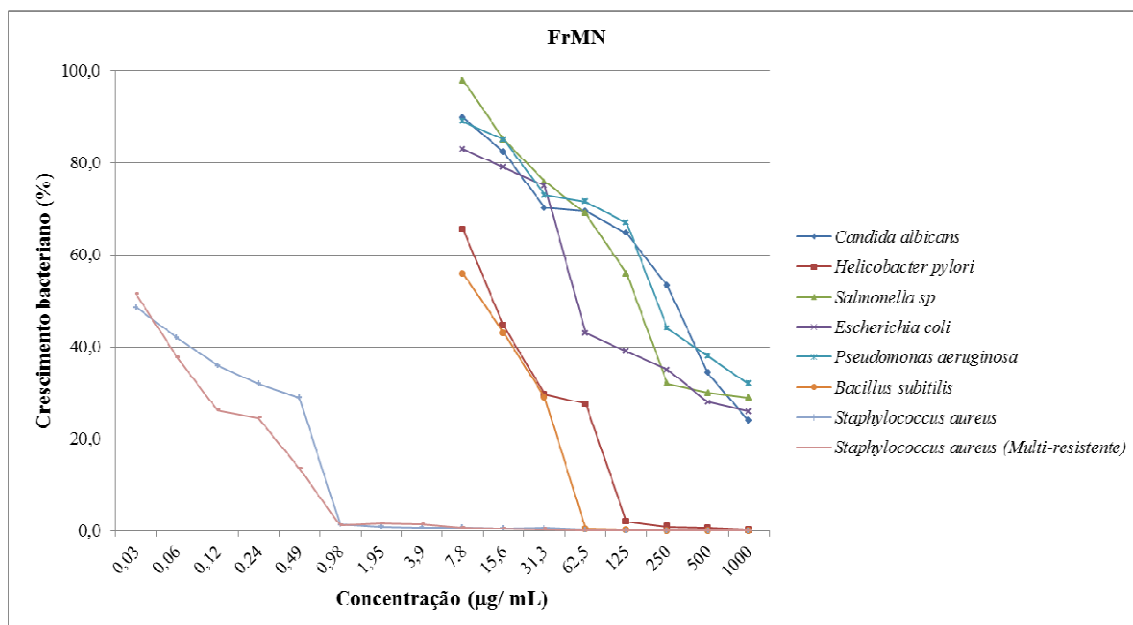


Figura 14 - Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com a FrMN.

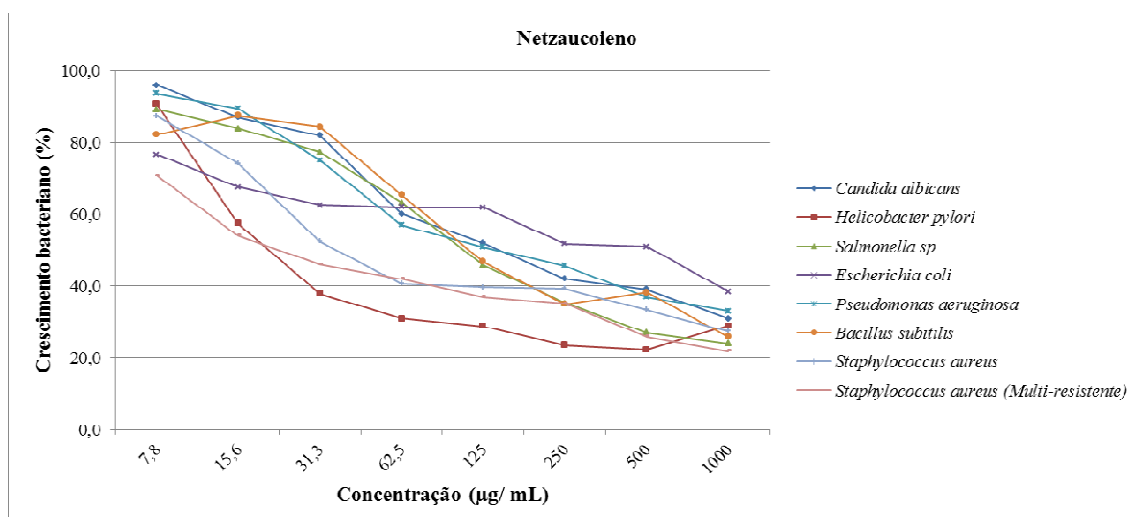


Figura 15 - Porcentagem de viabilidade dos micro-organismos tratados com netzaucoleno.

4.2. Ensaios *Checkerboard*

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de microdiluição com a FrMN contra o *H. pylori*, seu efeito sinérgico com AMX, CLR e OMP (tríplice utilizada contra *H. pylori*) foi avaliado pelo ensaio *Checkerboard* e está apresentado na Tabela 3. A FrMN foi testada com cada componente da tríplice e com os três simultaneamente.

A FrMN, quando testada individualmente, apresentou CIM de 125 µg/mL, a AMX de 250 µg/mL e a CLR de 62,5 µg/mL. O OMP não apresenta atividade anti-*H. pylori*, no entanto quando testado simultaneamente com a FrMN ou com a AMX + CLR age sinérgicamente potencializando o efeito de ambos. A FrMN apresentou CIM de 62,5 µg/mL quando combinada com o OMP e a tríplice 15,6 µg/mL para AMX e 7,8 µg/mL para CLR (Tabela 3). A CIM da FrMN foi para 15,6 µg/mL quando combinada com AMX, CLR ou com a tríplice. Os resultados expressos pelo ICIF mostraram um efeito predominantemente sinérgico ($\text{ICIF} \leq 0,5$) em todas as combinações avaliadas.

Tabela 3- Efeito sinérgico da FrMN com AMX, CLR e OMP (tríplice) contra *H. pylori*

Substâncias-teste	CIM (µg/ mL)		CIF	ICIF	Resultado
	Não combinado	Combinado			
FrMN	125	15,6	0,12	0,14	Sinérgico
AMX	250	3,9	0,02		
FrMN	125	15,6	0,12	0,18	Sinérgico
CLR	62,5	3,9	0,06		
FrMN	125	62,5	0,50	0,50	Sinérgico
OMP	-	-	-		
FrMN	125	15,6	0,12	0,18	Sinérgico
Tríplice	AMX: 15,6	AMX: 0,97	0,06		
	CLR: 7,8	CLR: 1,9	0,24	0,36	Sinérgico

CIM: concentração inibitória mínima; CIF: concentração inibitória fracionada; ICIF: índice de concentração inibitória fracionada; FrMN: Fração enriquecida contendo maitenina e netzaucoieno; AMX: amoxicilina; CLR: claritromicina; OMP: omeprazol

- ausência de atividade

4.3. Ensaios *Time Kill*

A atividade antibacteriana dos extratos de *P. torta* e *P. ramiflora*, da FrMN e maitenina contra diferentes micro-organismos foi confirmada pelo ensaio *Time Kill*, cujos resultados estão apresentados nas Figuras de 16 a 23.

Para *S. aureus*, a redução na contagem de colônias foi vista consistentemente ao longo de 6 horas. A redução máxima nos experimentos com maitenina, FrMN e *P. ramiflora* foi entre 3 e 6 horas. Para *P. torta* houve uma redução na contagem de colônias em relação ao tempo, mas o crescimento não zerou em 6 horas ($8,9 \times 10^3$ UFC/mL) (Fig. 16).

A maitenina e a FrMN apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* multi-resistente, com redução máxima na contagem de colônia também entre 3 e 6 horas (Fig. 17).

O *B. subtilis* foi mais sensível aos efeitos tóxicos dos extratos de *P. torta* e *P. ramiflora*, maitenina e FrMN. A contagem de colônias foi significativamente menor em comparação com o controle de crescimento já no tempo 0. Para maitenina e *P. ramiflora* a redução máxima na contagem de colônias foi em 1 hora e para FrMN e *P. torta* foi entre 1 e 2 horas (Fig. 18).

Somente os extratos de *P. torta* e *P. ramiflora* apresentaram atividade anti-*E. coli*, com redução máxima na contagem de colônias entre 3 e 6 horas (Fig. 19).

P. aeruginosa (Fig. 20) e *S. setubal* (Fig. 21) foram sensíveis apenas aos efeitos tóxicos dos extratos de *P. ramiflora*, no entanto a contagem de colônias não zerou no tempo de 6 horas, apresentando neste tempo $4,65 \times 10^4$ UFC/mL para *P. aeruginosa* e $1,45 \times 10^4$ UFC/mL para *S. setubal*.

Com relação aos experimentos com *C. albicans*, ocorreu uma redução na contagem de colônias logo após o tempo 0 tanto para maitenina quanto para o extrato de

P. ramiflora, mas essa contagem não zerou após 36 horas de incubação, chegando a esse tempo com $1,4 \times 10^4$ UFC/mL para *P. ramiflora* e $3,68 \times 10^4$ UFC/mL para maitenina (Fig. 22).

Enfim, dos compostos avaliados a FrMN foi a única que apresentou atividade anti-*H. pylori* e essa atividade foi confirmada pelo ensaio *Time Kill*, que apresentou redução máxima na contagem de colônias entre 24 e 36 horas (Fig. 23).

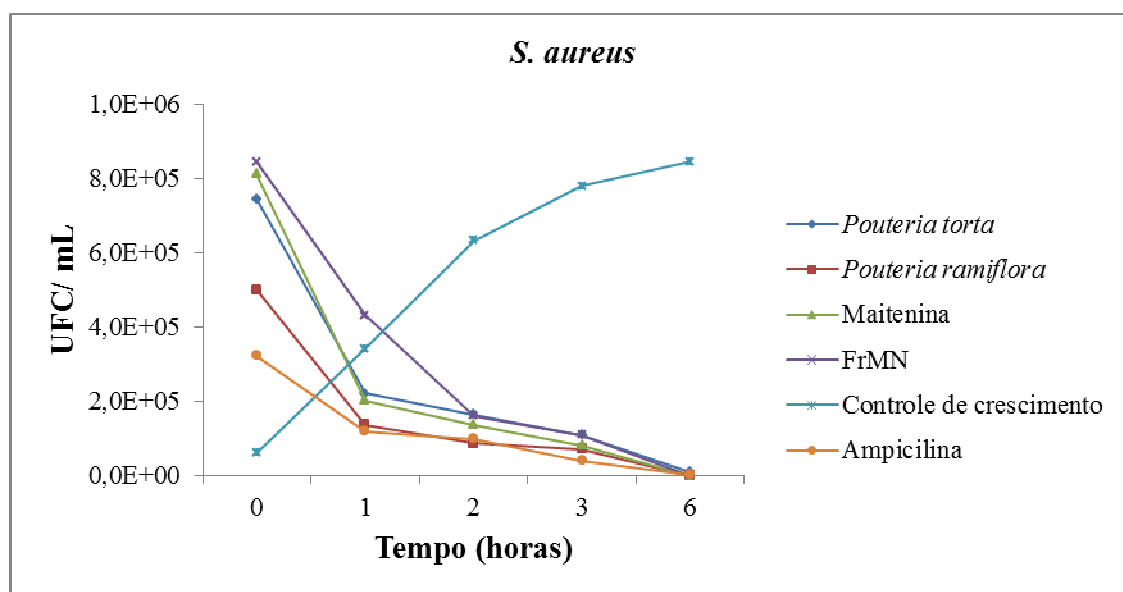


Figura 16 - Atividade antibacteriana dos extratos de *P. torta* (125 µg/mL), *P. ramiflora* (125 µg/mL), maitenina (0,49 µg/mL) e FrMN (0,98 µg/mL) contra *S. aureus* (ATCC) pelo ensaio *Time Kill*. (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).

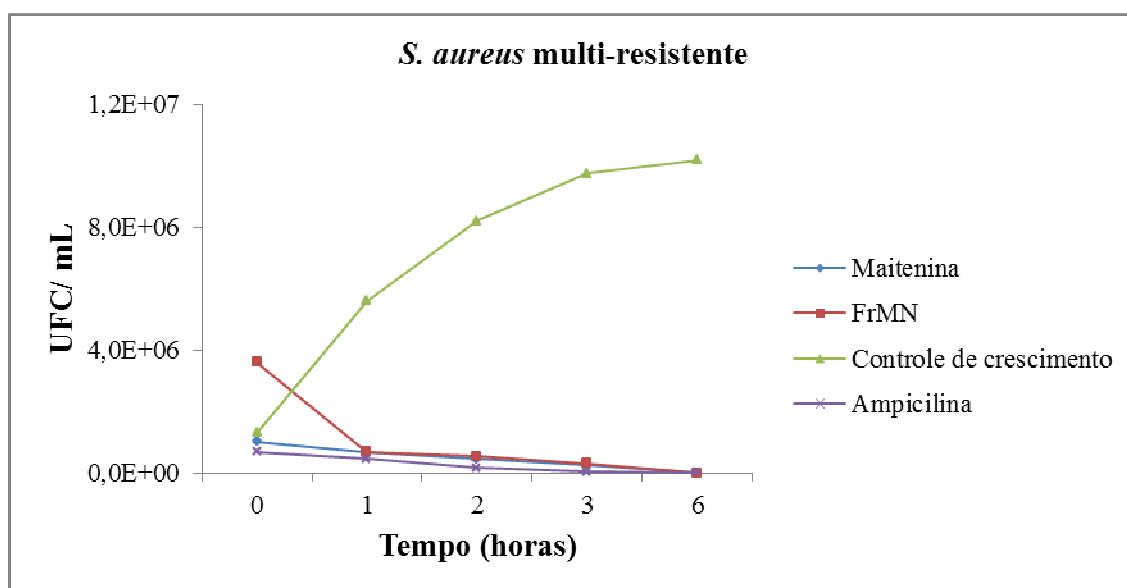


Figura 17 - Atividade antibacteriana da maitenina (0,49 $\mu\text{g/mL}$) e FrMN (0,98 $\mu\text{g/mL}$) contra *S. aureus* multi-resistente pelo ensaio *Time Kill*. (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 $\mu\text{g/mL}$).

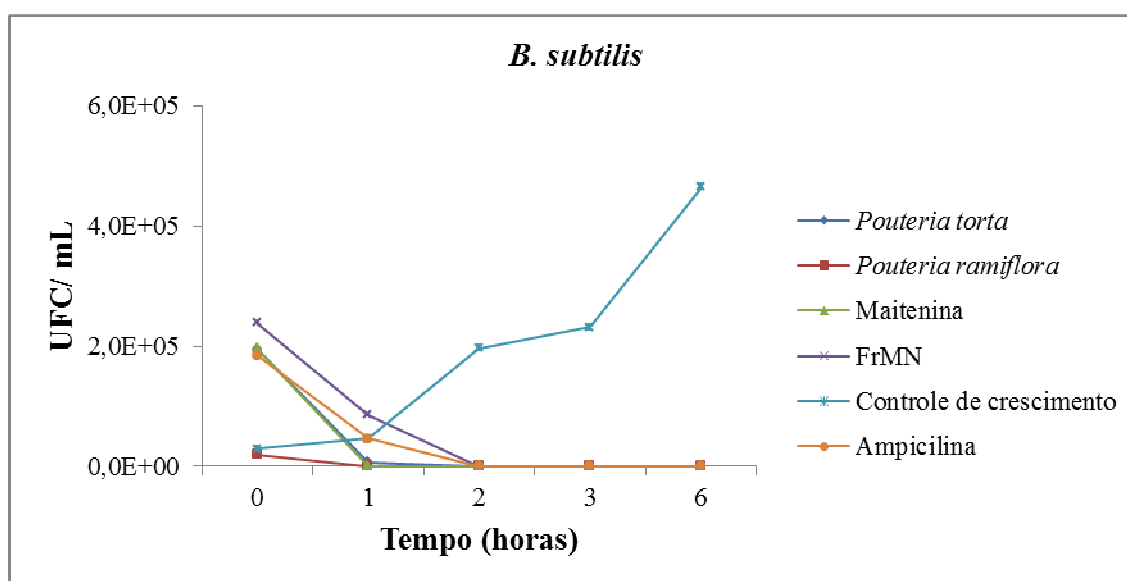


Figura 18 - Atividade antibacteriana dos extratos de *P. torta* (500 $\mu\text{g/mL}$), *P. ramiflora* (250 $\mu\text{g/mL}$), maitenina (31,3 $\mu\text{g/mL}$) e FrMN (62,5 $\mu\text{g/mL}$) contra *B. subtilis* pelo ensaio *Time Kill*. (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 $\mu\text{g/mL}$).

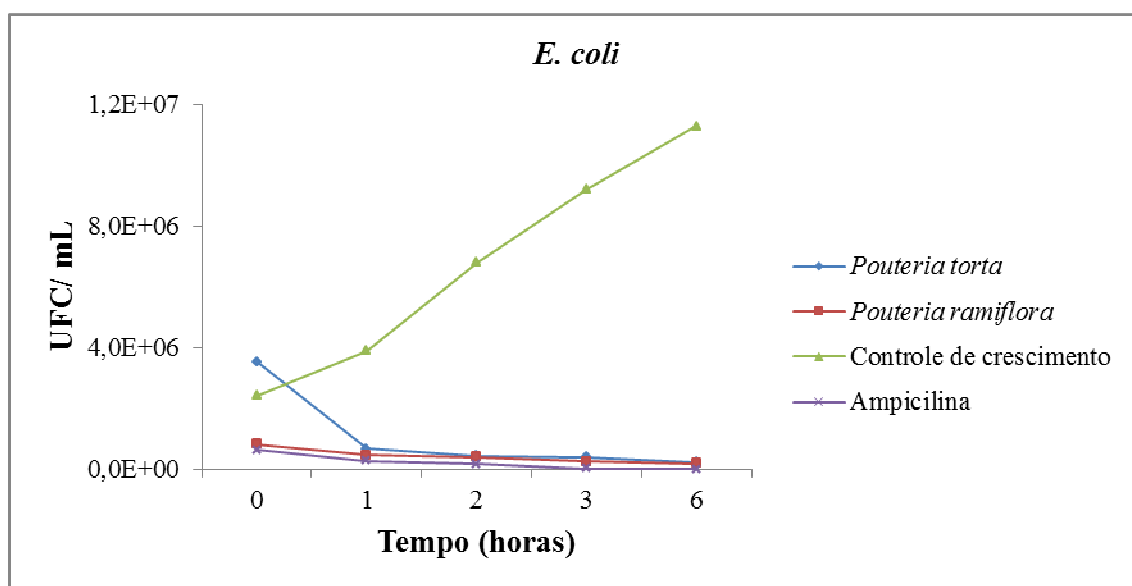


Figura 19 - Atividade antibacteriana dos extratos de *P. torta* (500 µg/mL) e *P. ramiflora* (500 µg/mL) contra *E. coli* pelo ensaio *Time Kill*. (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).

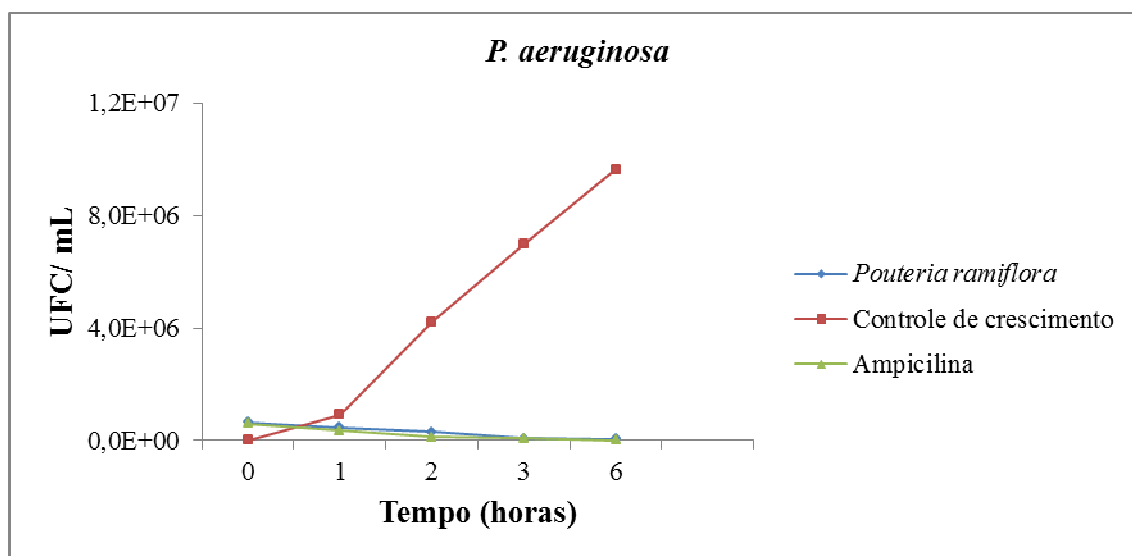


Figura 20 - Atividade antibacteriana dos extratos de *P. ramiflora* (62,5 µg/mL) contra *P. aeruginosa* pelo ensaio *Time Kill*. (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).

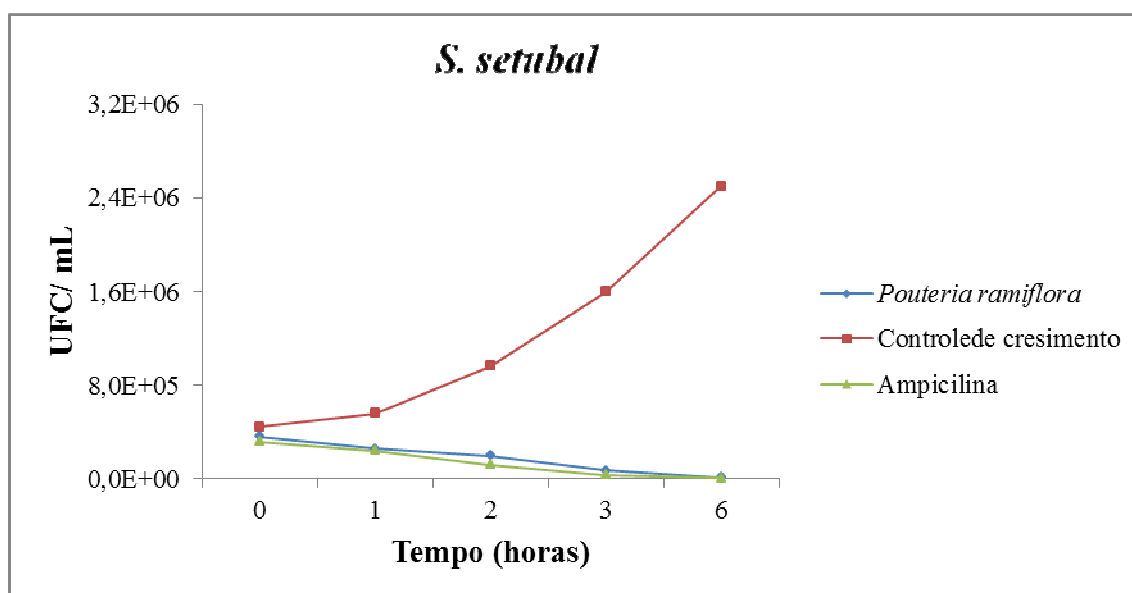


Figura 21 - Atividade antibacteriana dos extratos de *P. ramiflora* (250 µg/mL) contra *S. setubal* pelo ensaio *Time Kill*. (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Ampicilina Controle positivo - 1250 µg/mL).

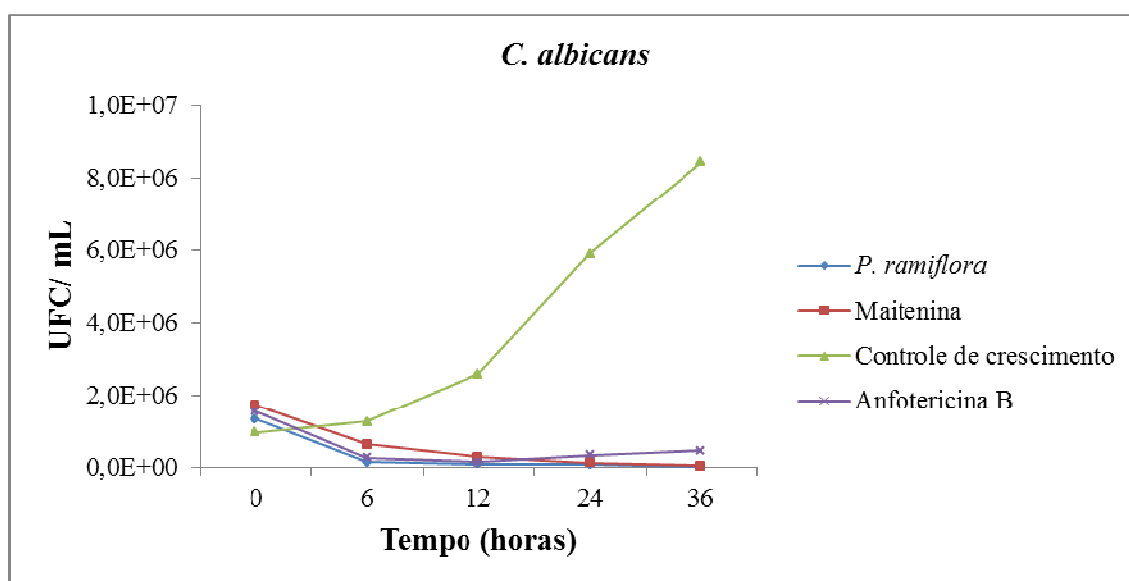


Figura 22 - Atividade antifúngica dos extratos de *P. ramiflora* (500 µg/mL) e maitenina (125 µg/mL) contra *C. albicans* pelo ensaio *Time Kill*. (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Anfotericina B Controle positivo - 32 µg/mL).

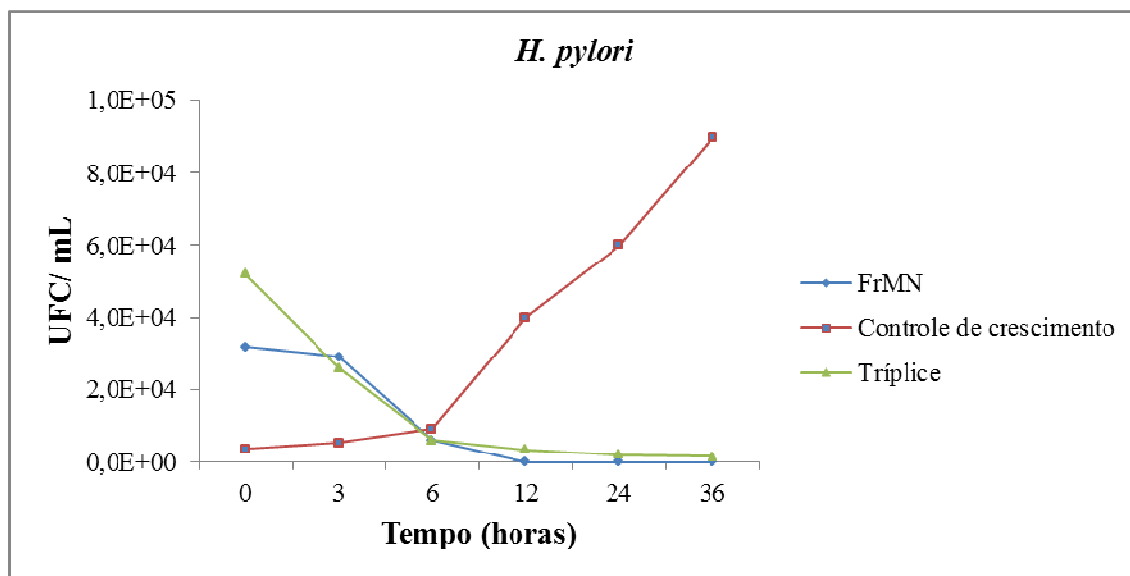


Figura 23 - Atividade antibacteriana da FrMN (125 µg/mL) contra *H. pylori* pelo ensaio *Time Kill*. (Controle de crescimento: CMH + inóculo; Tríplice Controle positivo - AMX, CLR e OMP: 250, 125 e 5 µg/mL, respectivamente).

5. *Discussão*

"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia."

Clarice Lispector

À resistência que os micro-organismos adquirem contra os antibióticos, levam a um grande interesse na busca de novas substâncias antimicrobianas. Extratos de plantas, bem como compostos isolados biologicamente ativos de espécies vegetais utilizados na medicina tradicional podem ser recursos prolíficos para o desenvolvimento de novas substâncias (Mohammed e Al-Bayati, 2009).

Neste estudo, a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *P. torta*, *P. ramiflora*, maitenina e netzaucoieno foram avaliados frente à bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e *C. albicans* pelo teste de microdiluição, cujos resultados foram complementados com o ensaio *Time Kill*.

O comportamento das bactérias quando submetidas à coloração de Gram se deve basicamente às diferenças de estruturas de contorno que as compõem (Gram positivas e Gram-negativas). Entre outros aspectos, a camada de peptidoglicano nas Gram-positivas é mais espessa e mais entrecruzada, enquanto que nas Gram-negativas é mais fina e menos entrecruzada. Além destas camadas, as Gram-negativas apresentam duas membranas sendo uma delas externa ao peptideoglicano. Estas diferenças estruturais resultam em diferentes suscetibilidades a uma variedade de antibióticos que tem as estruturas de contorno como sítios de ação (Bylka *et al.*, 2004).

Com relação à atividade antifúngica, a resistência às drogas antifúngicas tem sido monitorada principalmente em cepas de *Candida* spp em quadros infecciosos humanos (Loeffler *et al.*, 2000). A espécie *C. albicans* foi avaliada no presente estudo por ser a espécie mais frequente em infecções, sendo considerado o patógeno oportunista mais comum na espécie humana. Além disso, o tratamento das infecções causadas por *Candida* spp é limitado a um número pequeno de agentes antifúngicos, o que inclui poliênicos como nistatina e anfotericina B; azólicos, entre eles o cetoconazol,

itraconazol e fluconazol; e derivados azólicos recentes, como o voriconazol e o posaconazol (Avrella e Goulart, 2008).

Outro aspecto importante são os efeitos colaterais dos agentes antifúngicos. O fluconazol, por exemplo, utilizado como controle positivo, é um antifúngico triazólico de amplo espectro, que apresenta atividade fungistática tempo-dependente. Portanto, o tratamento ótimo requer que a concentração sérica de fluconazol mantenha-se acima da CIM no organismo em maior parte do intervalo de dosagem. Embora poucas reações adversas associadas ao fluconazol sejam relatadas, clinicamente pode ocorrer reações adversas significativas com o uso de antifúngico triazol. A mais importante destas é hepatotoxicidade que associada ao triazol é dependente da dose; e o espectro de toxicidade pode variar de leve elevações transitórias dos níveis de transaminases à hepatite, colestase e insuficiência hepática fulminante (Chicella *et al.*, 2011).

A anfotericina B, outro controle positivo utilizado neste estudo, tem seu uso associado a efeitos adversos, como nefrotoxicidade e febre com calafrios, como reação aguda à infusão intravenosa, já que a farmacocinética deste fármaco não permite a administração oral (Hardman e Limbird, 1996). Novas formulações da anfotericina B, na forma de lipossomas e de dispersão coloidal, produzem menos efeitos colaterais, como resultado da redistribuição do fármaco nos tecidos e da seletividade de liberação, mas o preço destas formulações é muitas vezes maior (Hoppe-Tichy, 1997).

Nos últimos anos, tanto a anfotericina B como os azóis têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia. Estas duas classes de medicamentos têm como alvo a membrana celular dos fungos. Os polienos ligam-se a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais. O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversas pequenas moléculas, levando à morte celular. Os azóis são compostos

totalmente sintéticos. O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da esterol-14- α -desmetilase, um sistema enzimático microssomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo. Os azóis causam menos reações adversas que a anfotericina B, porém são menos potentes que a mesma. Podem ter ação fungistática ou fungicida. O uso excessivo dos azóis levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis. Além disso, os azóis ainda apresentam a desvantagem da resistência cruzada (Hardman e Limbird, 1996; Williams e Lemke, 2002). Portanto, a busca de novos compostos antifúngicos são objetos de investigação contínua.

Dos compostos avaliados, o extrato etanólico das folhas de *P. ramiflora* e a maitenina apresentaram potencial antifúngico, *in vitro*, contra *C. albicans*, com CIM de 500 e 125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, mostrando-se como fontes promissoras no desenvolvimento de novos fitofármacos para tratamento das micoses.

Considerando os resultados obtidos, dos extratos de *Pouteria*, a espécie *P. ramiflora* foi mais ativa, apresentando atividade contra *S. aureus* (ATCC), *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. setubal* e *C. albicans*, enquanto que a espécie *P. torta* apresentou atividade contra *S. aureus* (ATCC), *B. subtilis* e *E. coli*. As duas espécies mostraram atividade bactericida contra *E. coli* que é uma bactéria que habita o trato gastrointestinal de animais e seres humanos, como por exemplo, e no caso da *P. ramiflora* para *S. setubal*. Estes resultados fornecem evidências para justificar o uso de tais plantas na medicina tradicional contra diarreia, náuseas e vômitos (Souza *et al.*, 2012). Outro destaque que também deve ser dado é que de todos os compostos avaliados o extrato de

P. ramiflora foi o único que apresentou atividade contra *P. aeruginosa* com CIM de 62,5 µg/mL, sendo que essa atividade pode ser promissora levando-se em conta que esta bactéria é resistente a antibióticos de primeira linha (Livermore, 1992; Troillet *et al.*, 1997). Além disso, *P. aeruginosa* é responsável por grande parte de infecções nosocomiais (Jarvis e Martine, 1992; Sader *et al.*, 2001).

Considerando no entanto, que o extrato é uma mistura complexa de vários compostos orgânicos, o estudo fitoquímico desses extratos será muito importante no sentido de elucidar as substâncias responsáveis pelo efeito observado, e assim determinar o desenvolvimento de novos constituintes ativos para fármacos.

Estudos fitoquímicos realizados com o extrato metanólico dos ramos de *P. torta* demonstraram a presença de triterpenos como acetato de α -amirina, acetato de β -amirina, ácido betulínico e ácido ursólico (Che *et al.*, 1980). Dos extratos hexânico e diclorometano de flores e frutos foram isolados ácidos graxos, poliisoprenoides, triglicerídeos, hidrocarbonetos normais e ramificados, esteroides e triperpenos penta- e tetracíclicos (David, 1993). Ainda do extrato hexânico das folhas desta planta foram isolados hidrocarbonetos, álcoois de cadeia longa e acetato de lupeíla. Da fração acetonitrila:clorofórmio do extrato etalólico bruto foram obtidas misturas de triperpenos contendo α - e β -friedelinol e α - e β -amirina, além do ácido 12,13-dihidropomólico (Lopez, 2005) e da fração aquosa foi obtido o flavonoide miricitrina (Silva *et al.*, 2006).

A pouterina, uma proteína semelhante à lecitina, foi extraída de sementes de *P. torta* e apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* (Boleti *et al.*, 2007).

Com relação à *P. ramiflora*, não foram encontradas informações na literatura sobre a análise fitoquímica desta espécie.

As espécies bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas podem ter diferentes sensibilidades às substâncias contidas em extratos devido às diferenças na ultraestrutura da célula associadas à parede celular ou camadas de contorno celular (Miceli *et al.*, 2011). Os resultados obtidos nesse estudo reforçam a ideia de que a atividade biológica de extratos de plantas é devido aos efeitos combinados e/ ou sinérgicos de uma mistura complexa de fitoquímicos.

Um estudo preliminar sobre a atividade antimicrobiana do acetato de α -amirina, ácido betulínico e betulinaldeído contra isolados clínicos de *S. aureus* resistentes e sensíveis à metilicina mostrou inibição em concentrações que variaram de 8 a 32 $\mu\text{g/mL}$ (Chung, 2004). Outros triterpenos, tais como o ácido oleanólico, ácido ursólico, ácido rotundioico e zeilasteral também possuem atividade antimicrobiana comprovada (Katerere *et al.*, 2003; Mallavadhani *et al.*, 2004; León *et al.*, 2005). O acetato de α -amirina, ácido betulínico e ácido ursólico, por exemplo, são triterpenos pentacíclicos já isolados das folhas de *P. torta* (Che *et al.*, 1980). Os triterpenoides representam uma das classes de compostos mais ativos com relação à atividade antibacteriana; no entanto, o mecanismo de ação dos triterpenoides não está completamente esclarecido (Chung *et al.*, 2011). De acordo com León *et al.* (2005), a atividade antimicrobiana dos triterpenoides zeilasteral e dimetilzeilasteral contra bactérias Gram-positivas pode ser devido ao bloqueio da divisão celular por inibição da síntese de DNA e da síntese macromolecular em *B. subtilis*. A inibição da síntese macromolecular pode ser devido ao dano na membrana celular.

A presença de flavonoides nos extratos avaliados neste estudo poderia sugerir outro mecanismo. Há a constatação de que os flavonoides têm um efeito agregante em células bacterianas (Cushnie e Lamb, 2011). Provavelmente, os flavonoides não matam as células bacterianas, apenas induzem a formação de agregados, reduzindo o número

de UFC nas contagens viáveis (Cushnie e Lamb, 2005; Miceli *et al.*, 2011). Entretanto, este efeito agregante diminui a área de superfície o que pode resultar em uma diminuição do consumo de oxigênio, interrompendo a cadeia de transporte de elétrons e em uma diminuição de nutrientes como uridina e timidina, o que pode inibir a síntese de ácidos nucleicos (Cushnie e Lamb, 2011).

Mecanismos semelhantes aos dos triterpenoides e/ou aos dos flavonoides podem ser sugeridos, mas outros estudos devem ser realizados para elucidá-los, além de ser fundamental a análise fitoquímica dos extratos.

O desenvolvimento de substâncias com amplo espectro antimicrobiano é de grande interesse, como observado nos resultados principalmente com a *P. ramiflora*, pois a multi-resistência está sendo difundida entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, e fungos (Kumar *et al.*, 2012).

Das amostras avaliadas no presente estudo, a maitenina e a FrMN foram as que apresentaram as atividades mais promissoras contra bactérias Gram-positivas. A CIM da maitenina contra *S. aureus* (ATCC) e *S. aureus* multi-resistente foi de 0,49 µg/mL e da FrMN 0,96 µg/mL, ambas com tempo de morte entre 3 e 6 horas. Contra o *B. subtilis*, a CIM foi de 31,3 µg/mL com tempo de morte em aproximadamente 1 hora para maitenina e 62,5 µg/mL com tempo de morte entre 1 e 2 horas para FrMN. Além disso, a maitenina apresentou atividade anti- *C. albicans* e a FrMN anti- *H. pylori*.

O *S. aureus* é um patógeno ubiqüitário, adquirido tanto em ambientes hospitalares quanto em não hospitalares. Este micro-organismo tem desenvolvido diversas estratégias para resistir à ação de praticamente todos os antibióticos (Chung *et al.*, 2011), como observado com o isolado clínico avaliado no presente estudo que apresenta resistência à amoxicilina, clindamicina, eritromicina, imipenem, oxacilina, penicilina e piperacilina + tozabactam.

A maitenina, em 1950, foi um dos primeiros compostos isolados de espécies vegetais, juntamente com o diterpeno biflorinina com propriedades antimicrobianas efetivas (Sartori, 2005). Em 1971, Lima *et al.* já demonstravam que a maitenina exibe forte atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram-positivas. No entanto, os triterpenos ficaram esquecidos por anos.

Recentemente, surgiu um novo interesse no uso de triterpenos quinomametídicos, em especial da maitenina, principalmente como substâncias para o tratamento do câncer, em função de sua baixa toxicidade e capacidade de potencializar outros quimioterápicos (Santos Oliveira *et al.*, 2009). Nos primeiros estudos, Melo *et al.* (1974) avaliaram a maitenina associada com outras substâncias anticancerígenas de origem natural, em onze pacientes com carcinoma baso-celular avançado. Todos os pacientes melhoraram clinicamente, apresentando reduções superiores a 50% do tamanho da lesão. A maitenina tem pouco potencial de irritação para a pele, mas sua ação foi considerada lenta. Um aspecto curioso relatado, pelos autores, é que as lesões continuaram a regredir por vários dias, mesmo após o uso tópico da suspensão da maitenina, sugerindo um prolongado efeito esquecido por longos anos. De acordo com Corsino *et al.* (2000), os estudos mais recentes não foram publicados porque visam o lançamento de novas drogas pela indústria farmacêutica. Até 16 de setembro de 2012, em pesquisa feitas no pubmed não foram encontrados novos dados na literatura de estudos realizados com a maitenina.

Como já mencionado, com relação à atividade antibacteriana, poucos estudos são realizados para elucidar o mecanismo de ação bactericida de terpenos. Há especulações no envolvimento destes compostos lipofílicos na ruptura da membrana (Saleem *et al.*, 2010). Mendoza *et al.* (1997), por exemplo, concluíram que aumentar a hidrofilicidade de diterpenos kaurânicos por introdução de um grupo 3β -OH reduz

drasticamente a sua atividade antimicrobiana. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar estas especulações.

Neste estudo, foram utilizados a FrMN e o netzaucoieno isolado com a finalidade de elucidar o constituinte bioativo, que são produtos de metabolismo celular da espécie *Salacia campestris*.

A FrMN é constituída com maitenina e netzaucoieno, que são compostos majoritários nesta fração; o netzaucoieno foi o único composto que não apresentou atividade contra os micro-organismos testados nas condições utilizadas neste estudo. No entanto, Moujir *et al.* (1991) escreveram um trabalho intitulado “Mode of Action of Netzahualcoyone”, por demonstrar atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e leveduras, mas não contra bactérias Gram-negativas. Os autores acreditam que o esqueleto de triterpeno quinomametídico e o grupo cetona no carbono 22 do anel E favorecem a atividade antimicrobiana. Os efeitos do netzaucoieno foram avaliados sobre a respiração celular de células intactas e os dados obtidos sugerem que o netzaucoieno é adsorvido na superfície da célula bacteriana, causando morte celular, provavelmente por inibição das enzimas autolíticas. Essa variação entre os resultados obtidos no presente estudo com os dados na literatura provavelmente está relacionada com o grau de pureza da substância isolada.

Os resultados obtidos com a FrMN sugerem que a atividade antimicrobiana pode ser parcialmente atribuída à maitenina, principalmente contra as bactérias Gram-positivas por apresentarem resultados semelhantes. A atividade anti-*H. pylori*, no entanto, não está claro se foi devido à FrMN conter antimicrobianos mais potentes ou os compostos antimicrobianos existentes atuarem sinergicamente.

Neste estudo, em vista dos resultados promissores obtidos quando testada isoladamente no ensaio de microdiluição, a FrMN foi avaliada em combinação com a

terapia tripla utilizada contra *H. pylori*, ou seja, a interação foi feita com os antibióticos mais comuns utilizados clinicamente, além de um inibidor de bomba de prótons para permitir a completa exploração da FrMN como novo agente antimicrobiano.

Há um interesse clínico no uso de combinações de produtos naturais e agentes antimicrobianos para melhorar o espectro da atividade do medicamento (Kumar *et al.*, 2012). Além disso, o uso de fármacos combinados é ocasionalmente recomendado para evitar a resistência emergente durante o tratamento e para conseguir uma maior eficácia no tratamento de infecções e doenças. No entanto, a seleção de uma combinação adequada requer uma compreensão do potencial da interação entre os agentes antimicrobianos (Jackson *et al.*, 2009).

O ensaio *Checkerboard* é um sistema *in vitro* que determina a atividade antimicrobiana, utilizando a combinação de mais de uma substância teste e/ou antibióticos. Nessa metodologia, a resposta é dada como sinérgica, antagônica e indiferente. Um efeito sinérgico é considerado quando a atividade da combinação é significativamente maior do que os compostos testados individualmente (Mitchell *et al.*, 2012). O efeito antagônico permite que doses mais baixas de um ou outro antibiótico seja usada para reduzir a toxicidade; e na resposta indiferente, o uso de dois antibióticos pode prevenir o aparecimento de resistência a qualquer um dos dois. Apesar do modo de interação especulado, não são definidos os benefícios clínicos (Kumar *et al.*, 2012).

Os valores são expressos em índice de concentração inibitória fracionada e esse valor $\leq 0,5$ indica uma interação sinérgica, sendo que o grau de sinergismo aumenta quando o valor tende para zero (Jackson *et al.*, 2009). Com base nisto, todas as combinações avaliadas neste estudo pelo ensaio *Checkerboard* apresentaram um efeito sinérgico. Estes resultados apoiam a hipótese de que a FrMN pode representar uma nova ferramenta potencialmente valiosa como um adjuvante de quimioterapia anti-*H.*

pylori. De acordo com Sueke *et al.* (2010), se uma combinação de agentes apresenta um efeito sinérgico ou aditivo, determinado pela CIM, esta combinação pode ser mais eficaz do que a monoterapia.

O mecanismo destas interações sinérgicas parece ser complexo. O antibiótico claritromicina, por exemplo, mata as bactérias, se ligando à porção 50S do ribossomo, inibindo dessa maneira, a síntese de proteína. Com relação à amoxicilina, seu mecanismo de ação está baseado na inibição da biossíntese do mucopeptídeo da parede celular das bactérias, sendo estável na presença do suco gástrico. No entanto, a combinação de CLR e AMX com a FrMN pode matar as bactérias pelo mecanismo de ação dos antibióticos ou por um novo processo que pode aumentar a taxa de morte. A maior contribuição do nosso estudo é que a combinação da FrMN com um macrolídeo, um β -lactâmico e um inibidor de bomba de prótons pode resultar em sinergia e não em antagonismo.

Os estudos clínicos e com animais são necessários para estabelecer se a terapia com a FrMN em combinação com outro agente em determinadas situações clínicas, tais como gastrite crônica, úlcera péptica e neoplasias gástricas causadas por *H. pylori* pode ser benéfica, pois não se sabe se a extrapolação para um efeito *in vivo* é válida e a infecção por *H. pylori* apresenta um desafio terapêutico único.

A determinação da terapia ideal para tal infecção depende, em parte, das concentrações dos antimicrobianos no estômago. Após a entrada no estômago, o primeiro obstáculo para a biodisponibilidade dos antibióticos é a acidez do lúmen gástrico, o que nos seres humanos em uma mediana de 24 h, o pH intragástrico é de 1,4. Um bom exemplo disto é a CLR, um antibiótico ácido-lábel, que é degradado no lúmen principalmente através da ação do ácido e da pepsina. A sua meia-vida é inferior a 1 hora nessa circunstância, o que torna-se claro que o tratamento pela monoterapia é

relativamente ineficaz. Assim, o aumento do pH intragástrico pela co-administração de potentes inibidores da acidez gástrica evita significativamente a falha na erradicação (Wu *et al.*, 2012).

O omeprazol, utilizado neste estudo como inibidor da bomba de prótons, age em sinergia com os antibióticos, elevando o pH gástrico e perturbando o ambiente ácido ideal para o crescimento do *H. pylori* (Wu *et al.*, 2012; Shih *et al.*, 2012). A FrMN, quando testada individualmente, apresentou CIM de 125 µg/mL e quando combinada com o OMP passou para 62,5 µg/mL. Estes resultados sugerem que o pH do meio no ensaio foi alterado, deixando o *H. pylori* mais sensível aos efeitos do composto (FrMN).

A segunda barreira é a estrutura particular do muco gástrico. Para conseguir matar as bactérias presentes no estômago, é necessário que o fármaco atinja toda a superfície do estômago e penetre através da camada de muco do lúmen gástrico para a superfície epitelial (ou vice-versa); além disso, o antibiótico deve agir em concentrações mais elevadas por um tempo suficiente para matar as bactérias presentes de forma eficiente. Caso contrário, as bactérias em tais locais podem recolonizar o epitélio gástrico, resultando em falha na erradicação (Wu *et al.*, 2012).

Sendo assim, como os resultados destes testes indicam que a combinação de FrMN e a terapia tripla utilizada contra *H. pylori* tem um significado clínico favorável no tratamento de úlceras gástricas provocadas por *H. pylori*. Um mecanismo de ação plausível pode ser sugerido onde a FrMN potencializa a atividade da AMX e da CLR, dando origem a sinergismo.

Em linhas gerais, os extratos etanólicos de *P. torta* e *P. ramiflora*, a FrMN e a substância maitenina apresentaram resultados promissores com potencial antimicrobiano para serem incorporados em produtos que possam ser agregados no âmbito do Sistema de Saúde. Estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de

determinar outras atividades biológicas destes compostos e para que estes possam ser inseridos com segurança, eficácia e qualidade.

6. Conclusões

“Aqui, no entanto nós não olhamos para trás por muito tempo, nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. Siga em frente.”

Walt Disney

O estudo da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *P. torta* e *P. ramiflora*, FrMN e as substâncias isoladas maitenina e netzaucoieno, levou às seguintes conclusões:

- O extrato de *P. ramiflora* e a maitenina apresentaram potencial antifúngico *in vitro*, mostrando-se como fontes promissoras no desenvolvimento de novos agentes fitoterápicos para tratamento das micoses, causadas por *C. albicans*.

- A *P. ramiflora* foi mais ativa frente aos micro-organismos testados, sendo o único extrato com atividade contra *P. aeruginosa*;

- A maitenina e a FrMN, foram as que apresentaram as atividades mais promissoras contra bactérias Gram-positivas. Além disso, esta fração foi a única que apresentou atividade anti- *H. pylori*, e o componente bioativo parece ser a maitenina uma vez que o netzaucoieno puro não apresentou atividade frente a este micro-organismo.

- O netzaucoieno isolado de *Salacia campestris* não apresentou atividade contra os micro-organismos testados nas condições utilizadas neste estudo.

- Não foi possível elucidar se a atividade da FrMN anti-*H. pylori* foi devido a esta conter antimicrobianos mais potentes ou se os compostos antimicrobianos existentes atuaram sinergicamente;

- No ensaio *Checkerboard*, a FrMN apresentou um efeito sinérgico em todas as combinações avaliadas, indicando um significado clínico favorável no tratamento de úlceras gástricas associadas ao *H. pylori*;

- O ensaio *Time Kill* confirmou os resultados obtidos no ensaio de microdiluição, demonstrando que o tempo de morte pode variar dependendo da susceptibilidade do micro-organismo ao composto avaliado.

*7. Referências**

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (NBR 6023): informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ACAMOVIC, T.; BROOKER, D. Symposium on Plants as animal foods: a case of catch. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **Proc. Nutri. Soc.**, v. 64, p. 403-412. 2005.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa-CPAC – DF. 1998. 464 p.

ALVES, T. M.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S.; SMÂNIA, E.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

APG, An update of the angiosperms phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Bot. J. Linn. Soc.**, London, v. 141, p. 399-436, 2003.

ARAÚJO, M.G.F.; HILÁRIO, F.; NOGUEIRA, L.G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C. & BAUAB, T.M. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leothrix spiralis* and their antimicrobial activity. **Molecules**, v. 16, p. 10479-10490, 2011.

AVRELLA, D.; GOULART, L. S. Isolation of *Candida* spp of the oral mucus of patients submitted to the chemotherapeutical treatment. **RBAC**, v. 40, n. 3, p. 205-207, 2008.

BARROSO, G. M.; MORIM, M. P.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F. **Frutos e Sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 443 p.

BAVOVADA, R.; BLASKÓ, G.; SHIEH, H. L.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Spectral assignment and cytotoxicity of 22-hydroxytyingenone from *Glyptopetalum sclerocarpum*. **Planta Med.**, v. 56, n. 4, p. 380-382, 1990.

BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ANDORNO, N. Infectious diseases: a global challenge. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 296, n. 4-5, p. 179-185, 2006.

BERENBAUM, M. C. A method for testing synergy with any number of agents. **J. Infect. Dis.**, v. 137, p. 122-130, 1978.

BONATO, B. S.; CASTRO, F. F.; C., T. C.; HELENA, R. P. G. Oculares de microscópios podem ser veículos de contaminação? **News Lab**, v. 81, p. 98-104, 2007.

BOLETI, A. P.; FREIRE, M. D.; COELHO, M. B.; SILVA, W. D.; BALDASSO, P. A.; GOMES, V. M.; MARAGONI, S.; NOVELLO, J. C.; MACEDO, M. L. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **J. Agric Food Chem.**, v. 55, n. 7, p. 2653-2658, 2007.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **JANA**, v. 7, n. 2, p. 24 - 31, 2004.

CAMPANELLI, A. R.; D'ALAGNI, M.; MARINI-BETTOLO, G. B. Spectroscopic evidence for the interaction of tingenone with DNA. **FEBS Lett.**, v. 122, n. 2, p. 256-260, 1980.

CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth onion root-tip and rat bone marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n.1, p. 85-89, 2002.

CANTON, E.; VIUDES, A.; PEMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 18, p. 51-55, 2001.

CARVALHO, P. R. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant Quinonemethide Triterpenes from *Salacia campestri*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, p. 367-372, 2005.

CARVALHO-OKANO, M. R. 1992. **Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. emend. Mol. (Celastraceae) do Brasil extra-amazônico**. 253f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Vegetal) – Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas.

CASTILLO-JUAREZ, I.; GONZALEZA, V.; JAIME-AGUILARA, H.; MARTINEZA, G.; LINARESB, E.; BYEB, R.; ROMERO, I. Anti- *H.pylori* activity of plants used in Mexican traditional Medicine for gastrointestinal disorders. **J. Ethnopharmacol.**, v. 122, 402-405, 2009.

CHADWICK, D. J.; MARSH, J. **Bioactive compounds from plants**. New York, John Wiley: 1990.

CHE, C. T.; KOIKE, K.; CORDELL, G. A.; FONG, H. H. S.; DOBBERSTEIN, R. H. Triterpenes of *Pouteria torta* (Sapotaceae). **Planta Med.**, v. 43, n. 3, p. 420-421, 1980.

CHEN, T. C.; CHEN, Y. H.; CHEN, Y. C.; LU, P. L. Fluconazole exposure rather than clonal spreading is correlated with the emergence of *Candida glabrata* with cross-resistance to triazole antifungal agents. **Kaohsiung. J. Med. Sci.**, v. 28, n. 6, p. 306-315, 2012.

CHICELLA, M. F.; WOODRUFF, E. D.; DESAI, M. M. A review of *Candida* prophylaxis in the neonatal intensive care population. **J. Pediatr. Pharmacol. Ther.**, v. 16, n. 4, p. 237-245, 2011.

CHING, Y.W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **AAPS J**, v. 8, n° 2, p. 239-253, 2006.

CHUNG, P. Y. **Screening of Malaysian plants for antimicrobial activity and isolation and identification of antimicrobial compounds of *Callicarpa farinosa***. Master of Medical Science Thesis, University of Malaya, Lumpur Kuala Lumpur, Malaysia, 2004.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM. P.; CHUNG, L. Y. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.**, v. 9, p. 10-25, 2011.

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved

standard – 2 ed. CLSI document M45-A2, supplement M100- S16 v. 30, n. 18, Wayne, Pennsylvania, USA, 2010.

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved standard – 3 ed. CLSI document M27-A3, v. 28, n. 14, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline - CLSI document M27-A7, v. 26, n. 2, Wayne, Pennsylvania, USA, 2006.

COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L. B.; MIGUEL, O. G.; CUXICO, M. M.; RIBEIRO, M. L.; CAMARGO, E. R.; KUSSEN, G. M. B.; NOGUEIRA, K. S.; COSTA, L. M. D. Anti- *H.pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Braz. J. Microb.**, v. 41, p. 304-309, 2010.

CORSINO, J.; ALÉCIO, A. C.; RIBEIRO, M. L.; FURLAN, M.; PEREIRA, A. M.; DUARTE, I. B.; FRANÇA, S. C. Quantitative determination of maitenin and 22- β -hydroxymaitenin in callus of *Maytenus aquifolium* (celastraceae) by reverse phase high performance liquid chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 9, p. 245–247, 1998.

CORSINO, J.; CARVALHO, P.R.F.; KATO, M.J.; LATORRE, L.R.; OLIVEIRA, O.M.F.; ARAÚJO, A.R.; BOLZANI, V.S.; FRANÇA, S.C.; PEREIRA, A.M.S.; FURLAN, M. Biosynthesis of friedelane and quinonemethide triterpenoids is compartmentalized in *Maytenus aquifolium* and *Salacia campestris*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 741-748, 2000.

COSTA, P. M.; FERREIRA, P. M.; BOLZANI, V. DA S.; FURLAN, M.; DE FREITAS FORMENTON MACEDO DOS SANTOS, V. A.; CORSINO, J.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Antiproliferative activity of pristimerin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) in human HL-60 cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 22, n. 4, p. 854-863, 2008.

COUTO W. J.; BRANCO J. N. R.; ALMEIDA D.; CARVALHO A. C.; VICK R.; TELES C. A.; AGUIAR L. F.; BUFFOLO, E. Transplante cardíaco e infecção. **Revista Brasileira Cirurgia Cardiovascular**, v. 16(2), p. 141-51, 2001

CRESTANI, S.; RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M.; IACOMINI, M.; KASSUYA, C. A. L.; MARQUES, M. C. A.; SILVA-SANTOS, E. A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. **Vascul. Pharmacol.**, v. 51, p. 57–63, 2009.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 26, p. 343 – 356, 2005.

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

DALPONTE, J. C.; LIMA, E. S. Disponibilidade de frutos e a dieta da *Pseudalopex vetulus* (Carnívora – Canidae) em um cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Bot.**, v. 22, p. 326-332, 1999.

DARWISH, R. M.; ABURJAI, T. A. Antimicrobial activity of some medicinal plants against different *Candida* species. **Jordan J. Pharm. Sci.**, v. 4, p. 70-80, 2011.

DAVID, V. **Aplicação de técnicas cromatográficas na separação e determinação de triterpenos e hidrocarbonetos presentes nas flores, frutos e xilopódio de *Pouteria torta***. São Carlos, dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, 1993.

DRAGO, L.; VECCHI, E.; NICOLA, L.; GISMONDO, M. R. *In vitro* evaluation of antibiotics combinations for empirical therapy of suspected methicillin resistant *Staphylococcus aureus* severe respiratory infections. **BMC Infect. Dis.**, v. 111, p. 1-7, 2007.

DURIGAN, G.; BAITELLO, J. B.; FRANCO, G. A. D. C.; SIQUEIRA, M. F. **Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada**. São Paulo, Páginas & Letras: 2004. 475 p.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING JR, R. C. Antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. (Ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4th ed. Baltimore, Williams and Wilkins, Md: 1996, p. 330-396.

ELIOPOULOS, G. M.; ELIOPOULOS, C. T. Antibiotic combinations: should they be tested? **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 139-156, 1988.

ENE, I. V.; ADYA, A. K.; WEHMEIER, S.; BRAND, A. C.; MACCALLUM, D. M.; GOW, N. A.; BROWN, A. J. Host carbon sources modulate cell wall architecture, drug resistance and virulence in a fungal pathogen. **Cell Microbiol.**, 2012. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01813.x.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

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

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

GONÇALVES ESTEVES, V.; ESTEVES, R. L.; MELHEM, T. S. Contribuição ao conhecimento das espécies brasileiras de Hippocrateaceae Juss. **Publicações Avulsas do Museu Nacional, Rio de Janeiro**, v. 82, p. 1-22, 2000.

HAMBRAEUS, A. Lowbury lecture 2005: infection control from a global perspective. **J. Hosp. Infect.**, v. 64, n. 3, p. 217 - 223, 2006.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed.). **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana,. 1996, p.1436.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta. Pharmacol. Sin.**, v. 27, n. 1, p. 27-40, 2006.

HOPPE-TICHY T. Systemische Pilzerkrankungen: Klinik und antimykotische Therapie. **Pharm. Ztg.**, v. 142, p. 2161-2168, 1997.

HORN, R. C.; VARGAS, V. M. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the *Salmonella*/microsome assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 2, p. 113-118, 2003.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas**. São Carlos: EDUFSCAR, 2003.

HUGHES, C. C.; FENICAL, W. Antibacterials from the sea. **Chemistry**, v. 16, n. 42, p. 12512-12525, 2010.

ITOKAWA, H.; SHIROTA, O.; IKUTA, H.; MORITA, H.; AKEYA, K. T.; ITAKA, Y. Triterpenes from *Maytenus ilicefolia*. **Photochemistry**, v. 30, n. 11, p. 3713- 3716, 2001.

JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **J. Med. Plants. Res.**, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.

JARVIS, W. R.; MARTINE, W. J. Predominant pathogens in hospital infections. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 29, p. 19–24, 1992.

JELLER, A. H.; SILVA, D. H.; LIÃO, L. M.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 13, p. 1977-1982, 2004.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 93 – 100, 2004.

KATERERE, D. R.; GRAY, A. I.; NASH, R. J.; WAIGH, R. D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. **Phytochemistry**, v. 63, n. 1, p. 81-88, 2003.

KUMAR, S. N.; SIJI, J. V.; NAMBISAN, B.; MOHANDAS, C. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 2012. DOI: 10.1007/s11274-012-1124-0

LANGFIELD, R. D.; SCARANO, F. J.; HEITZMAN, M. E.; KONDO, M.; HMMOND, G. B.; NETO, C. C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 279 - 281, 2004.

LEEKHA, S.; TERRELL, C. L.; EDSON, R. S. General principles of antimicrobial therapy. **Mayo Clin. Proc.**, v. 86, n. 2, p. 156-167, 2011.

LEITE, J. P. V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G.; OLIVEIRA, A. B.; VILEGAS, J. H. Y.; VILEGAS, W.; PIZZA, C. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3796 – 3801, 2001.

LEÓN, L.; BELTRÁN, B.; MOUJIR, L. Antimicrobial activity of 6-oxophenolic triterpenoids. Mode of action against *Bacillus subtilis*. **Planta Med.**, v. 71, n. 4, p. 313-319, 2005.

LIMA, O. G.; COELHO, J. S.; WEIGERT, E.; D' ALBUQUERQUE, I. L.; LIMA, D. A.; MORAES E SOUZA, M. A. Antimicrobial substances from higher plants. XXXVI. On the presence of maytenin and pristimerine in the cortical part of the roots of *Maytenus ilicifolia* from the South of Brazil. **Rev. Inst. Antibiot.**, v. 11, p. 35–38, 1971.

LIVERMORE, D. M. Interplay of impermeability and chromosomal β -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p. 2046–2048, 1992.

LOEFFLER, J.; HAGMEYER, L.; HEBART, H.; HENKE, N.; SCHUMACHER, U.; EINSELE, H. Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in *Candida* species. **Clin. Chem.**, v. 46, n. 5, p. 631–635, 2000.

LOPEZ, K. S. E. **Estudo químico e atividade biológica de *Pouteria torta* (Mart.) Raldk (Sapotaceae)**. Dissertação (Mestrado)- Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, 2005.

LORENZÓN, E. N.; CESPEDES, G. F.; VICENTE, E. F.; NOGUEIRA, L. G.; BAUAB, T. M.; CASTRO, M. S.; CILLI, E. M. Effects of dimerization on the structure and biological activity of the antimicrobial peptide Ctx-Ha. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2012, doi:10.1128/AAC.06262-11.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa, Plantarum: 1992, p. 252.

LUTHER, J.; HIGGINS, P. D.; SCHOENFELD, P. S.; MOAYYEDI, P.; VAKIL, N.; CHEY, W. D. Empiric quadruple vs. triple therapy for primary treatment of *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis of efficacy and tolerability. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 105, n. 1, p. 65–73, 2010.

MA, F.; CHEN, Y.; LI, J.; QING, H. P.; WANG, J. D.; ZHANG, Y. L.; LONG, B. G.; BAI, Y. Screening test for anti-*Helicobacter pylori* activity of traditional Chinese herbal medicines. **World J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 44, p. 5629-5634, 2010.

MA, J.; YANG, H.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 19, p. 5873-5878, 2004.

MACDOUGALL, C.; POLK, R. E. Antimicrobial stewardship programs in health care systems. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 4, p. 638-656, 2005.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World J. Agric. Sci.**, v. 4, n. 5, p. 839-843, 2008.

MALLAVADHANI, U. V.; MAHAPATRA, A.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, n. 10, p. 1576-1579, 2004.

MARQUES, M. A.; CITRON, D. M.; WANG, C. C. Development of Tyrocidine A analogues with improved antibacterial activity. **Bioorg. Med. Chem.**, 15, n. 21, p. 6667-6677, 2007.

MANYI-LOH, C. E.; CLARKE, A. M.; NDIP, R. N. Detection of phytoconstituents in column fractions of n-hexane extract of goldcrest honey exhibiting anti-*Helicobacter pylori* activity. **Arch. Med. Res.**, v. 43, n. 3, p. 197-204, 2012.

MAZZOLIN, L. P.; NASSER, A.L.; MORAES, T. M.; SANTOS, R. C.; NISHIJIMA, C. M.; SANTOS, F. V.; VARANDA, E. A.; BAUAB, T. M.; DA ROCHA, L. R.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Qualea parviflora* Mart.: an integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorrhagic and mutagenic action. **J. Ethnopharmacol.**, v. 127, n. 2, p. 508-514, 2010.

MELO, A. M.; D'ALBUQUERQUE, I. L.; LACET, Y. Primeiras observações do uso tópico de primina, plumbagina e maitenina em pacientes com câncer de pele. **Rev. Inst. Antibiot.**, v. 14, p. 9-16, 1974.

MENDONZA, L.; WILKENS, M.; URZÚA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavanoids isolated from some *Chillean Pseudognaphalium* (Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 58, p. 85-88, 1997.

MICELI, N.; TROVATO, A.; MARINO, A.; BELLINGHIERI, V.; MELCHINI, A.; DUGO, P.; CACCIOLA, F.; DONATO, P.; MONDELLO, L.; GÜVENÇ, A.; DE PASQUALE, R.; TAVIANO, M. F. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. **Food Chem. Toxicol.**, v. 49, n. 10, p. 2600 – 2608, 2011.

MILWARD DE AZEVEDO, M. A.; VALENTE, M. C.; MARQUETE, R. Hippocrateaceae da mata de encosta do jardim botânico do Rio de Janeiro e arredores, Rio de Janeiro, RJ. **Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro**, v. 64, n. 1, p. 3-10, 2006.

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2º ed., Ed. Manole Ltda, p 580, 2002.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D. L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MARSAULT, E.; BOUARAB, K.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 67, p. 559- 68, 2012.

MOHAMMED, M. J.; AL-BAYATI, F. A. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Thymus kotschyanus* aerial parts and *Dianthus caryophyllus* flower buds. **Phytomedicine**, v. 16, p. 632–637, 2009.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65, p. 171-175, 2002.

MORAIS, S. M.; BRAZ-FILHO, R. **Produtos naturais:** estudos químicos e biológicos. Fortaleza: EdUECE, 2007.

MOSSI, A. J.; MAZUTTI, M.; PAROU, L. N.; CORAZZA, M. L.; DARIVA, C.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. **Braz. J. Biol.**, v. 69, n. 2, p. 339-345, 2009.

MOUJIR, L.; GUTIÉRREZ-NAVARRO, A. M.; GONZÁLEZ, A. G.; RAVELO, A. G.; LUIS, J. G. Mode of action of netzahualcoyone. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 35, n. 1, p. 211-213, 2001.

NCCLS- *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: Approved guideline M26-A. Wayne, Pennsylvania, USA, 1999

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*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 2720 - 2722, 2002.

PAZ, T.A.; INÁCIO, M.C.; PEREIRA, A.M.S.; FRANÇA, S.C.; FURLAN, M. Produção de triterpenos quinonametídeos em raízes obtidas *in vitro* de *Salacia campestris* Walp. **34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2011.

PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M. C.; MUÑOZ, J. D.; CRUAÑES, J.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, p. 37 - 40, 2001.

PENNINGTON, T. D. **Flora Neotropica:** Sapotaceae. New York, The New York Botanical Garden, 1990, 770 p.

PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; LÓPEZ, K. S. E.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, n. 3, p. 183-186, 2005.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C. **Antimicrobial combinations. Antibiotics in laboratory medicine.** New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005, p. 365–400.

RAHAL, J. J. Antibiotic combinations: the clinical relevance of synergy and antagonism. **Medicine**, v. 57, p. 179-195, 1978.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon.**, v. 39, n. 5, 603-613, 2001.

ROMAN, R. M. Valor prognóstico da mieloperoxidase na doença arterial coronariana. 2006. 82 f. **Tese** (Mestrado em Cardiologia e Ciências cardiovasculares) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

RODRIGUES-FO, E.; BARROS, F. A. P.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. Studies towards the detection and identification of sesquiterpene pyridine alkaloids in *Peritassa campestris* by mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 185-193, 2001.

ROY, S.; KIRANMAYER, R.; BHUVANESWARI, C.; GIRI, A.; MANGAMOORI, L. N. Phytochemical analysis of *A. paniculata* extract and its antimicrobial activity. **World J. Microb. Biotech**, v. 26, p. 85-91, 2010.

ROZZA, A. L.; MORAES, T. M.; KUSHIMA, H.; TANIMATO, A.; MARQUES, M. O. M.; BAUAB, T. M.; HIRUMA-LIMA, C. A.; PELLIZZON, C. H. Gastroprotective mechanisms of *Citrus lemon* essential oil and its majority compounds limonene and β -pinene: Involvement of heat-shock proteins-70, vasoactive intestinal peptide, glutathione, sulphhydryl compounds, nitric oxide and prostaglandin E_2 . **Chem. Biol. Interact.**, v. 189, n. 1-2, p. 82-89, 2011.

SADER, H. S.; MENDES, R. E.; GALES, A. C.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias

isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. **J. Pneumol.**, v. 27, p. 59-67, 2001.

SAINI, V.; OLDE RIEKERINK, R. G. M.; MCCLURE, J. T.; BARKEMA, H. W. Diagnostic accuracy assessment of sensititre and agar disk diffusion for determining antimicrobial resistance profiles of bovine clinical mastitis pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 1568-1577, 2011.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y. S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Nat. Prod. Rep.**, v. 27, p. 238–254, 2010.

SANTANA, D. G.; DE RANAL, M. A.; OLIVEIRA, M. C. Despolpamento e reguladores de crescimento na emergência de plântulas de duas espécies do gênero *Pouteria*. In: SIMPÓSIO NACIONAL CERRADO, 9, SIMPÓSIO INTERNACIONAL SAVANAS TROPICAIS, 2. **Anais**. Brasília, DF: Embrapa-Cerrados, 2008.

SANTOS, R. C.; KUSHIMA, H.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; ROCHA, L. R. M.; BAUAB, T. M.; TAMASHIRO, J.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. *B. intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **J. Ethnopharmacol.**, v. 140, p.230-12, 2012.

SANTOS, V. A. F. F. M.; SANTOS, D. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; ZANONI, M. V. B.; FURLAN, M. Evaluation of antioxidant capacity and synergistic associations of quinonemethide triterpenes and phenolic substances from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Molecules**, v.15, p. 6956-6973, 2010.

SANTOS OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, n. 2B, p. 650-659, 2009.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*)**

(**Asteraceae**). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre: Ed. da UFRG, 2003.

SILVA, C. G.; RECIO, R. A.; OLIVEIRA, A. B. DE; PAIVA, R. L. R. Coleta e avaliação da qualidade fitoquímica de *Maytenus ilicifolia* M. (espíndula-santa). **Trib. Farm.**, v. 57/59, p. 46-50, 1991.

SILVA, J. C. B.; RESCK, I. S.; PAULA, J. E.; SANTOS, M. L.; SILVEIRA, D. Obtenção de fração flavonoídica do extrato etanólico de *Pouteria torta*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNB, 12. , CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO DF, 3., **Livro de Resumos**. Brasília: Universidade de Brasília. 2006.

SOUZA, P. M.; SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. **Planta. Med.**, v. 78, n. 4, p. 393-399, 2012.

SUEKE, H.; KAYE, S. B.; NEAL, T.; HALL, A.; TUFT, S.; PARRY, C. M. An *in vitro* investigation of synergy or antagonism between antimicrobial combinations against isolates from bacterial keratitis. **Immunol. Microbiol.**, v. 51, n. 8, p. 4151 – 4155, 2010.

TAM, V. H.; NIKOLAOU, M. A novel approach to pharmacodynamic assessment of antimicrobial agents: new insights to dosing regimen design. **Plos. Comput. Biol.**, v. 7, n. 1, p. , 2011.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

TROILLET, N.; SAMORE, M. H.; CARMELI, Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 1094-1098, 1997.

VELLOSA, J. C. R.; KHALIL, N. M.; FORMENTON, V. A. F.; XIMENES, V. F.; FONSECA, L. M.; FURLAN, M.; BRUNETTI, I. L.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. **Fitoterapia**, v. 77, p. 243–244, 2006.

VIEIRA, R.F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: JANICK, J. (Ed.). **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria, VA: ASHS Press, 1999. p.152-159.

WECKWERTH, P. H.; CARNIETTO, C.; WECKWERTH, A. C.; DUARTE, M. A.; KUGA, M. C.; VIVAN, R. R. *In vitro* susceptibility of oral *Candida albicans* strains to different pH levels and calcium hydroxide saturated aqueous solution. **Braz. Dent. J.**, v. 23, n. 3, p. 192-198, 2012.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the *Peruvian rainforest* with a particular emphasis on Una de Gato and Sangre de Grado. **Altern. Med. Rev.**, v. 6, n. 6, p. 567-579, 2001.

WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2002, p.1114.

WU, W.; YANG, Y.; SUN, G. Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. **Gastroenterol. Res. Pract.**, v. 2012, p. 1-8, 2012. Article ID 723183. DOI: 10.1155/2012/723.

YAMAGUCHI, N.; SATOH-YAMAGUCHI, K.; ONO, M. *In vitro* evaluation of antibacterial, anticollagenase, and antioxidant activities of hop components (*Humulus lupulus*) addressing acne vulgaris. **Phytomedicine.**, v. 16, n. 4, p. 369-376, 2009.

ZAMBOLIM, L.; VENÂNCIO, W. S.; OLIVEIRA, S. H. Manejo de resistência de fungos a fungicidas. Viçosa: Ed. UFV, 2007.

Anexos

ANEXO I

Ensaio de atividade antimicrobiana:

Soluções e meios de cultura:

Agar Müller-Hinton

- Infusão de carne.....2,0 g
- Hidrolisado de caseína.....17,5 g
- Amido.....1,5 g
- Agar..... 13,0 g

Caldo Müller-Hinton

- Infusão de carne.....2,0 g
- Hidrolisado de caseína.....17,5 g
- Amido.....1,5 g

Preparo:

Após o processo de pesagem de 34 g do pó, adicionar o conteúdo em um béquer contendo 1 L de água destilada e homogeneizar. Acertar o pH para 7,4 e esterilizar por autoclavagem à 121°C durante 20 minutos.

PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

- NaCl.....8,0 g
- Na₂HPO₄.....1,1580g
- KH₂PO₄.....6,0 g
- Água destilada.....1000mL

O pH foi ajustado a 7,0.

Autoclavar (121°C, 15 minutos).

Caldo Sabouraud

- Peptona Micológica.....10,0 g
- Glicose..... 40,0 g

Preparo:

Após o processo de pesagem de 65 g do pó, adicionar o conteúdo em um béquer contendo 1 litro de água destilada, mexer e adicionar o meio ao fogo. Deixar a mistura entrar em ebulição para dissolver completamente. Esterilizar por autoclavagem à 121°C durante 15 minutos.

Meio RPMI 1640- Roswell Park Memorial Institute

Composição:			
Constituinte	g/L de água	Constituinte	g/L de água
L-arginina (base livre)	0,200	Biotina	0,0002
L-asparagina (anidra)	0,050	D-pantotênico	0,00025
L-aspártico, ácido	0,020	Colina, cloreto de	0,003
L-cistina- 2HCl	0,0652	Fólico, ácido	0,001
L-glutâmina, ácido	0,020	Mioinositol	0,035
L-glutâmina	0,030	Niaciamida	0,001
Glicina	0,010	PABA	0,001
L-histidina (base livre)	0,015	Piridoxina HCl	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B ₁₂	0,000005
L-lisina-HCl	0,040	Nitrato de cálcio x H ₂ O	0,100
L-metionina	0,015	Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio anidro	0,04884
L-treonina	0,020	glicose	2,000
L-triptofano	0,005	Glutathione, reduzida	0,001
L-tirosina-2Na	0,02883	Vermelho de fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		

Preparo:

- Meio RPMI 1640.....10,4 g
- Tampão MOPS.....35,4 g
- Glicose.....19,0 g

- Água Milli-Q.....1000 mL

Após o processo de pesagem dos materiais, dissolver o meio em pó em 900 mL de água. Acrescentar MOPS (concentração final de 0,165 mol/L), agitando até dissolver. Enquanto mexer, ajustar o pH para 7,0 a 25°C utilizando hidróxido de sódio 1 mol/L. Acrescentar água adicional para completar o volume final de 1 L. Esterilizar por filtração e armazenar a 4°C até o uso.