

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

The logo of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a person's face in profile, looking to the right. The face is surrounded by a green laurel wreath. Above the wreath, there are three pink flowers and a cluster of red berries. A yellow star is positioned to the right of the face. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written in a semi-circle at the top, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written in a semi-circle at the bottom.

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS ESPÉCIES  
*Paullinia cupana* Kunth. e *Ptychopetalum olacoides* Benth.

PRISCILA MOREIRA PINTO

MANAUS / AMAZONAS  
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRISCILA MOREIRA PINTO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS ESPÉCIES  
*Paullinia cupana* Kunth. e *Ptychopetalum olacoides* Benth.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira  
Co-orientador: Prof Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

MANAUS / AMAZONAS  
2012

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

P659a Pinto, Priscila Moreira

Atividade antibacteriana das espécies *Paullinia cupana* Kunth.e  
*Ptychopetalum olacoides* Benth./Priscila Moreira Pinto .- Manaus:  
UFAM, 2012.

132f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade  
Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>, Dr.<sup>a</sup>. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira

Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Valdir Florêncio da Veiga Júnior

1. Plantas medicinais- guaraná 2. Plantas medicinais-  
marapuama 3. Propriedades medicinais- guaraná e marapuama. I.  
Nogueira, Patrícia Puccinelli Orlandi (Orient.) II. Veiga Júnior, Valdir  
Florêncio da (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV.  
Título

CDU (1997) 633.88(811.3)(043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRISCILA MOREIRA PINTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em 25 de janeiro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira, Presidente  
Fundação Osvaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane

Prof Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup> Dra. Cecília Verônica Nunez, Membro  
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

## DEDICATÓRIA

Em memória ao meu papai *Carlos José Pinto*,  
O melhor pai do mundo.

## **AGRADECIMENTOS**

*Nada na vida conquistamos sozinhos, sempre precisamos de DEUS e de amigos ao qual Deus nos permite. AGRADEÇO:*

*A minha orientadora prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> **PATRÍCIA PUCCINELLI ORLANDI NOGUEIRA** meus agradecimento pelas orientações valorosas e paciência.*

*Ao meu co-orientador prof Dr. **VALDIR FLORÊNCIO DA VEIGA JÚNIOR** e meus agradecimentos pelas orientações valorosas e paciência.*

*Ao professor **PAULO NOGUEIRA** pelas orientações indispensáveis para a conclusão deste trabalho.*

*À minha família querida, pais: **CARLOS JOSÉ PINTO** e **VERA LÚCIA TAVARES MOREIRA**, pela amizade, dedicação e amor, aos meus Avós: Odete Moreira e João Moreira, e irmãos: Daniel Santos e Betânia Moreira.*

*Aos amigos da Fiocruz: **ANDRÉ MARIÚBA**, **IVANILDES DOS SANTOS**, **LEIDIANE AMORIM**, Yuri Chaves, Paula Taquita, Edilena Martins, Maria Carolina, Luciana Sousa e Janaina pelo incentivo, apoio e pela alegria.*

*Aos amigos do Q-Bioma: **ANDRÉ LUIS RUDIGER**, **FABIANO DE SOUSA VARGAS**, Milena Campelo Freitas de Lima, Priscilla de Azevedo Oliveira, Joelma Moreira Alcântara, Lidiam Maia Leandro, Danielle Cardoso, Lamark Pereira, Iuri Bezerra de Barros, Dayana Lacerda Custódio, Igor Medeiros de Assis, Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi e*

*Paula Cristina Souza Barbosa, que contribuíram incondicionalmente para que este trabalho fosse realizado e pelos momentos preciosos compartilhados.*

*Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado durante o mestrado: Joquebede Chaves, Maclaine Freitas, Andréa Drummond, Elaine Lopes, Silvia Rosane, Ana Karla Lima, Claudia Comandolli-Wyrepkowski, Nayanne Cristina, Kemilla Rebelo e Vanessa Neves.*

*Aos membros da banca do Exame de Qualificação, Dra Luciana Leomil, Dra. Maria Cristina e Dr. Paulo Nogueira, por terem aceitado participar da avaliação deste trabalho. As muitas sugestões, exemplos e críticas foram fundamentais à reelaboração e aprimoramento da abordagem deste trabalho.*

*Aos membros da Banca Examinadora de Defesa da Dissertação, **DR. WUELTON MARCELO MONTEIRO, DRA. PATRÍCIA PUCCINELLI ORLANDI NOGUEIRA e DRA. CECÍLIA VERÔNICA NUNEZ** pela participação na avaliação deste trabalho e às contribuições oferecidas.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas: Prof. Dr. **EDMAR DE ANDRADE**, Prof. Dr. **ODAIR PEREIRA**, **NUBIANE TRUYCY, ELZIMAR BRAGA e JOELMA DA SILVA**, pela oportunidade, apoio e amizade.*

*À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro concedido por meio de uma bolsa de estudo.*

*À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ-AMAZONAS) pela oportunidade concedida.*

## RESUMO

Os constantes casos de infecções por bactérias refratárias aos antimicrobianos demonstram os riscos evolutivos envolvidos no processo de resistência. Desta forma, faz-se premente a busca por novos medicamentos e estratégias que venham minimizar esta problemática. *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) e *Ptychopetalum olacoides* (marapuama) são espécies vegetais endêmicas e cultivadas na região amazônica, com disponibilidade de matéria prima para a obtenção de produtos biotecnológicos. Estas espécies são utilizadas na medicina popular como antibacteriano, com relatos na literatura científica que corroboram esta atividade. O presente trabalho teve como finalidade obter uma fração bioativa a partir dos extratos do guaraná e da marapuama, com maior potencial, vislumbrando a obtenção de um produto biotecnológico. Para alcançar este objetivo o material em pó de *Paullinia cupana* variedade *sorbilis* [(Mart.) Ducke] e *Ptychopetalum olacoides* provenientes do município de Maués/Amazonas foram submetidas à extração exaustiva utilizando sistemas com diferentes solventes, obtendo-se os extratos: aquoso, hidroalcoólico, metanólico, etanólico, em acetato de etila e hexânico. Todos os extratos foram submetidos ao método de difusão em Agar, com o objetivo de determinar a atividade contra treze linhagens bacterianas. Os extratos bioativos mais promissores, hidroalcoólico do guaraná e em acetato de etila da marapuama, foram monitorizados por bioautografia. Os extratos do guaraná foram submetidos à técnica de microdiluição em caldo com a finalidade de determinar seu potencial. Após estes ensaios, o extrato hidroalcoólico do guaraná foi selecionado, os critérios utilizados foram: potencial antimicrobiano, maior espectro de ação e maior rendimento. O extrato hidroalcoólico foi semi-purificado por cromatografia em placa de alumínio, obtendo-se uma fração bioativa com concentrações inibitórias de 1,25 mg/mL para o *S. aureus* sensível a meticilina (extrato 3,12 mg/mL), 0,65 mg/mL para o *S. aureus* resistente a meticilina (extrato: ausência de atividade), 1,04 mg/mL para o *B. cereus* (extrato: 1,56 mg/mL) e 0,65 mg/mL para a *C. violaceum* (extrato: 6,25 mg/mL). Conclui-se que a fração bioativa apresentou maior potencial antibacteriano, podendo-se vislumbrar o desenvolvimento de um novo produto biotecnológico.

**Palavras Chave:** *Paullinia cupana*, guaraná, *Ptychopetalum olacoides*, marapuama, antibacteriana, semi-purificação.



## ABSTRACTS

The constant cases of bacterial infections refractory to medication protocols demonstrate the risks involved in rolling resistance. Thus, it is urgent to search for new antimicrobial agents and strategies that will minimize this problem. *Paullinia cupana* Kunth (guarana) and *Ptychopetalum olacoides* (marapuama) and endemic plant species are grown in the Amazon region, with availability of raw material for the production of biotechnological products. These species are used in folk medicine as antibacterial, with reports in the scientific literature supporting this activity. This study aimed to obtain a bioactive fraction from extracts of guarana and muirapuama, with the greatest potential, seeing the attainment of a biotech product. To achieve this the material powder *Paullinia cupana* sorbilis variety [(Mart.) Ducke] and *Ptychopetalum olacoides* from the municipality of Maués/Amazonas were subjected to exhaustive extraction using different solvent systems, yielding extracts: aqueous, hydroalcoholic, methanol, ethanol, ethyl acetate and hexane. All extracts were subjected to agar diffusion method, in order to determine the activity against thirteen bacterial strains. The most promising bioactive extracts, guarana hydroalcoholic and ethyl acetate extract of muirapuama were monitored by bioautography. The extracts of guarana underwent microdilution technique in order to determine its potential. After these tests, the hydroalcoholic extract of guarana has been selected, the criteria used were: potential antimicrobial spectrum of activity higher and higher throughput. The hydroalcoholic extract was semi-purified by chromatography on aluminum plate, obtaining a bioactive fraction with inhibitory concentrations of 1.25 mg/mL for *S. aureus* methicillin-sensitive extract (3.12 mg/mL), 0.65 mg/mL for *S. aureus* resistant to methicillin (extract: no activity), 1.04 mg/mL for *B. cereus* (extract: 1.56 mg/mL) and 0.65 mg/mL for *C. violaceum* (extract: 6.25 mg/mL). It follows that the bioactive fraction had a higher antimicrobial activity and can be envision the development of new biotechnological products.

**Keywords:** *Paullinia cupana*, guarana, *Ptychopetalum olacoides*, muirapuama, antibacterial, semi-purification.

# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

INTRODUÇÃO

JUSTIFICATIVA

<b>1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>20</b>
<b>1.1. Plantas medicinais</b>	<b>20</b>
1.1.1. Plantas medicinais e a fitoterapia	25
1.1.1.1. Espécie vegetal <i>Paullinia cupana</i> Kunth	27
1.1.1.2. Espécie vegetal <i>Ptychopetalum olacoides</i> Benth	31
<b>1.2. Doenças infecciosas, micro-organismos e antimicrobianos</b>	<b>34</b>
<b>1.2.1. Micro-organismo: bactérias Gram-positivas</b>	<b>36</b>
1.2.1.1. Cocos Gram-positivos	38
1.2.1.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	38
1.2.1.1.2 <i>Streptococcus mutans</i>	39
1.2.1.2 Bacilos Gram-positivos	40
1.2.1.2.1 <i>Bacillus cereus</i>	40
1.2.1.2.2 <i>Bacillus licheniformes</i>	41
<b>1.2.2 Micro-organismo: bactérias Gram-negativas</b>	<b>41</b>
1.2.2.1 Bacilos Gram-negativos fermentadores da glicose	43
1.2.2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	44
1.2.2.1.2 <i>Salmonella entérica</i> subespécie <i>arizonae</i>	45
1.2.2.1.3 <i>Shigella spp.</i>	45
1.2.2.2 Bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose	46
1.2.2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46
1.2.2.3 Cocobacilo Gram-negativo	47
1.2.2.3.1 <i>Chromobacterium violaceum</i>	47

<b>1.3 Metodologias do estudo da atividade antimicrobiana</b>	<b>47</b>
1.3.1 Método de difusão em Agar	48
1.3.2 Método de bioautografia	49
1.3.3 Método de diluição em caldo	50
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>51</b>
2.1 Objetivo geral	51
2.2 Objetivos específicos	51
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>52</b>
3.1 Material vegetal	52
3.1.1 Extração do material vegetal	52
3.1.2 Cálculo do rendimento obtido com a extração	58
3.1.3 Soluções extrativas	58
3.2 Avaliação da atividade antibacteriana	59
3.2.1 Materiais	59
3.2.2 Amostras bacterianas testadas	62
3.2.3 Padronizações	62
3.3 Método de difusão em Agar	63
3.3.1 Técnica de difusão em Poço	64
3.3.1.1 Técnica de difusão em disco	67
3.3.3 Técnica de bioautografia	70
3.3.4 Técnica de cromatografia – semipurificação	73
3.3.5 Técnica de microdiluição em caldo	74
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>76</b>
4.1 <b>Estudo preliminar de técnicas de rastreio da atividade antibacteriana</b>	<b>77</b>
4.1.1 Resultados	78
4.1.2 Discussão	80
4.2 <b>Espécie <i>Ptychopetalum olacoides</i></b>	<b>81</b>
4.2.1 Resultados	82
4.2.1.1 Rendimento	82
4.2.1.2 Atividade antibacteriana	82
4.2.1.3 Bioautografia	85
4.2.2 Discussão	86
4.2.2.1 Rendimento	86

4.2.2.2	Atividade antibacteriana	87
4.2.2.3	Bioautografia	89
4.3	<b>Espécie <i>Paullinia cupana</i></b>	<b>90</b>
4.3.1	Resultados	91
4.3.1.1	Rendimento	91
4.3.1.2	Atividade antibacteriana	92
4.3.1.3	Perfil cromatográfico e semipurificação da fração bioativa	94
4.3.1.4	Concentração inibitória mínima	98
4.3.2	Discussão	103
4.3.2.1	Rendimentos	103
4.3.2.2	Atividade antibacteriana	103
4.3.2.3	Bioautografia	106
4.3.2.4	Concentração inibitória mínima do extrato	106
4.3.2.5	Concentração inibitória mínima da fração	109
5.	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>112</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Mapa de biomas do Brasil de 2004 **21**
- FIGURA 2.** Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas **24**
- FIGURA 3.** Espécie vegetal *Paullinia cupana*. (1) folhas; (2) cacho; (3) sementes do guaraná **29**
- FIGURA 4.** Estrutura química da metilxantina: (1) cafeína; (2) teobromina; (3) teofilina **30**
- FIGURA 5.** Espécie vegetal *Ptychopetalum olacoides*. (1) folhas, galhos e tronco; (2) folhas e flores **33**
- FIGURA 6.** Diterpenos do tipo clerodano: (1) 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diidroxianoneno e (2) 7 $\alpha$ ,20-diidroxianoneno, descritos por apresentarem potencial atividade sobre células do sistema nervoso central **34**
- FIGURA 7.** Parede celular de bactérias Gram-positivas **37**
- FIGURA 8.** Bactérias Gram-positivas: (1) *Staphylococcus aureus*; (2) *Streptococcus ssp.*; (3) *Bacillus cereus* **38**
- FIGURA 9.** Parede celular de bactérias Gram-negativas **42**
- FIGURA 10.** Bactérias Gram-negativas: (1) *Escherichia coli*; (2) *Pseudomonas aeruginosa*; (3) *Chromobacterium violaceum* **43**
- FIGURA 11.** Perfil cromatográfico do extrato em acetato de etila da marapuama utilizando como revelador químico: (A<sub>1</sub>) FeCl<sub>3</sub>; (A<sub>2</sub>) Dragendorff; (A<sub>3</sub>): UV 365 nm; (A<sub>4</sub>) vanilina sulfúrica; (A<sub>5</sub>) Controle negativo com metanol; (A<sub>6</sub>) Extrato em acetato de etila frente ao *S. aureus* revelado com cloreto de trifeniltetrazólio. **86**
- FIGURA 12.** Perfil cromatográfico das amostras biativas do guaraná. (A) Luz ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm. (B) Vanilina / ácido sulfúrico. **94**
- FIGURA 13.** (A<sub>1</sub>) Extrato hidroalcoólico relevado com solução etanólica de FeCl<sub>3</sub>; (A<sub>2</sub>) Padrão de catequina relevado com solução etanólica de FeCl<sub>3</sub>; (A<sub>3</sub>) Padrão de epicatequina relevado com solução etanólica de FeCl<sub>3</sub> **95**
- FIGURA 14.** (A<sub>1</sub>) Extrato hidroalcoólico revelado com Dragendorff; (A<sub>2</sub>) Padrão de **95**

caféina revelado com Dragendorf.

- FIGURA 15.** Conjunto de placas eluídas em conjunto com a finalidade de monitorar a atividade antibacteriana. (A<sub>1</sub>) Extrato hidroalcoólico revelado com luz ultravioleta a 365 nm; (A<sub>2</sub>) Extrato hidroalcoólico revelado com vanilina sulfúrica; (A<sub>3</sub>) Controle negativo com metanol; (A<sub>4</sub>) Extrato hidroalcoólico frente ao *S. aureus* revelado com cloreto de trifeniltetrazólio. **96**
- FIGURA 16.** Extrato hidroalcoólico eluído pelo sistema diclorometano:etanol (40:60). A<sub>1</sub>: revelada em luz ultravioleta. A<sub>2</sub>: revelada com revelador biológico (cloreto de trifeniltetrazólio): frente ao *S. aureus* MRSA **97**
- FIGURA 17.** Placa de microdiluição demonstrando a ação antibacterina da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná (CIM: 1,25 mg/mL) e da vancomicina (CIM: 0,0039 mg/mL) frente ao *S. aureus* MSSA. **101**
- FIGURA 18.** Placa de microdiluição demonstrando a ação antibacterina da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná (CIM: 0,625 mg/mL) e da vancomicina (CIM: 0,0026 mg/mL) frente ao *S. aureus* MRSA **101**
- FIGURA 19.** Placa de microdiluição demonstrando a ação antibacterina da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná (CIM: 0,625 mg/mL) e da vancomicina (CIM: 0,250 mg/mL) frente à *C. violaceum*. **102**
- FIGURA 20.** Placa de microdiluição demonstrando a ação antibacteriana da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná (CIM de 1,04 mg/mL) e da vancomicina (CIM de 0,0039 mg/mL) frente ao *B. cereus*. **102**

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b>	Preparo do meio Agar Mueller Hinton (MH)	<b>60</b>
<b>TABELA 2.</b>	Preparo do caldo Luria Bertani Broth, Miller (LLB)	<b>60</b>
<b>TABELA 3.</b>	Preparo do meio definitivo bacteriano	<b>60</b>
<b>TABELA 4.</b>	Comparação entre técnicas de triagem da atividade antibacteriana, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	<b>79</b>
<b>TABELA 5.</b>	Atividade antibacteriana dos extratos: aquoso, metanólico, etanólico, acetato de etila e hexânico da marapuama, frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	<b>84</b>
<b>TABELA 6.</b>	Atividade antibacteriana dos extratos: aquoso, metanólico, etanólico, acetato de etila e hexânico do guaraná, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas	<b>93</b>
<b>TABELA 7.</b>	Média e desvio padrão das concentrações inibitória mínima dos extratos: em acetato de etila, hidroalcoólico, aquoso, metanólico e etanólico do guaraná, frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	<b>99</b>
<b>TABELA 8.</b>	Média e desvio padrão das concentrações inibitória mínima da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná e do controle frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	<b>100</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>ESQUEMA 1.</b>	Organograma da extração seqüencial do material vegetal	<b>56</b>
<b>ESQUEMA 2.</b>	Organograma da extração seqüencial do resíduo hexânico	<b>57</b>
<b>ESQUEMA 3.</b>	Esquema geral dos ensaios	<b>61</b>
<b>ESQUEMA 4.</b>	Dupla camada de Agar MH. Adição da solução do extrato no poço confeccionado na segunda camada de Agar (inoculado com a suspensão bacteriana)	<b>65</b>
<b>ESQUEMA 5.</b>	Método de difusão em Agar – técnica do poço	<b>66</b>
<b>ESQUEMA 6.</b>	Método de difusão em Agar – técnica do disco	<b>69</b>
<b>ESQUEMA 7.</b>	Esquema ilustrativo do método de bioautografia, no qual o meio de cultura inoculado é vertido sobre uma cromatoplaca eluída com o composto químico de interesse.	<b>72</b>
<b>ESQUEMA 8.</b>	Organograma dos métodos para a semi-purificação dos extratos selecionados	<b>73</b>



## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1.** Rendimento dos extratos aquoso, hidroalcoólico, etanólico, hexânico, em acetato de etila e metanólico da marapuama **82**
- GRÁFICO 2.** Rendimento dos extratos aquoso, hidroalcoólico, etanólico, hexânico, em acetato de etila e metanólico do guaraná **91**
- GRÁFICO 3.** Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos frente às linhagens testes Gram-positivas e Gram-negativas **108**
- GRÁFICO 4.** Comparação entre a CIM do extrato hidroalcoólico do guaraná e sua fração bioativa frente às linhagens testes Gram-positivas e Gram-negativas. **109**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACOET</b>	Extrato em acetato de etila
<b>AQ</b>	Extrato aquoso
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CCD</b>	Cromatografia em camada delgada
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CBM</b>	Concentração bacteriostática
<b>CTT</b>	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
<b>DL<sub>50</sub></b>	Toxicidade média (dose letal que conduz a morte de 50% da espécie animal em avaliação).
<b>DMSO</b>	Dimetil-sulfóxido
<b>ET</b>	Extrato etanólico
<b>HA</b>	Extrato hidroalcoólico
<b>MET</b>	Extrato metanólico
<b>MH</b>	Müller-Hinton
<b>MI</b>	Mililitro
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
<b>UV</b>	Luz Ultravioleta
<b>µg/mL</b>	Micrograma por mililitro
<b>µL</b>	Micro litro

## INTRODUÇÃO

A produção de fitoterápicos a partir de frações bioativas de extratos é altamente viável, pois é de simples padronização, fácil obtenção, menor custo e possui menor probabilidade de propiciar reações adversas. Neste contexto, podem-se citar exemplos de fitoterápicos elaborados a partir das espécies *Ginkgo biloba* e do *Echinacea herba*, que são comercializados na forma de frações semipurificadas obtidas em conformidade com uma padronização, na qual são conhecidas as principais substâncias químicas presentes (CALIXTO; YUNES, 2001; SCHULZ *et al.*, 2002; WAGNER; BLADT, 2006).

Segundo Schenkel *et al.* (2004) a obtenção de frações, contendo substâncias que, em conjunto, participam da ação terapêutica em concentração mais elevada, demonstra uma nova tendência de estratégia na produção de matérias-primas e produtos fitoterápicos, com maior valor tecnológico agregado e constância da qualidade.

Muitos dos fármacos utilizados no tratamento de doenças infecciosas inicialmente foram isolados a partir de plantas. É estimado que aproximadamente 25 % dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir desta fonte (COE; ANDERSON, 2006; CALIXTO *et al.*, 2001).

Dentre os fatores que fazem do reino vegetal o alvo para isolamento de metabólitos com ação farmacológica pode-se inferir, a sua quimiodiversidade (BASSO *et al.*, 2005). Sendo importante ressaltar que, das quinhentas mil espécies de plantas existentes, apenas 5 % já foram estudadas (VERPOORTE, 1998; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; CARNEIRO *et al.*, 2008).

As espécies *Paullinia cupana* e *Ptychopetalum olacoides* conhecidas popularmente como guaraná e marapuama, respectivamente, são encontradas na Região Amazônica e conhecidas por suas propriedades medicinais, atuando em diferentes quadros clínicos. O guaraná é utilizado na medicina tradicional como estimulante do sistema nervoso, adstringente e no tratamento de diarreia crônica. Já o marapuama é utilizado como energético, afrodisíaco e antibacteriano (BASILE *et al.*, 2005; ALONSO, 2007).

Poucos são os estudos que se propõem avaliar a atividade antibacteriana da marapuama e do guaraná, e raros ou inexistentes são os que relatam em qual fração do extrato encontram-se os compostos bioativos. Conhecer a fração bioativa dos extratos da marapuama e do guaraná possibilita a padronização e produção de fitoterápicos a partir da biodiversidade regional (SCHENKEL *et al.* 2004; BASILE *et al.*, 2005; ALONSO, 2007). .

## JUSTIFICATIVA

Com o surgimento de novas doenças infecciosas, o reaparecimento de várias infecções que pareciam ter sido controladas e o aumento da resistência bacteriana houve a necessidade de pesquisas dirigidas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos (HACKBARTH, CHAMBERS, 1989; TRUITI *et al.*, 2003; APPELBAUM; JACOBS, 2005). Neste contexto, as espécies vegetais *Paullinia cupana* e *Ptychopetalum olacoides* foram escolhidas para o estudo da atividade antibacteriana.

Justificando o estudo das espécies supracitadas, sendo de relevante importância, os registros descritos na literatura dos seus efeitos medicinais e os raros artigos científicos que abordam suas ações antibacterianas, entre eles os estudos conduzidos por Basile *et al.* (2005), Majhenic *et al.* (2007), Correia *et al.* (2008) e Montrucchio e Miguel (2002).

Além disto, as espécies em estudo são endêmicas da região Amazônica e cultivadas em escala de produção (COSTA; ACEVEDO, 1999; KURI, 2008; VICENTINI; ROSSI, 1999; MONTRUCCHIO; MIGUEL, 2002). O que viabiliza a elaboração de um produto biotecnológico, na forma de fração semipurificada, que concentra compostos bioativos. Pois, o guaraná e a marapuama apresentam substâncias químicas que tem demonstrado notável atividade antibacterina, como os alcalóides, taninos, triterpenos, esteróides e flavanóides (DI STASI, 1996; SIMÃO E NASCIMENTO, 2002; SCHULZ *et al.*, 2002; ALMEIDA, 2007).

O que nos levou a desenvolver este projeto, com a finalidade de contribuir com o conhecimento do potencial biotecnológico das espécies, além de detectar possível atividade antibacteriana, e a partir dos extratos bioativos, obter frações semi-purificadas e avaliar seus potenciais antibacterianos, vislumbrando assim a possível elaboração de novos produtos biotecnológicos.

# 1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

## 1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Por milhares de anos, a humanidade tem aprendido sobre os benefícios do uso de plantas para aliviar e curar doenças. Desde 4.000 *a.C.* existem registros históricos sobre a utilização destas no tratamento de doenças (DUARTE, 2006). As plantas medicinais são a origem de diversos medicamentos modernos e realmente úteis para os cuidados de saúde primários (BHATTACHARJEE *et al.*, 2006).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais, o que pode ser ilustrado pelas farmacopéias da época. Já no início do século passado, esses recursos começaram a ser estudados como instrumento científico e se estabeleceu paulatinamente a tendência da utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados “princípios ativos”, resquício da linguagem alquimista da época (SCHENKEL *et al.*, 2004).

Em 1935 foi demonstrada pela primeira vez, por Paul Ehrlich, a ação sistêmica antimicrobiana de uma substância: o corante azo vermelho protosil, que era clivada no organismo dando origem a sulfanilamida. Posteriormente, foi descoberta a atividade de compostos produzidos por micro-organismos, os antibióticos, o que conduziu à produção em massa da penicilina descoberta por Fleming, em 1928 (JAWETZ *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2004).

Atualmente, pesquisas são realizadas com a finalidade de se encontrar novos compostos ativos a partir de substâncias oriundas do metabolismo secundário das plantas. Um número significativo de espécies vegetais, aproximadamente 5 % já foi estudado, no entanto deve ser vislumbrada a existência de cerca de 500.000 espécies de plantas conhecidas, e

destas, aproximadamente 125.000 encontram-se em florestas tropicais. Além disto, para a maioria das plantas estudadas somente uma das partes como folhas, raízes ou caule, ou somente um tipo de preparação como óleos essenciais ou extratos foram analisados (YUNES; CECHINEL FILHO, 2001; DUARTE, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2008).

A grande diversidade encontrada no território brasileiro coloca o país em uma posição estratégica para desenvolver a exploração racional e sustentada das espécies com valor terapêutico (BASSO *et al.*, 2005). Esta diversidade biológica própria do Brasil é resultante principalmente da extensão do país, que congrega um elevado número de biomas (Figura 01), com ampla variedade de climas, tipos de solo e altitudes, fornecendo um conjunto exclusivo de pressões para adaptação da vida vegetal nesses ambientes (IBGE, 2004; BASSO *et al.*, 2005; COUTINHO, 2006).



**Figura 01** – Mapa de biomas do Brasil de 2004.

**FONTE:** Retirado de < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 20 de outubro de 2010

Para se adaptar tanto às pressões externas como ao ataque constante de micro-organismos, os vegetais têm evoluído desenvolvendo sistemas específicos de defesa (ALMEIDA, 2007). Nos vegetais superiores, têm sido observada a presença de compostos com amplo espectro de ação e com potencial para aplicação como agentes terapêuticos (ALMEIDA, 2007). Isto seria consequência direta de milhões de anos de evolução atingindo um refinamento elevado de formas de proteção contra as intempéries, poluição e predadores (BARREIRO, 2002).

Para a elaboração de substâncias que atuem na defesa contra as pressões exercidas pelo ambiente, o vegetal sintetiza e degrada compostos fitoquímicos pelas inúmeras reações anabólicas e catabólicas, que compõem o metabolismo primário e secundário da planta (DI STASI, 1996). Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram negligenciados pela ciência, considerados como produto de excreção vegetal, e aparentemente sem utilidade na sobrevivência da espécie. Atualmente, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas em mecanismos que permitem a adequação do organismo a seu meio, garantindo vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie no ecossistema. Sendo assim, plantas infectadas por micro-organismos podem produzir um espectro diferente de metabólitos secundários, com a finalidade de se defender (DI STASI, 1996; VERPOORTE, 1998; SANTOS, 2004).

Os principais metabólitos secundários com atividade antibacteriana descritos na literatura científica incluem: lectinas, polipeptídios, ácidos fenólicos, quinonas, flavonóides, alcalóides, terpenos e taninos (SCALBERT, 1991; STERN *et al.*, 1996; DI STASI, 1996; ZHANG; LEWIS, 1997; MARWAN; NAGEL, 2006).

Os flavonóides são descritos por possuírem atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana. Os mecanismos proposto para a atividade dos flavonóides têm sido atribuídos



à inibição da DNA girase e à inibição da função da membrana citoplasmática. Muitos, através do metabolismo da planta, sofrem um processo de polimerização gerando moléculas maiores, denominado de taninos e são subdivididos em diversas classes, das quais as de maior importância são os taninos condensados (proantocianidina: catequina e epicatequina) (PETERSON; DWYER, 1998; BEECHER, 2003; CUSHNIE; LAMB, 2005).

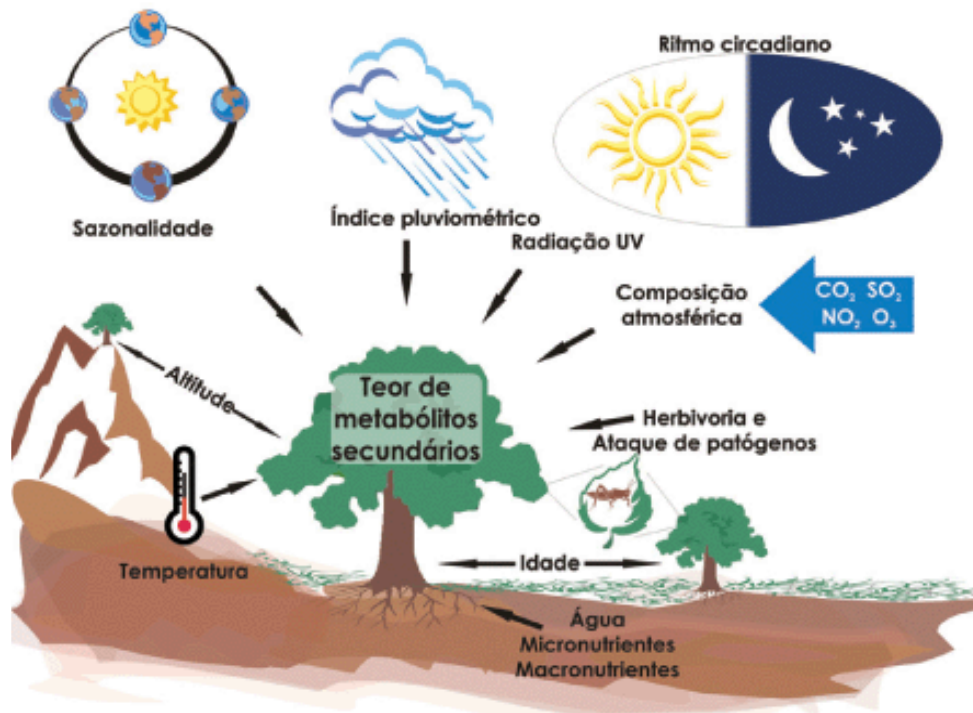
Os taninos são substâncias solúveis em água e a sua capacidade de formar complexos com proteínas pode ser a base de sua atividade antimicrobiana (SANTOS; MELO, 2004; CHUNG *et al.*, 1998; MILA *et al.*, 1996). Além deste mecanismo proposto, os taninos podem atuar inibindo enzimas microbianas extracelulares, privando os micro-organismos de substratos necessários ao seu crescimento e através da ação direta sobre o metabolismo microbiano, inibindo a fosforilação oxidativa (SCALBERT, 1991).

Os terpenóides representam a segunda classe com maior número de constituintes ativos, são subdivididos em monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e tetraterpenos (DI STASI, 1996). Já os alcalóides são substâncias de caráter básico e se subdividem em inúmeras subclasses, com destaque para os alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos e tropanos. Os com núcleo isoquinolínico incluem substâncias com atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (DI STASI, 1996; HENRIQUES *et al.*, 2004).

As xantonas são classificadas por muitos autores como alcalóides verdadeiros (RATES 2004). Seu nome é proveniente do grego *xanthos* que significa amarelo, decorrente de sua coloração característica (KUSTER; ROCHA, 2004). Estudos têm demonstrado a atividade antibacteriana dessas substâncias frente a cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (DHARMARATNE *et al.*, 1999; SOBRAL *et al.*, 2009).

A presença dos metabólitos secundários em estruturas vegetais representa uma interface química entre a planta e o ambiente. Assim, podem ocorrer variações nas proporções relativas de metabólitos. Em relação ao vegetal, esses fatores podem ser divididos em dois

grupos, os intrínsecos, relacionados ao meio no qual o vegetal vive, como irradiação, temperatura, nutrientes minerais, pH, e micro-organismos, e os extrínsecos, relacionados ao período e o modo como se efetua a colheita (**Figura 02**) (OLIVEIRA *et al.*, 1998; VERPOORTE, 1998; GOBBO-NETO, L.; LOPES, 2007).



**Figura 02** – Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas  
**FONTE** – Retirada de GOBBO-NETO; LOPES, 2007

Para a obtenção dos metabólitos secundários a partir do material vegetal podem ser empregados vários procedimentos, entre eles o clássico utilizando-se solventes de polaridade crescente, sendo os principais o hexano (para compostos apolares), e o etanol e metanol (para compostos mais polares). Com uma extração inicial que utiliza solventes de baixa polaridade obtêm-se compostos mais lipofílicos, por outro lado com solventes alcoólicos obtêm-se um amplo espectro de material polar e apolar (saponinas, taninos, flavanóides e açúcares) (SIMÕES *et al.*, 2004).

### 1.1.1 Plantas medicinais e a fitoterapia

O uso de plantas medicinais iniciou-se pela observação e experimentação das propriedades terapêuticas de determinadas plantas pelos povos primitivos. Deste então esse conhecimento vem sendo lapidado e se disseminando de geração a geração (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Ainda hoje muitas comunidades, principalmente aquelas com condições sócio-econômicas menos favorecidas, utilizam plantas medicinais como principal, e muitas vezes, único recurso para o alívio de seus males (MACIEL *et al.*, 2002; CAETANO *et al.*, 2002). Já nos países mais desenvolvidos observa-se um maior uso de fitorápicos influenciado pelo modismo de consumo de produtos naturais (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2005). O que é corroborado pela Organização Mundial de Saúde, que recomenda a fitoterapia como uma forma de apoio às ações de atendimento primário de saúde (AVANCINI *et al.*, 2002).

No Brasil, são crescentes as pesquisas com a finalidade de ampliar os conhecimentos disponíveis sobre plantas. Entre os fatores que estimulam o aumento da investigação de produtos fitoquímicos está a comprovada eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais como os alcalóides da vinca, com atividade antileucêmica, e do jaborandi, com atividade antiglaucoma; a síntese de fármacos a partir da matéria prima vegetal e a ausência de uma monografia completa e moderna das plantas nativas brasileiras. Outro fator de relevância é o fato de que muitas espécies são usadas pela população de forma empírica, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança (YUNES *et al.*, 2001; FIGLIO *et al.*, 2006).

Diante dos inúmeros fatores que incitam o estudo dos produtos derivados da biodiversidade, as pesquisas em bioprospecção tornam-se essenciais. Viabilizando tais pesquisas fazem-se primordiais amplos debates envolvendo o tema, sobretudo no Brasil por ser um país em desenvolvimento e detentor de rica biodiversidade e de conhecimentos tradicionais (FUNARI; FERRO, 2005).

Sabendo-se do potencial do Brasil e vislumbrando as possibilidades da biodiversidade o Ministério da Saúde formulou diretrizes que determinam prioridades na investigação das plantas medicinais e a implantação da fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem sua inclusão no Sistema Único de Saúde (SUS) (VEIGA JUNIOR, 2008).

A idéia primordial do uso de fitoterápicos não é substituir os medicamentos já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica ofertando medicamentos equivalentes, também registrados, talvez mais baratos, com espectro de ação mais adequado e com indicações terapêuticas complementares às medidas existentes, mas sempre em obediência aos preceitos éticos que regem o emprego de xenobióticos na espécie humana. Os objetivos secundários seriam a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato autóctone para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local (LAPA *et al.*, 2004).

Pode-se inferir, portanto que, a natureza oferece um enorme potencial para a descoberta de novos compostos bioativo fitoterápico, e que, para tanto, fazem-se essenciais pesquisas direcionadas para a bioprospecção da quimiodiversidade. Uma forma assertiva de conduzir esses estudos é por meio de uma abordagem etnofarmacológica, que consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais que fazem uso da flora medicinal com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados (ELISABETSKY; SOUZA, 2004; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Neste contexto, as espécies vegetais *Paullinia cupana* e *Ptychopetalum olacoides* foram escolhidas para o estudo de possível atividade antibacteriana e a obtenção de frações semipurificadas bioativas.

### 1.1.1.1 Espécie vegetal *Paullinia cupana* Kunth

A espécie *Paullinia cupana* Kunth pertence à família Sapindaceae, que conta com cerca de 150 gêneros e 2000 espécies. A *Paullinia cupana* cresce em áreas tropicais e subtropicais da América, com alta frequência na Amazônia brasileira, venezuelana e Guianas, a partir da região ocidental do rio Tapajós até a bacia do Rio Madeira, e partes do Paraguai e do Uruguai, (COSTA; ACEVEDO, 1999; ALONSO, 2007). A *Paullinia cupana* variedade *sorbilis* [(Mart.) Ducke] é cultivada na Amazônia brasileira, na região do município de Maués, que produz cerca de 400 toneladas por ano (RATES, 2004; KURI, 2008).

É popularmente conhecida como guaraná, cupana, guanáyuba, guaranazeiro, uaranazeiro, varaná, paulínia, narazazeiro, naranajeiro, naraná, guaraná-uva, guaranaína, uaraná e guaranaúva (MARTINS, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 1998; CORRÊA *et al.*, 1998; ALONSO, 2007). O nome guaraná foi conferido à espécie *Paullinia cupana* devido ao conhecimento que tinham os índios guaranis que usavam as sementes para produzir um tônico estimulante, bebida chamada por eles de elixir da vida. Além disto, era também muito empregada pelos índios do Orinoco e Maués, que consideravam a planta sagrada. Uma lenda atribui a origem da semente de guaraná aos olhos de uma deusa, que teria virtudes secretas (HENMAN, 1982; RATES, 2004; ALONSO, 2007).

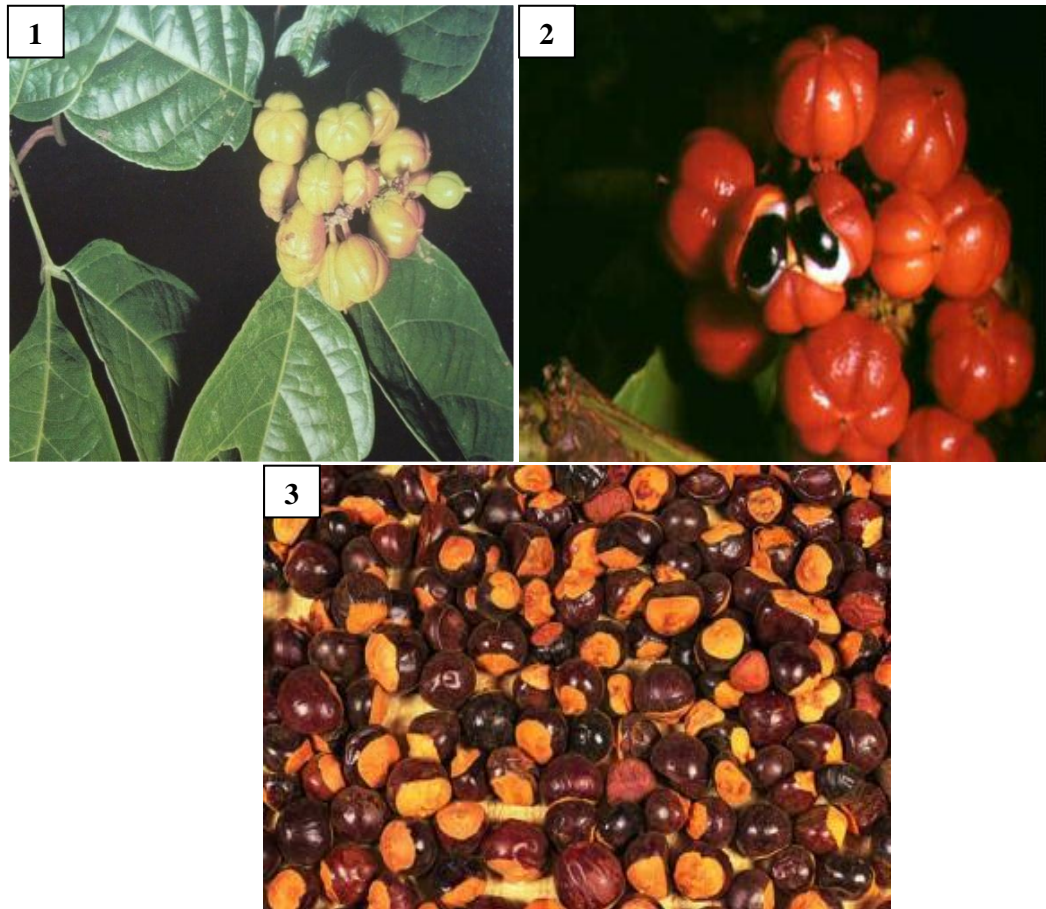
Algumas tribos da Amazônia têm utilizado o guaraná no tratamento de diarreia crônica, como analgésico, febrífugo, para tratar hipertensão, enxaqueca, neuralgia e disenteria (BASILE *et al.*, 2005). O uso popular compreende uma variedade de fins terapêuticos, inclusive como tônico, estimulante do sistema nervoso, assim como um agente antidiarreico e diurético (ALONSO, 2007).

Conforme descrito na literatura científica, o guaraná tem uma ação protetora no DNA de hepatócitos de ratos, reduz a lesão gástrica induzida por etanol e indometacina, melhora o

desempenho cognitivo e reduz a fadiga mental. Pode agir na prevenção da carcinogênese, reduzindo a expansão das células pré-neoplásicas (CAMPOS *et al.*, 2003; FUKUMASU *et al.*, 2006; KENNEDY *et al.*, 2008).

Além do uso medicinal, o maior interesse pelas sementes do guaraná é da indústria de bebidas, como refrigerantes e licores, e na composição de uma variedade de suplementos alimentares, principalmente devido ao alto teor de cafeína (BASILE *et al.*, 2005; FREITAS *et al.*, 2007; KURI, 2008).

Dentre as características morfológicas, o guaranazeiro é descrito como uma liana semi-arbustiva trepadora de 1,5 a 3 metros de altura, que busca a direção da luz disponível na parte superior da floresta. Suas folhas são numerosas, elíptico-ovais, com cinco folíolos, glabra em ambas as faces e bordas ligeiramente dentadas, a parte inferior das folhas é verde brilhosa. A haste é flexível e alongada, possuem flores pequenas com pétalas oblongas, seus frutos são capsulares, piriformes e indeiscentes, e as sementes apresentam uma coloração castanho-escuras (**Figura 03**) (CORRÊA *et al.*, 1998; MATTA, 2003; BASILE *et al.*, 2005; ALONSO, 2007).



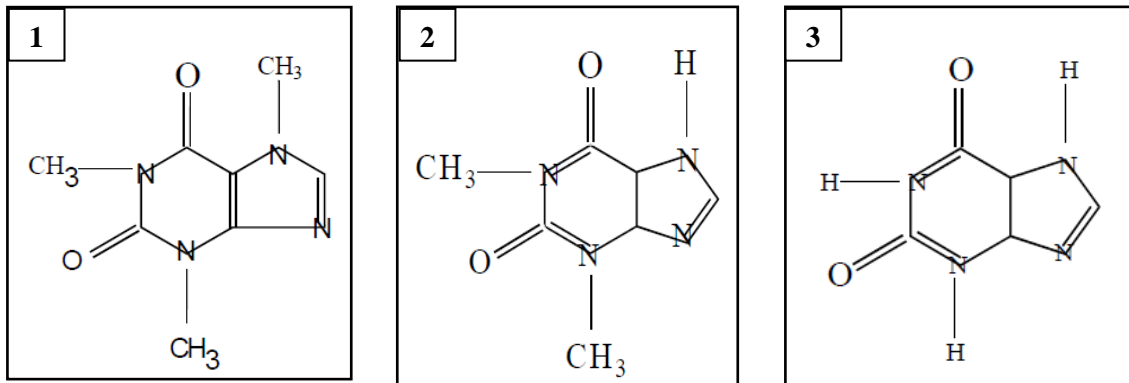
**Figura 03** – Espécie vegetal *Paullinia cupana*. (1) folhas; (2) cacho; (3) sementes do guaraná

**FONTE** - (1) Retirada de COSTA; ACEVEDO, (1999); (2) e (3) Retirada de KURI (2008)

É uma planta perene que se adapta melhor aos solos ricos em húmus, profundos e bem drenados, necessitando da iluminação meia-sombra ou plena. É mais bem adaptada em clima quente úmido (umidade relativa do ar 80 %), necessitando de mais de 1300 mm de chuva por ano e temperatura média superior a 21 °C (CORRÊA *et al.*, 1998).

O núcleo da semente do guaraná é muito rico em purinas, amidos e outros açúcares, enquanto o tegumento é rico em fibras e pentosanas. Toda a semente tem taninos e uma pequena quantidade de óleo essencial. A constituição fitoquímica inclui: xantina: cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (3 a 5 %); xantina: teobromina (0,02 a 0,03 %); e teofilina (0,25 %). No óleo essencial foram identificados sesquiterpenos cíclicos e monoterpênicos cíclicos. Foram identificados também minerais: cálcio (0,1 %), fósforo (0,3 %), potássio (0,3 %), magnésio

(0,08 %), ferro (4,3 mg); vitaminas: B2, B3 e B4; flavonóides: catecol e epicatecol; taninos (8,5 a 25 %): condensados (proantocianidina: catequina e epicatequina (flavan-3-óis)) (**Figura 04**) (ESPINOLA *et al.*, 1997; REVILLA, 2002; RATES, 2004; BASILE *et al.*, 2005; HEARD *et al.*, 2006; USHIROBIRA *et al.*, 2007; MAJHENIČ *et al.*, 2007; ALONSO, 2007).



**Figura 04** – Estrutura química das xantinas: (1) cafeína; (2) teobromina; (3) teofilina

**FONTE** – Retirada da Farmacopéia Brasileira (1977)

Assim, sabendo-se que o guaraná é citado na literatura como possuidor de propriedades benéficas ao homem, além de ser amplamente consumido na forma de bebidas, é importante considerar o seu potencial tóxico. Devendo-se ponderar que, de acordo com Morton (1992), Ferguson, (2001) e Basile *et al.*, (2005) os prováveis agentes da ação antibacteriana, os polifenóis presentes no extrato, podem levantar algumas preocupações, pois as catequinas (taninos) são cada vez mais reconhecidas como substâncias cancerígenas.

Segundo Maria *et al.*, (1998, 2002), Mattei *et al.*, (1998) e Bittencourt *et al.*, (2010) a concentração do guaraná é de crítica importância para a atividade citotóxica dos compostos presentes no guaraná. Estudos têm indicado que baixas concentrações de guaraná são inofensivas, enquanto que doses mais elevadas do produto poderiam ser citotóxicas.



### 1.1.1.2 Espécie vegetal *Ptychopetalum olacoides* Benth

A marapuama, *Ptychopetalum olacoides* Benth, é uma planta pertencente à família Olacaceae. Formada por 27 gêneros e 180 espécies, são árvores, arbustos ou lianas lenhosas, em geral hemiparasitas, caracterizada por folhas simples, alternadas, de margem inteira e sem estípulas (VICENTINI; ROSSI, 1999). A espécie, *Ptychopetalum olacoides* Benth, é uma árvore nativa das florestas tropicais da Bacia Amazônica, sobretudo do Brasil e Guiana Francesa. Cresce em solos úmidos e com sombra, tolera temperaturas mínimas de 15 °C, o que a torna imprópria em outras regiões (VICENTINI; ROSSI, 1999; ALONSO, 2007). Popularmente conhecida como muira puama, mirantã, mairantã, marapuã, mirirapuama, muirapama, muiratã, pau-homem e murapuama, o termo muira em língua indígena significa madeira e puama poderoso (CORRÊA *et al.*, 1998; MONTRUSCCHIO *et al.*, 2002; ALONSO, 2007;).

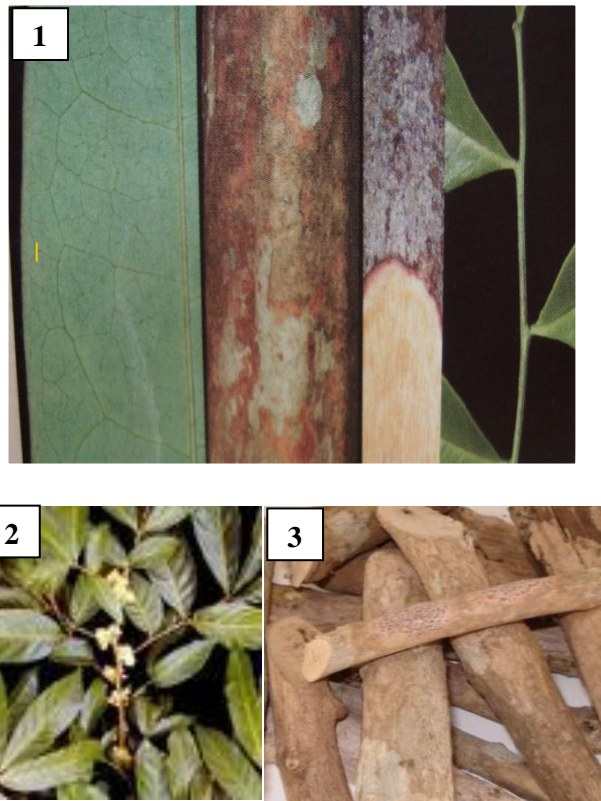
Histórica e popularmente todas as partes têm sido usadas por suas propriedades medicinais, mas a casca e a raiz são estruturas utilizadas preferencialmente pelas atividades afrodisíacas (COSTA *et al.*, 1991; VELASCO *et al.*, 2008). Os nativos da floresta amazônica durante muito tempo usaram a decocção das raízes e galhos do marapuama como um energético, afrodisíaco e antidiarreico (ALONSO, 2007). Na medicina popular é utilizado como tônico neuromuscular, no tratamento de ataxia, paralisia facial, neurastenia sexual, astenia circulatória e gastrointestinal (COSTA *et al.*, 1991; CORRÊA *et al.*, 1998).

A farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1929) apresenta seu emprego oficial como extrato fluido, pó e tintura de marapuama (VELASCO *et al.*, 2008 ). Infusões das raízes desta planta têm sido utilizadas para o tratamento de muitas doenças em que os radicais livres são susceptíveis de serem implicados. De particular interesse são os usos entre os idosos e por

pacientes em recuperação de patologias associadas com danos ao sistema nervoso central (SILVA *et al.*, 2002).

Consistentemente com o seu uso tradicional, estudos têm demonstrado que a ingestão de *Ptychopetalum olacoides* facilita a recuperação da memória de pacientes que apresentaram isquemia cerebral (SILVA *et al.*, 2004). É sugerido que a planta contém compostos capazes de melhorar a eficácia da rede celular antioxidante no cérebro, em última análise, reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Entre as características morfológicas, a marapuama é descrita como um arbusto ou árvore pequena, atingindo a altura de cinco a quinze metros. Apresenta haste com coloração pardacenta, tecido compacto, bastante forte e resistente. É ereta e coroada por pequenos e raros galhos, com folhas verde-escuras, ovo-lanceoladas, com um diâmetro de cerca de cinco centímetros, possui pequenas flores brancas de odor pungente similar ao jasmim. O fruto é inicialmente de cor verde e torna-se amarelo-alaranjado na maturidade. A raiz é fibro lenhosa e de cor marrom claro (**Figura 05**) (COSTA *et al.*, 1991; MATTA, 2003; ALONSO, 2007).

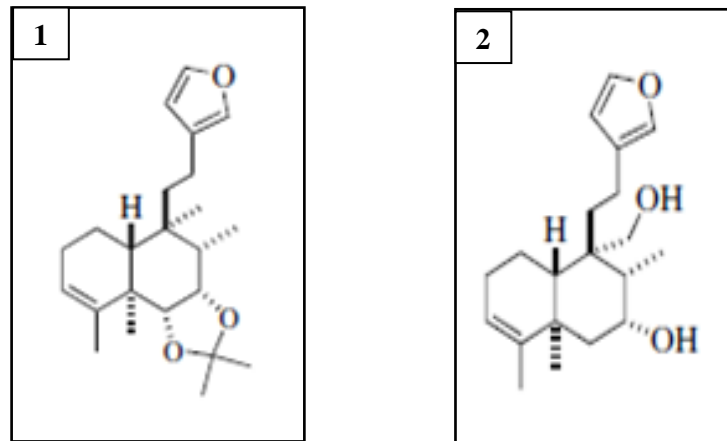


**Figura 05** – Espécie vegetal *Ptychopetalum olacoides*. (1) folhas, galhos e tronco; (2) e (3) tronco, folhas e flores

**FONTE** - (1) Retirada de VICENTINI; ROSSI, (1999)

(2) e (3) Retirada de <<http://www.naturezadivina.com.br>>. Acesso em 15 de junho de 2010

O perfil fitoquímico do *Ptychopetalum olacoides* compreende: alcalóides: muirapuamina (0,05 %); xantinas: cafeína, teobromina e adenina; ácidos orgânicos: araquínico, lignocérico, uncosânico, tricosânico e pentacosânico; taninos: flobafeno (0,6 %); diterpenos: clerodanos; triterpenos: glutinol e  $\alpha$ -amirina; ácidos graxos: palmítico, esteárico, behênico; esteróides: sitosterol, sitosterol glicosado, estigmasterol, campesterol e lupeol; óleo volátil:  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -cariofileno; e flavonóides e cumarinas (**Figura 06**) (CORRÊA *et al.*, 1998; REVILLA, 2002; MONTRUSCCHIO *et al.*, 2002; MATTA, 2003; KUSTER; ROCHA, 2004; ROLIM *et al.*, 2005; ALONSO, 2007; TANG *et al.*, 2009).



**Figura 06** - Diterpenos do tipo clerodano: (1) 6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihdroxianoneno e (2) 7 $\alpha$ ,20-dihdroxianoneno, descritos por apresentarem atividade sobre células do sistema nervoso central

**FONTE:** Retirada de Tang *et al.*, (2009)

## 1.2 DOENÇAS INFECIOSAS, MICRO-ORGANISMOS E ANTIMICROBIANOS

As doenças infecciosas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre os seres humanos destes tempos remotos (BAX *et al.*, 2000; BUTLER; BUSS, 2006).

Os povos primitivos creditavam as doenças infecciosas a entidades espirituais, porém, em 1683, esse paradigma começou a ser reformulado, com a descoberta de seres microscópicos por Anton Van Leeuwenhoek. Já durante a segunda metade do século XIX foi formulado a teoria do germe por Pauster e Koch, que estabeleceram um novo curso para o estudo a doenças infecciosas (LEDERBERG, 2000).

Na década de 1950, foi notável o crescente número de “drogas maravilhosas” como a penicilina, a estreptomicina, o clorafenicol e uma lista crescente de outras, que por vezes, prometia o fim das doenças provocadas por bactérias (LEDERBERG, 2000; MCMICHAEL, 2004).

Atualmente dispomos de novos medicamentos, que por vezes ainda não conseguiram colocar fim as doenças provocadas por esses micro-organismos, tendo em vista a rapidez do processo evolutivo microbiano. Esses medicamentos podem ser assim classificados (MURRAY *et al.*, 2004; RANG, 2004).

- **Inibidores da função enzimática:** atuam em vias bioquímicas críticas para o micro-organismo: sulfonamidas (MURRAY *et al.*, 2004; RANG, 2004).
- **Inibidores da função dos ácidos nucléicos:** atuam interferindo na formação dos ácidos nucléicos: actinomicina (MURRAY *et al.*, 2004; RANG, 2004).
- **Inibidores da síntese protéica:** atuam inibindo a síntese protéica do micro-organismo: tetraciclina, clorafenicol, estreptomicina e gentamicina (MURRAY *et al.*, 2004; RANG, 2004).
- **Alteração da função da membrana:** atuam nas membranas celulares dos micro-organismos: polimixinas (MURRAY *et al.*, 2004; RANG, 2004).
- **Interferência na formação e função da parede celular:** penicilinas, cefalosporinas, carbepenemases e vancomicina (MURRAY *et al.*, 2004; RANG, 2004).

Dentre os fármacos que atuam na formação e função da parede celular, podem-se citar as penicilinas. Estes medicamento vem perdendo sua eficácia terapêutica no decorrer do tempo, em consequência de processos evolutivos microbianos (TAVARES, 2000; CARVALHO *et al.*, 2009).

Em 1960 depois de um a dois anos da introdução de penicilinase resistentes a  $\beta$ -lactâmicos, os *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) foram isolados e identificados em amostras clínicas. Na década de 1980, foi observado uma epidemia de MRSA resistente a multidroga, tornando-se um dos mais importantes agentes causadores de infecções adquiridas no hospital (TAVARES, 2000; LECASTRE *et al.*, 2007; CARVALHO *et al.*, 2009).

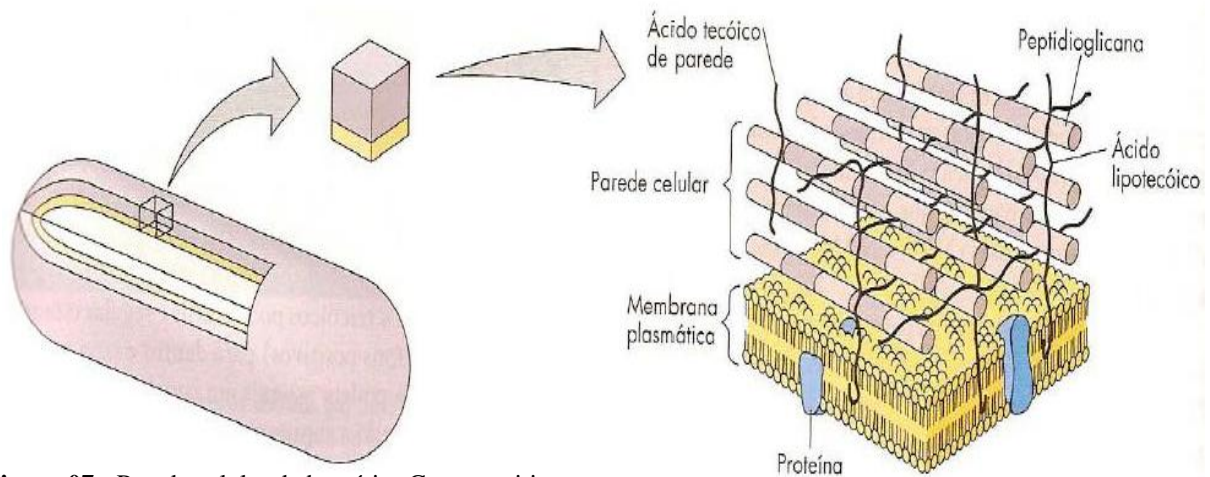
Nas duas últimas décadas tem se observado a propagação do *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) na comunidade, patógeno perigoso e em constante evolução (LECASTRE *et al.*, 2007; WRIGHT, 2010). Além disto, na última década foram detectados casos de cepas resistentes a vancomicina (VRSA), medicamento utilizado como última alternativa em casos de resistência do micro-organismo a meticilina, o que tem provocado pânico entre os microbiologistas (TAVARES, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2006).

Em consequência, portanto, do surgimento e disseminação de doenças infecciosas e do aparecimento de bactérias multirresistentes aos quimioterápicos, faz-se necessário o desenvolvimento e novas estratégias (uso racional de medicamento) e de novos medicamentos. O que incita exaustivas pesquisas de bioprospecção das plantas utilizadas na medicina tradicional, que possam ser fonte de agentes antimicrobianos alternativos aos medicamentos disponíveis na terapêutica (HACKBARTH, CHAMBERS, 1989; TRUITI *et al.*, 2003; APPELBAUM; JACOBS, 2005).

### 1.2.1 Micro-organismo: bactérias Gram-positivas

Muitos micro-organismos são classificados como Gram-positivos e Gram-negativos esta classificação baseia-se na coloração da parede celular da bactéria pelo método de Gram (KONEMAM *et al.*, 1989). A parede celular das bactérias Gram-positivas é uma estrutura relativamente simples de 15-50 nm de espessura, formada por cerca de 50 % de peptidoglicanos, composto por camadas de cadeias de glicano constituídas por 10 a 12 subunidades alternadas de ácido *N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglicosamina (MURRAY *et al.*, 2004; RANG, 2004).

A parede apresenta além da camada de peptidoglicano, 5 a 10 % de proteínas e polissacarídeos e 40 a 45 % de polímeros ácidos, proporcionando uma elevada polaridade à superfície celular, o que exerce influência na penetração de moléculas ionizadas e favorece a entrada de compostos com carga positiva (**Figura 07**) (RANG, 2004).

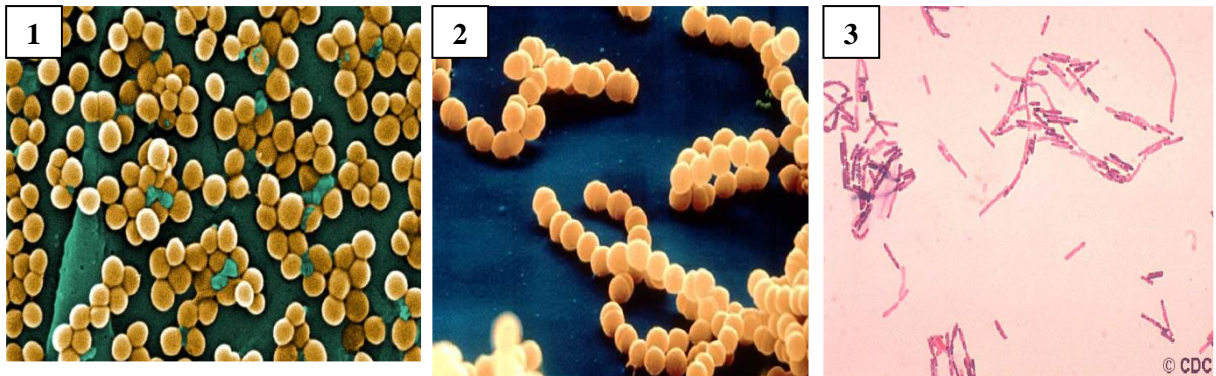


**Figura 07** - Parede celular de bactérias Gram-positivas

**FONTE** - Adaptado de Tortora *et.al.*, (2005)

Segundo KONEMAM *et al.* (1989) e JELJASZEWICZ *et al.*, (2000), os antibióticos são mais eficazes no tratamento de infecções em que o patógeno implicado é uma bactéria Gram-positiva, devido principalmente a falta de membrana externa e, portanto, o fácil acesso da droga ao alvo.

Dentre as bactérias Gram-positivas, este trabalho abordou dois grupos, as que apresentam morfologia em cocos: em forma de cachos (*Staphylococcus aureus*) e em forma de cadeia (*Streptococcus mutans*), e as bactérias com morfologia bacilar (*Bacillus cereus* e *Bacillus licheniformes*). Estas morfologias estão demonstradas na figura 08, para melhor compreensão.



**Figura 08** – Bactérias Gram-positivas: (1) *Staphylococcus aureus*; (2) *Streptococcus ssp.*; (3) *Bacillus cereus*.

**FONTE** – (1) Retirada de <[http:// www.netwellness.org](http://www.netwellness.org)>. Acesso em: 04 de abril de 2010

(2) Retirada de <<http://www.microbewiki.kenyon.edu>>. Acesso em: 20 de março de 2010

(3) Retirada de <<http://www.paapredbook.aapublications>>. Acesso em: 04 de abril de 2010

### 1.2.1.1 Cocos Gram-positivos

Os cocos Gram-positivos formam um grupo heterogêneo de micro-organismos que colonizam os seres humanos. A forma esférica, reação ao método de Gram e a ausência de endósporos são características comuns que eles compartilham (MURRAY *et al.*, 2004).

Na última década esse grupo de bactérias ressurgiu como principal patógeno do ser humano, principalmente devido ao desenvolvimento de resistência às penicilinas (LENTINO *et al.*, 2008). É o principal agente de infecções hospitalares e adquiridas na comunidade, sendo comumente isolados de infecções da pele e seus anexos, como agente patogênico (JELJASZEWICZ *et al.*, 2000; SADER *et al.*, 2010).

#### 1.2.1.1.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus* são um gênero de cocos Gram-positivos, seu nome é derivado da palavra grega *staphyle*, que significa “cachos de uva”, pois crescem em um padrão semelhante a cachos de uvas (**Figura 08**) (MURRAY *et al.*, 2004). São amplamente difundidos na natureza e integra a microbiota da pele e mucosa de animais (OLIVEIRA *et al.*, 2006).



Apresentam diâmetro compreendido entre 0,5 a 1µm, são micro-organismos imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase-positivos, crescem em meio contendo 1% de cloreto de sódio, e em temperatura que varia de 18 a 40 °C (MURRAY *et al.*, 2004; STROHL *et al.*, 2004).

O mais virulento do gênero, *Staphylococcus aureus* é uma das causas mais comuns de infecção bacteriana, responsável por uma infinidade de doenças que variam de infecções relativamente leves de pele e intoxicações alimentares até endocardite e graves infecções da corrente sanguínea. Esse micro-organismo é um dos principais agentes de infecção hospitalar, principalmente as cepas de *S. aureus* metilicina resistente, sendo preocupante a crescente resistência desse patógeno aos medicamentos disponíveis na clínica (CAETANO *et al.*, 2002; STROHL *et al.*, 2004; BUTLER; BUSS, 2006; LENTINO *et al.*, 2008; ROLLER *et al.*, 2009).

#### 1.2.1.1.2 *Streptococcus mutans*

O gênero *Streptococcus* é formado por cocos Gram-positivos tipicamente arranjados aos pares ou em cadeia (**Figura 08**). A maioria das espécies são micro-organismos anaeróbios facultativos e alguns somente crescem numa atmosfera enriquecida com dióxido de carbono. Considerados organismos fastidiosos, essas bactérias apresentam exigências nutricionais complexas, necessitando da utilização de meios enriquecidos com sangue ou soro para seu isolamento (MURRAY *et al.*, 2004).

Formam um grupo heterogêneo de bactérias, de modo que nenhum sistema é suficiente para classificá-los, caracterizando-se por combinações peculiares, de crescimento de colônias, padrão de hemólise no ágar sangue, a composição antigênica e reações bioquímicas (JAWETZ *et al.*, 1998; STROHL *et al.*, 2004).

*Streptococcus mutans* é um dos habitantes da mucosa oral e tem sido considerado o principal agente de cárie dental. A capacidade de aderir aos dentes e produzir na superfície dentária um biofilme, bem como metabolizar os carboidratos e sobreviver sob estresse ambiental são vantagens que possibilitam a esse micro-organismo sobreviver no ambiente da cavidade bucal (KURAMITSU, 1993; NARISAWA, 2010).

### 1.2.1.2 Bacilos Gram-positivos

O gênero *Bacillus* (família Bacillaceae) é extremamente heterogêneo tanto geneticamente quanto fenotipicamente. Formado por bacilos Gram-positivos aeróbios e anaeróbios grandes e em cadeia, formadores de esporos que são altamente resistentes a condições ambientais adversas (STROHL *et al.*, 2004; GOMES, 2008; KOEHLER, 2009). As espécies de *Bacillus* spp. são capazes de provocar infecções em seres humanos, mas além disto, apresentam potencial biotecnológico, por sintetizar substâncias com aplicação industrial (YOUSSEF *et al.*, 2007; KABAIVANOVA *et al.*, 2008).

#### 1.2.1.2.1 *Bacillus cereus*

É um bacilo Gram-positivo aeróbio grande e em cadeia, produtor de enterotoxinas (Figura 08). Embora a maioria das espécies possa causar doença, o *Bacillus cereus* (do grego *cereus* “cor de cera”) é o patógeno mais importante (STROHL *et al.*, 2004). As doenças mais comumente observadas consistem em gastroenterites, infecções oculares e sepse relacionada à utilização de cateteres endovenosos (JAWETZ *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2004; WEHRLE *et al.*, 2010).

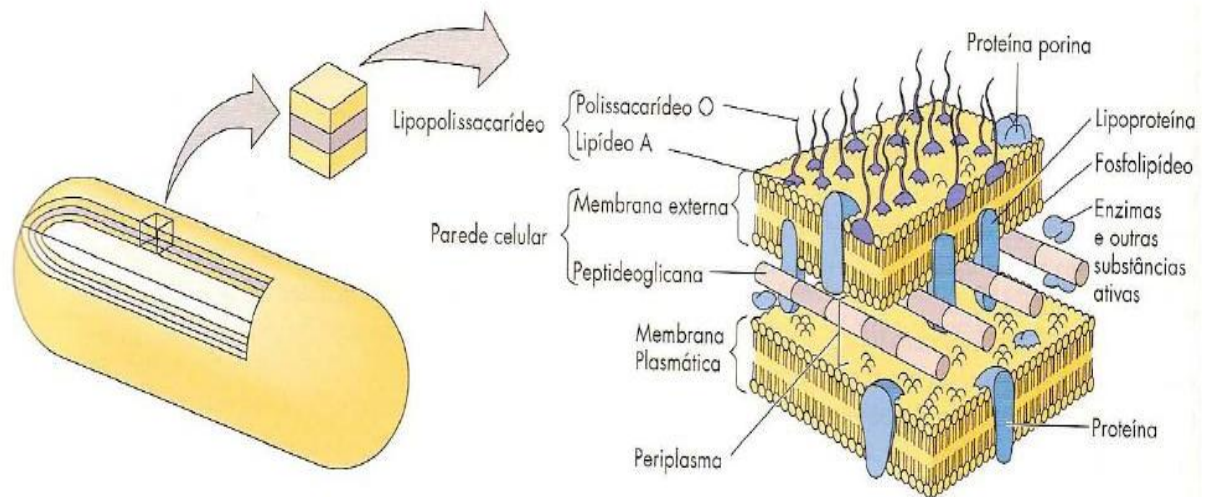
### 1.2.1.2.2 *Bacillus licheniformes*

*B. licheniformes* é bacilo Gram-positivo que desperta o interesse biotecnológico, já que ele é capaz de sintetizar substâncias que têm aplicações diversas. Pode ser introduzida em reservatórios de petróleo, e produzir biossurfactante, que viabiliza a recuperação de quantidades significativas de óleo aprisionado em reservatórios (YOUSSEF *et al.*, 2007; HAGHIGHAT *et al.*, 2008).

Produz também uma protease alcalina que tem aplicação nas indústrias de couro, alimentos e de detergentes (AHMED *et al.*, 2007). Mas, além disto, tem sido reportado caso de infecção em animais (bovinos, ovinos) com relatos de óbitos, e em seres humanos tem sido descrito casos de oftalmite, endocardite, sepse, bacteremias e de intoxicação alimentar (LOGAN, 1988; SANTINI *et al.*, 2005; MCINTYRE, *et al.*, 2008; GOMES, 2008).

### 1.2.2 Micro-organismo: bactérias Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas apresentam uma parede celular formada por um espaço periplasmático, uma camada de peptidoglicano de 2 nm de espessura e uma membrana externa (**Figura 9**) (RANG, 2004). Esta composição e principalmente a presença da membrana externa constitui uma característica marcante das células bacterianas Gram-negativas (NIKAIDO, 2003; PESSINI *et al.*, 2003).



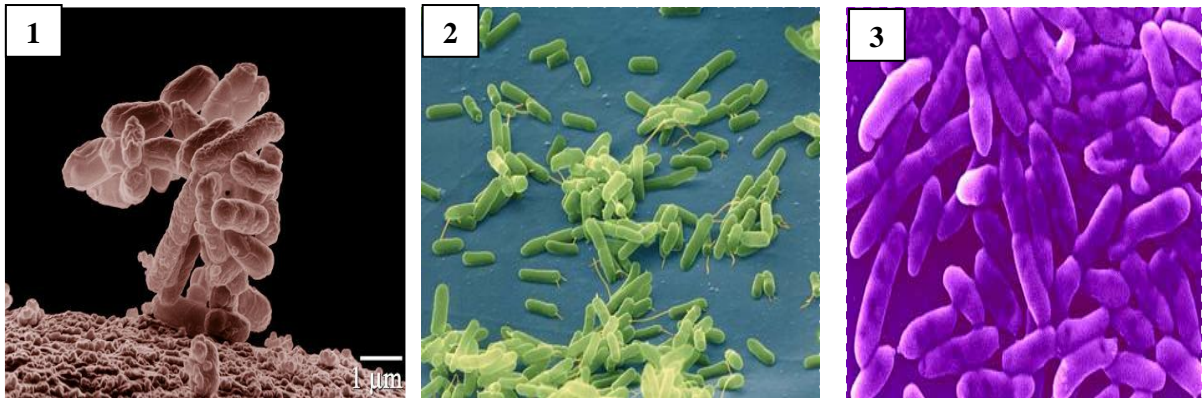
**Figura 9** - Parede celular de bactérias Gram-negativas

**FONTE** - Adaptado de Tortora *et.al.*(2005)

É provável que a função mais importante da membrana externa seja a de servir como uma barreira de permeabilidade seletiva, interferindo na absorção de quimioterápicos (KAMIO; NIKAIDO, 1976). Essa seletividade deve-se provavelmente a composição química da membrana que é constituída primordialmente por uma bicamada de lipídios, propiciando uma baixa permeabilidade para solutos hidrofílicos (NIKAIDO, 2003).

Substâncias hidrofílicas que apresentam pouca ou nenhuma permeabilidade a membrana lipídica, como pequenas moléculas de nutrientes, podem vir a entrar na célula bacteriana através de canais específicos que facilitam à passagem transmembrana, as chamadas porinas (SCHULZ, 1996; NIKAIDO, 2003).

Entre as bactérias Gram-negativas, este trabalho abordou dois grupos, as que apresentam morfologia bacilar: fermentadores de glicose (*Salmonellas spp.*, *Shigellas spp.* e *Escherichia coli*) e não fermentadores de glicose (*Pseudomonas aeruginosa*), e as bactérias com morfologia cocobacilar (*Chromobacterium violaceum*). Estas morfologias estão demonstradas na figura 10, para melhor compreensão.



**Figura 10** – Bactérias Gram-negativas: (1) *Escherichia coli*; (2) *Pseudomonas aeruginosa*; (3) *Chromobacterium violaceum*

**FONTE-** (1) Retirada de <[http://www.artigosobre.com/ Escherichiacoli](http://www.artigosobre.com/Escherichiacoli)>. Acesso em: 04 de abril de 2010

(2) Retirada de <[http:// www.sciencemusings.com](http://www.sciencemusings.com)>. Acesso em: 04 de abril de 2010

(3) Retirada de <<http://www.redetec.org.br>>. Acesso em: 10 de março de 2010

### 1.2.2.1 Bacilos Gram-negativos fermentadores da glicose

*Salmonellas spp.*, *Shigellas spp.* e *Escherichia coli* são bactérias Gram-negativas que fazem parte da família Enterobacteriaceae, esta constitui a maior e mais heterogênea família de bacilos Gram-negativo fermentadores de glicose de importância médica (MURRAY *et al.*, 2004). São agentes de diarreia, principalmente em países pobres e em desenvolvimento, além disto, podem desencadear problemas de saúde devido à produção de aminas biogênicas, a putrescina e a cadaverina, a partir da degradação de alimentos (LORENZO *et al.*, 2010; SUDHA *et al.*, 2010). Todas as espécies podem crescer rapidamente em condições aeróbias e anaeróbias, gerar energia por fermentação da glicose e redução de nitratos a nitritos, não formam esporos e possuem exigências nutricionais simples (KONEMAM *et al.*, 1989; MURRAY *et al.*, 2004; STROHL *et al.*, 2004).

### 1.2.2.1.1 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* é formado por bacilos Gram-negativos, consiste de cinco espécies, das quais a *Escherichia coli* é a mais comum e clinicamente importante. As cepas que causam gastroenterite aguda no intestino são subdivididas em seis grupos, entre estes o presente estudo abordou: enteropatogênica, enteroagregativa, entero-hemorrágica e difusa aderente (MURRAY *et al.*, 2004):

- a) *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é um importante agente diarreioagênico, responsável por diarreia infantil, principalmente em países em desenvolvimento, mas também nos países industrializados (SUDHA *et al.*, 2010). A doença é caracterizada pela ligação das bactérias às células epiteliais do intestino delgado com subsequente destruição das microvilosidades (MURRAY *et al.*, 2004; STROHL *et al.*, 2004).
- b) *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é responsável por diarreia aquosa persistente com desidratação em lactantes de países em desenvolvimento. Atua estimulando a secreção de muco, que captura as bactérias em um filme que reveste o epitélio do intestino delgado, levando ao encurtamento das microvilosidades, a infiltração de mononucleares e hemorragia (MURRAY *et al.*, 2004).
- c) As cepas de *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) causam uma doença que varia de diarreia branda sem complicações até a colite hemorrágica, levando a lesão da mucosa intestinal (SUDHA *et al.*, 2010). São mediadas pelas toxinas de Shiga, com paralisação da síntese de proteínas, com destruição das microvilosidades intestinais resultando em decréscimo da absorção (MURRAY *et al.*, 2004).

- d) *E. coli* difusa aderente (DAEC) estimula o alongamento das microvilosidades com as bactérias alojadas na membrana celular, a doença resultante é uma diarreia aquosa observada principalmente em crianças entre 1 a 5 anos de idade (MURRAY *et al.*, 2004).

#### 1.2.2.1.2 *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*

O gênero *Salmonella* consiste de duas espécies: a *Salmonella enterica* e a *Salmonella bongori*, sendo descritos 2.463 sorogrupos peculiares. O sorogrupo *Salmonella enterica* subespécie *Arizonae* é um bacilo Gram-negativo com distintas características bioquímica, conhecido por causar infecção em répteis e outros animais (WEISS *et al.*, 1986; MURRAY *et al.*, 2004; HOAG; SESSLER, 2005). Pode ser transmitido a seres humanos através do contato direto ou indireto com répteis, provocando gastroenterite e ocasionalmente levando a bacteremia, osteomielite e meningite. Por não existir relatos de infecções em pessoas saudáveis deve-se avaliar o estado imune do paciente (HOAG; SESSLER, 2005; HOPKINS *et al.*, 2009).

#### 1.2.2.1.3 *Shigella* spp.

O gênero *Shigella* possui quatro espécies, constituídas de mais de 45 sorogrupos com base no antígeno O: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*. São bastonetes Gram-negativos, em formas cocobacilares em culturas jovens (JAWETZ *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2004). O habitat natural das *Shigellas* limita-se ao trato intestinal dos seres humanos e de outros primatas. *Shigella* spp. proporciona o processo infeccioso ao invadir e se replicar nas células que revestem a mucosa colônica. Alguns sorotipos podem levar a doença clínica com

apenas dez bacilos e o traço característico da virulência é codificado por um plasmídeo responsável pela ativação da produção da toxina de Shiga (MURRAY *et al.*, 2004; STROHL *et al.*, 2004; SUDHA *et al.*, 2010).

#### 1.2.2.2 Bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose diferem das enterobactérias por utilizarem os carboidratos através do metabolismo respiratório (MURRAY *et al.*, 2004). São considerados patógenos oportunistas, responsáveis por infecção hospitalar, apresentam a capacidade de tolerar substâncias biocidas como os desinfetantes. Sua menor suscetibilidade em relação às bactérias Gram-positivas está relacionada à presença da membrana externa, de natureza lipoprotéica, que age como uma barreira (MIYAGI *et al.*, 2000).

##### 1.2.2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* causa infecções oportunistas, isto é, restrita a pacientes com defesas comprometidas. Além disso, crescem facilmente em ambientes úmidos hospitalares, o que contribui para o fato de ser um dos principais agentes de infecção hospitalar (STROHL *et al.*, 2004; MURRAY *et al.*, 2004).

São bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos, com flagelos polares que lhes conferem movimento. Crescem facilmente em diversos meios de cultura, produzindo às vezes odor adocicado ou semelhante à uva. Produz pigmentos difundíveis verdes e azuis (pioverdina e piocianina, respectivamente) e também pode produzir pigmentos vermelhos e negros (JAWETZ *et al.*, 1998; STROHL *et al.*, 2004).



### 1.2.2.3 Cocobacilo Gram-negativo

Estudos demonstram o potencial biotecnológico de cepas de cocobacilos Gram-negativos no desenvolvimento de medicamentos e no tratamento de resíduos industriais, na absorção de metais pesados e tóxicos (GHAFOURIAN *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2009).

#### 1.2.2.3.1 *Chromobacterium violaceum*

*Chromobacterium violaceum* é um cocobacilo Gram-negativo, capaz de sobreviver sob condições ambientais adversas. Considerado um agente patogênico para os seres humanos e animais, com vários casos de infecção em áreas tropicais e subtropicais (BECKER *et al.*, 2009). Apresenta um grande potencial biotecnológico, pois produz um pigmento violeta que apresenta atividade bactericida, tumoricida, tripanocida e leishmanicida (LOPES *et al.*, 2009).

## 1.3 METODOLOGIAS DO ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Em vista das diversas metodologias disponíveis, ao se estudar a atividade biológica de uma planta devem ser considerados vários fatores para a seleção do modelo biológico adequado de estudo. Não obstante, devem ser analisados criteriosamente antes de fazer tal escolha: a quantidade de material vegetal disponível para a realização do estudo, a simplicidade, sensibilidade, seletividade e a reprodutibilidade do teste (MACIEL *et al.*, 2002; CALIXTO, 2001; SCORZONI *et al.*, 2007).

Usualmente, são feitas triagens com modelos experimentais menos complexos, os dois métodos mais comumente utilizados para o rastreio de extratos de plantas com potencial antibacteriano são o de difusão em Agar e de diluição em caldo (ALVES *et al.*, 2008).

Ambos os métodos têm sido utilizados com a finalidade de medir com precisão a atividade antibacteriana e são rotineiramente utilizados em testes de suscetibilidade antimicrobiana. Porém, no caso da procura de princípios ativos é interessante descobrir compostos que apresente atividade biológica, daí a importância e necessidade de estudos fitoquímicos monitorados por bioautografia. Este método tem importância particular na pesquisa de compostos antimicrobianos vegetais, pois permite a localização direta dos constituintes ativos a partir de uma matriz complexa (HOSTETTMANN; MARSTON, 1994; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001).

### 1.3.1 Método de difusão em Agar

Os ensaios de difusão em ágar são testes qualitativos valiosos na detecção da atividade antibacteriana de uma determinada substância frente a um micro-organismo padrão. O fundamento do ensaio consiste na difusão de uma substância em um meio de cultura sólido e inoculado com um micro-organismo. A partir da difusão, ocorre o aparecimento de um halo onde não há o crescimento microbiano, denominado halo de inibição. O diâmetro deste halo pode ser mensurado, com o auxílio de régua, paquímetro ou leitor de halos (WOODS; WASHINGTON, 1999; OPLUSTIL *et al.*, 2004; MURRAY *et al.*, 2004; ROSSI; ANDREAZZI, 2005; ALMEIDA, 2007).

Diferentes tipos de reservatórios para a substância antimicrobiana podem ser empregados, incluindo disco de papel, cilindros de porcelana, de vidro, de alumínio ou de aço inoxidável e também, orifícios perfurados no meio de cultura (WOODS; WASHINGTON, 1999; OPLUSTIL *et al.*, 2004; ROSSI; ANDREAZZI, 2005; ALMEIDA, 2007).

Com a finalidade de facilitar a interpretação dos resultados pode ser adicionado ao meio com crescimento bacteriano o indicador redox cloreto de 2,3,5 – trifeniltetrazólio (CTT).

Por meio de uma reação colorimétrica pode ser observado o crescimento bacteriano, que resulta em uma cor vermelha, além disto, é considerado um método confiável e de fácil execução (LEE *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Método de bioautografia

A bioautografia é uma técnica qualitativa que conjuga técnicas de separação e detecção da atividade biológica, permitindo-se obter com maior rapidez informações preliminares sobre constituintes em amostras complexas como extratos vegetais (HADACEK; GREGER, 2000; SIMÕES *et al.*, 2004; VALGAS *et al.*, 2007). Os compostos são separados por cromatografia em camada delgada (CCD) e colocados por contato ou imersão em placas de ágar, previamente inoculados com o micro-organismo teste (ALMEIDA, 2007).

Os compostos separados na cromatoplaça apresentam uma distância relativa que é constante, independente das dimensões da placa, desde que se usem o mesmo sistema de solventes, mesmo tipo de placa e mesma temperatura de corrida. A esta distância relativa percorrida denomina-se fator de retenção (Rf). Algumas substâncias, por terem mais afinidade pela fase móvel (solvente), migram mais e têm Rfs maiores e aquelas com mais afinidade pela fase não-móvel (sílica) migram menos e têm Rfs menores (ROMEIRO, 2001).

O princípio do ensaio de bioautografia fundamenta-se na aplicação sobre uma placa desenvolvida de CCD de uma suspensão de um micro-organismo, a sua incubação em um ambiente úmido permitindo o crescimento da bactéria inoculada. Zonas de inibição são visualizadas utilizando-se um reagente, o sal de tetrazólio. As bactérias metabolicamente ativas convertem o sal para um formazan intensamente colorido, assim, os compostos antibacterianos aparecem como manchas claras contra um fundo colorido (HAMBURGER; GORDELL, 1987; VALGAS *et al.*, 2007). O bioensaio que envolve a bioautografia é

altamente eficiente, por ser de fácil execução, suficientemente sensível para detectar mínimas quantidades de substâncias antimicrobianas, apresentar alta precisão e reprodutibilidade e, por último, mas talvez mais importante, detectar apenas substâncias antimicrobianas (ROMEIRO, 2001).

### 1.3.3 Método de diluição em caldo

Os métodos de diluição são ensaios quantitativos nos quais as substâncias a serem avaliadas são adicionadas a meios líquidos (caldo) ou sólidos, previamente inoculados com o micro-organismo. Para a visualização do crescimento bacteriano, pode ser incorporado ao meio um indicador de crescimento celular. A resazurina permite a detecção de crescimento microbiano em um pequeno volume de solução, como o que ocorre em placa de microtitulação, viabilizando a análise dos resultados, sem a necessidade de utilizar espectrofotômetro (SARKER *et al.*, 2007). Através de uma reação de oxidação-redução, a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto a cor vermelha indica a presença de células viáveis em crescimento (ALVES *et al.*, 2008).

Por meio da técnica de microdiluição em caldo, pode ser determinada a concentração inibitória mínima. Este é um teste de susceptibilidade quantitativo, que além de ser mais sensível que o teste de difusão na detecção da atividade antimicrobiana, é considerado padrão para determinar a menor concentração do agente químico capaz de inibir completamente o crescimento do micro-organismo em placa de microtítulo em um tempo específico, chamada de concentração inibitória mínima (CIM) (OPLUSTIL *et al.*, 2004; ROSSI; ANDREAZZI, 2005; ALMEIDA, 2007; SCORZONI *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007; SULTANBAWA *et al.*, 2009).

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos das espécies *Paullinia cupana* Kunth e *Ptychopetalum olacoides* Benth contra as linhagens de: *S. aureus* metilina sensível (MSSA) (ATCC 25923), *S. aureus* resistente a metilina (MRSA) (ATCC 33591), *B. cereus* (ATCC 9634), *B. licheniformis* (isolado clínico), *S. mutans* (ATCC 624), *Shigella* spp. (ATCC M90T), *S.arizonae* (isolado clínico), *E. coli* (grupos: EPEC, EAEC, EHEC e DAEC), *P. aeruginosa* (PaO1) e *C. violaceum* (ATCC 12472).

### 2.2 Objetivos específicos

- Realizar triagem da atividade antibacteriana dos extratos das espécies vegetais *Paullinia cupana* Kunth e *Ptychopetalum olacoides* Benth.
- Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos bioativos que apresentaram potencial antibacteriano com a finalidade de selecionar os extratos com maior atividade.
- Realizar a dissociação dos extratos ativos por cromatografia em camada delgada para selecionar por bioautografia frações bioativas.
- Avaliar o potencial antibacteriano da fração semipurificada contra as bactérias sensíveis ao extrato.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Material Vegetal

As amostras de *Paullinia cupana* (Kunth) variedade *sorbilis* e *Ptychopetalum olacoides* foram adquiridos de produtores locais da região de Maués, Amazonas. No Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-Bioma) o material foi devidamente processado. O material triturado da semente do guaraná e da raiz da marapuama foi submetido a sucessivas extrações, com solventes de diferentes polaridades, obtendo-se ao final, os extratos: aquoso, hidroalcoólico, etanólico e hexânico, em acetato de etila e metanólico (CECHINEL FILHO; YUNES, 2001).

#### 3.1.1 Extração do material vegetal

O método utilizado para obtenção dos extratos foi a “extração sólido/líquido”, sendo que, os extratos foram submetidos a duas operações, a infusão e maceração. (FALKENBERG, 2004; SONAGLIO *et al.*, 2004). Para melhor entendimento, os procedimentos realizados estão descritos abaixo e um fluxograma do processo extrativo foi mostrado no **Esquema 01 e 02**.

- **Extrato hidroalcoólico:** Os extratos hidroalcoólicos foram obtidos por meio de três macerações consecutivas (remaceração) do material vegetal. Inicialmente foram pesados em balança analítica 20 gramas do material vegetal (guaraná e marapuama) em pó, depositados em erlenmeyer e adicionado 100 mL do líquido extrator (etanol/água [70/30], v/v). Esse sistema extrativo permaneceu em repouso a temperatura ambiente, por três dias,

decorrido este período, filtrou-se o sobrenadante e submete-o ao evaporador rotativo com pressão reduzida em temperatura de aproximadamente 45 °C para a evaporação do solvente, utilizando-se para isto, um rotaevaporador da marca Fisaton.

O resíduo da extração foi ressuspensionado em 100 mL do mesmo líquido extrator, deixado em repouso por três dias, em seguida foi filtrado e concentrado por rotaevaporador. Finalizando o processo extrativo, o resíduo foi novamente ressuspensionado em 100 mL do líquido extrator, deixado em repouso por três dias, filtrado e concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador a vácuo, seguido por liofilização, ao final obteve-se o extrato hidroalcoólico.

**Extrato etanólico:** Os extratos etanólicos foram obtidos por meio de três macerações consecutivas (remaceração) do material vegetal. Inicialmente foram pesados em balança analítica 20 gramas do material (guaraná e marapuama) em pó, depositados em erlenmeyer e adicionado 100 mL do líquido extrator, o etanol. Esse sistema extrativo permaneceu em repouso a temperatura ambiente, por três dias, decorrido este período, filtrou-se o sobrenadante e submete-o ao evaporador rotativo com pressão reduzida em temperatura de aproximadamente 45 °C para a evaporação do solvente. O resíduo da extração foi ressuspensionado em 100 mL do mesmo líquido extrator, deixado em repouso por três dias, em seguida foi filtrado e concentrado por rotaevaporador. Finalizando o processo extrativo, o resíduo foi novamente ressuspensionado em 100 mL do líquido extrator, deixado em repouso por três dias, filtrado e concentrado por rotaevaporador, ao final obteve-se o extrato etanólico.

- **Extrato hexânico:** Os extratos hexânicos foram obtidos por meio de três macerações consecutivas do material vegetal. Inicialmente foram pesados em balança analítica 20 gramas do material (guaraná e marapuama) em pó, depositados em erlenmeyer e adicionado 100 mL do líquido extrator, o hexano. Esse sistema extrativo permaneceu em

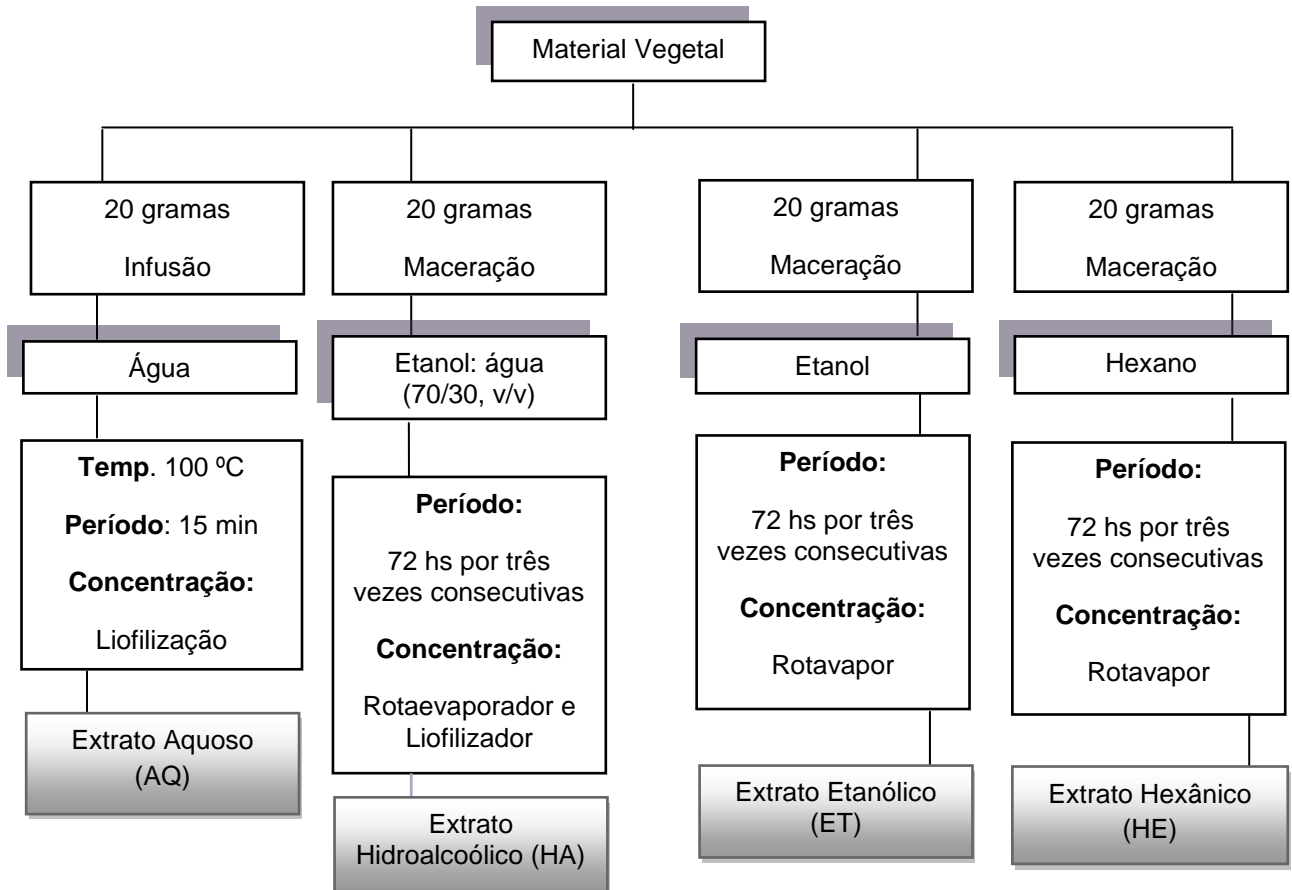
repouso a temperatura ambiente, por três dias, decorrido este período, filtrou-se o sobrenadante e submeteu-o ao evaporador rotativo com pressão reduzida em temperatura de aproximadamente 45 °C para a evaporação do solvente. O resíduo da extração foi ressuspensão em 100 mL do mesmo líquido extrator, deixado em repouso por três dias, após, foi filtrado e concentrado por rotaevaporador. Finalizando o processo extrativo, o resíduo foi novamente ressuspensão em 100 mL do líquido extrator, deixado em repouso por três dias, filtrado e concentrado por rotaevaporador, ao final obteve-se o extrato hexânico.

- **Extrato em acetato de etila:** Os extratos de acetato de etila foram obtidos por meio de três macerações consecutivas do resíduo obtido em hexano (obtido ao final do processo de extração do material vegetal com hexano). Este resíduo foi ressuspensão em 100 mL de acetato de etila (líquido extrator) e deixado em repouso, a temperatura ambiente, por três dias, ao final, filtrou-se e concentrou-se sob pressão reduzida em rotaevaporador a vácuo. O resíduo da extração foi novamente ressuspensão em 100 mL de acetato de etila, deixado em repouso por três dias, filtrado e concentrado por rotaevaporador. Finalizando o processo extrativo, o resíduo foi novamente ressuspensão em 100 mL do líquido extrator, deixado em repouso por três dias, decorrido este período, foi filtrado e concentrado por rotaevaporador, ao final obteve-se o extrato acetato de etila.
- **Extrato metanólico:** Os extratos metanólicos foram obtidos por meio de três macerações consecutivas do resíduo obtido em acetato de etila (obtido ao final do processo de extração do material vegetal com acetato de etila). Este resíduo foi ressuspensão em 100 mL de metanol (líquido extrator) e deixado em repouso, a temperatura ambiente, por três dias, ao final, filtrou-se e concentrou-se sob pressão reduzida em rotaevaporador a vácuo.

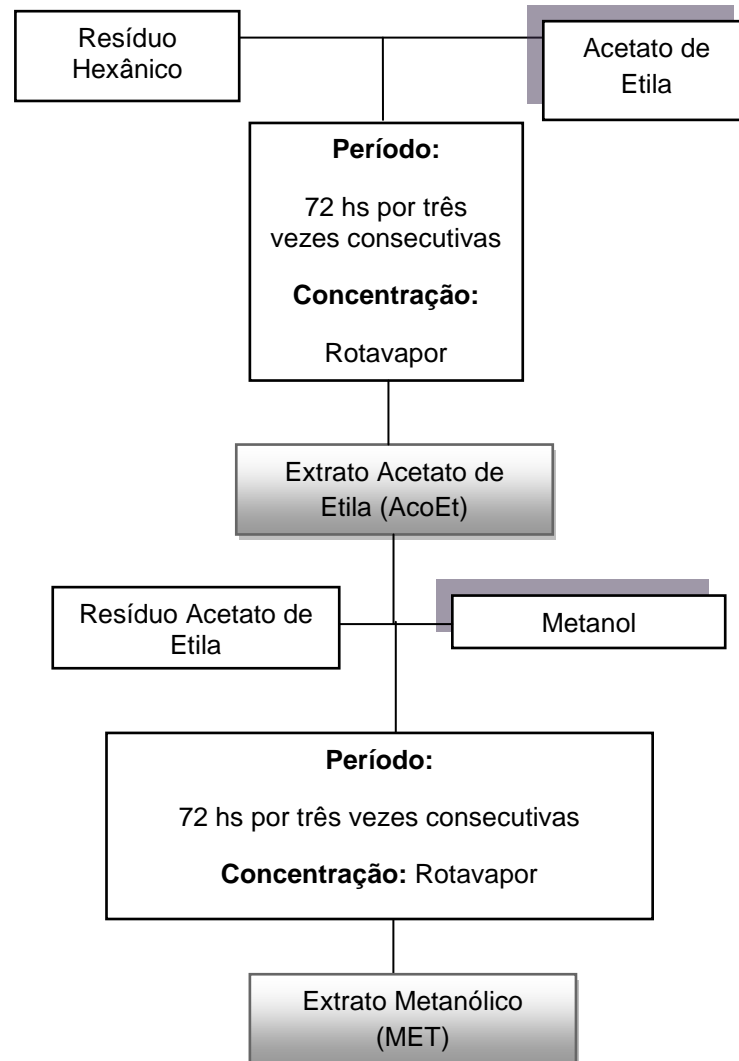


O resíduo da extração foi novamente ressuspensão em 100 mL de metanol, deixado em repouso por três dias, filtrado e concentrado por rotaevaporador. Finalizando o processo extrativo, o resíduo foi ressuspensão em 100 mL do líquido extrator, deixado em repouso por três dias, decorrido este período, foi filtrado e concentrado por rotaevaporador, ao final obteve-se o extrato metanólico.

- **Extrato aquoso:** Os extratos aquosos foram obtidos pelo processo de infusão, onde inicialmente pesou-se em balança analítica a massa equivalente a 20 gramas de cada material vegetal (guaraná e marapuama) em pó e depositou em erlenmeyer, deixando em contato durante 15 minutos com 100 mL do líquido extrator, água destilada a 100 °C. A concentração do extrato foi obtida através da liofilização, utilizando para isto um liofilizador LS3000 (Terroni equipamentos LTDA), em um período de 18 horas.



**Esquema 1** - Organograma da extração sequencial do material vegetal



**Esquema 2** - Organograma da extração seqüencial do resíduo hexânico

### 3.1.2 Cálculo do rendimento obtido com a extração

Após a obtenção dos extratos pelo processo de infusão e maceração foram calculados os rendimentos obtidos a partir de cada amostra. O rendimento foi calculado em gramas, em relação à massa do material vegetal utilizado no processo extrativo, isto é, 20 gramas.

### 3.1.3 Soluções extrativas

- **Ensaio de difusão em ágar:** Soluções contendo diferentes concentrações dos extratos: 10 mg/mL, 30 mg/mL e 100 mg/mL. O extrato aquoso foi dissolvido em água estéril. Os extratos etanólico, metanólico, hidroalcoólico e em acetato de etila foram dissolvidos em metanol 10 %, e o extrato hexânico foi dissolvido em DMSO 1 %. Posteriormente, as soluções foram misturadas em vórtex e dissolvidas em banho seco a 40 °C.
- **Ensaio de microdiluição em caldo:** Prepararam-se soluções dos extratos na concentração de 100 mg/mL e 10 mg/mL. O extrato aquoso foi dissolvido em água estéril. Os extratos etanólico, metanólico, hidroalcoólico e em acetato de etila foram dissolvidos em metanol 10 %. As soluções foram misturadas em vórtex e dissolvidas em banho seco a 40 °C.
- **Ensaio de bioautografia:** Preparou-se a solução do extrato hidroalcoólico do guaraná na concentração de 50 mg/mL, dissolvendo-se 50 mg do extrato hidroalcoólico em 1 mL de metanol. Foi preparada também uma solução do extrato em acetato de etila da marapuama, dissolvendo-se 50 mg do extrato em um mililitro de metanol 10 %.

## 3.2 Avaliação da atividade antibacteriana

Os ensaios da atividade antibacteriana foram realizados no Instituto Leônidas e Maria Deane (Fiocruz-Amazonas). Com a finalidade de detectar a atividade antibacteriana, os extratos foram submetidos ao teste de difusão em poço e em disco, frente a linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas. As amostras que apresentaram atividade foram estudadas por meio do teste de microdiluição em caldo e bioautografia. Os métodos cromatográficos foram realizados no Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônica (Q-Bioma-UFAM). Ao final obteve-se uma fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná que foi submetido ao teste de microdiluição em caldo (**Esquema 03**).

### 3.2.1 Materiais

Os meios de cultura, controles e reagentes utilizados nos ensaios da atividade antibacteriana foram: ágar Mueller Hinton (HIMEDIA) (**Tabela 01**), Caldo de Luria Bertani, Müeller (LLB) (HIMEDIA) (**Tabela 02**), meio definitivo bacteriológico (**Tabela 03**), cloreto de trifeniltetrazólio (INPEX), resazurina (INPEX), sílica G TLC plates w/uv 254 (Sorbent Technologies) e disco de papel (mini blot size – Bio-Rad).

**Tabela 01.** Preparo do meio Agar Mueller Hinton (MH)

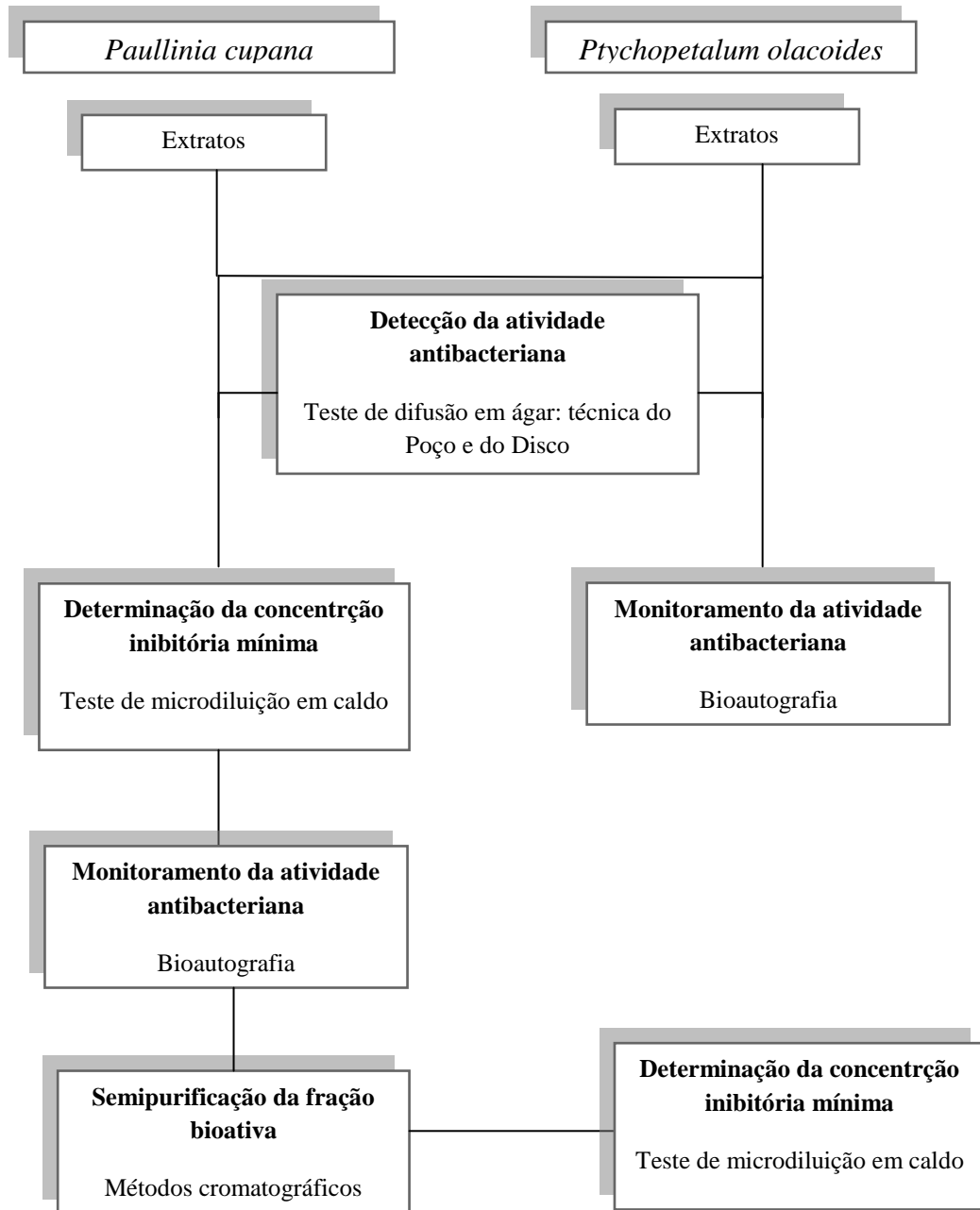
<b>Extrato de Carne Hidrolisado de Caseína</b>	<b>2,0 g</b>
<b>Ácido casamino – Difco ou equivalente</b>	<b>17,5 g</b>
<b>Amido Solúvel</b>	<b>1,5 g</b>
<b>Agar</b>	<b>17 g</b>
<b>Suspender 38 g em 1000 mL de água destilada. Dissolver o meio e esterelizar por autoclavar por 15 minutos a 121°C</b>	

**Tabela 02.** Preparo do caldo Luria Bertani Broth, Miller (LLB)

<b>Enzima caseína hidrolisada</b>	<b>10 g</b>
<b>Extrato de levedura</b>	<b>5 g</b>
<b>Cloreto de sódio</b>	<b>10 g</b>
<b>Ressuspender 40 g em 1000 mL de água destilada. Dissolver completamente e esterilizar por autoclavar por 15 minutos a 121°C</b>	

**Tabela 03.** Preparo do meio definitivo bacteriano

<b>Proteose peptona</b>	<b>2 g</b>
<b>Cloreto de sódio</b>	<b>0,6 g</b>
<b>Extrato de carne</b>	<b>0,8 g</b>
<b>Agar bacteriológico</b>	<b>2,2 g</b>
<b>Água Destilada</b>	<b>200 mL</b>
<b>Dissolver completamente e esterilizar por autoclavar por 15 minutos a 121°C</b>	



**Esquema 03** – Esquema geral dos ensaios

### 3.2.2 Amostras bacterianas testadas

A atividade antimicrobiana foi estudada frente a um conjunto de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. As bactérias foram mantidas a temperatura ambiente, em meio definitivo bacteriano. As linhagens Gram-positivas foram: *Staphylococcus aureus* metilina sensível (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* metilina resistente (ATCC 33591), *Bacillus cereus* (ATCC 9634.), *Bacillus licheniformis* (isolado clínico) e *Streptococcus mutans* (ATCC 624). Já as linhagens Gram-negativas foram: *Shigella spp.* (ATCC M90T), *Salmonella arizonae* (isolado clínico), *Escherichia coli* (grupos: EPEC: E2348/60, EAEC: 042, EHEC: 0157:H7 e DAEC: C1842), *Pseudomonas aeruginosa* (PaO1) e *Chromobacterium violaceum* (ATCC 12472).

### 3.2.3 Padronizações

- **Escala 0,5 de McFarland:** Preparou-se a escala 0,5 McFarland conforme descrito por Bier (1985) onde foram adicionados 1,5 mL de cloreto de bário a 1% em 29,85 mL de ácido sulfúrico a 1 %. Calibrou-se a transmitância a 100 % em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm, com água destilada, a escala apresentou uma transmitância de 88 %.
- **Suspensão bacteriana:** As linhagens bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas desenvolveram-se a 37 °C durante 18 horas em caldo Luria Bertani, Miller (LLB). A partir deste material foram preparadas suspensões na concentração final de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, utilizando-se para isto, a escala 0,5 de McFarland.



- **Soluções controles (positivo e negativo):** Como substância controle com atividade antibacteriana já comprovada foi utilizado contra as bactérias os quimioterápicos vancomicina e imipenem associado à cilastatina. Para o preparo procedeu-se dissolvendo 1mg do antibacteriano em 1 mL de água destilada e esterilizada. Como controle negativo foi preparado uma solução de metanol a 10 % em água destilada e esterilizada e uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 % em água destilada e esterilizada.
- **Reveladores biológicos:** Para o preparo do revelador cloreto de trifeniltetrazólio dissolveu-se 50 mg de ágar bacteriológico em 100 mL de água destilada e procedeu-se a esterilização, em autoclave por 15 minutos a 121 °C. Na sequência foram adicionados 500 mg do cloreto de trifeniltetrazólio e dissolvido por agitação mecânica. A resazurina foi preparada dissolvendo-se 1 mg desta em 100 mL de água destilada e esterilizada (ALVES *et al.*, 2008).

### 3.3 Método de difusão em Ágar

Por se tratar de ensaios qualitativos, os resultados obtidos no presente trabalho foram reportados como positivo, quando demonstrou atividade antibacteriana, e negativo, quando não foi verificada a inibição do micro-organismo (CABRAL, 2008; PACHECO, 2009). Pois, segundo Duarte (2006) não existe um consenso sobre o nível de inibição recomendada para os produtos naturais, quando comparado com os antibióticos-padrão.

Deve-se ressaltar que a inibição do crescimento bacteriano (diâmetro do halo) em um ensaio depende de múltiplos fatores além da presença de compostos fitoquímicos ativos, entre ele pode-se citar: a capacidade de difusão do extrato no meio de cultura, a origem do micro-organismo, o pH do substrato, a densidade do inóculo e o crescimento e atividade metabólica

do micro-organismo no meio de cultura (PAULI *et al.*, 2005; ALMEIDA, 2007; CARNEIRO *et al.*, 2008).

### 3.3.1 Técnica de difusão em poço

Realizou-se este ensaio com a finalidade de determinar a atividade antibacteriana dos extratos de *Paullinia cupana* e *Ptychopetalum olacoides*, com base na técnica de difusão em ágar, utilizando com reservatório dos extratos poços perfurados no meio de cultura, foi adaptado de Alves *et al.*, (2008) e de Bhattacharjee *et al.*, (2006) (**Esquema 03 e 04**). Todas as etapas do procedimento foram realizadas em condições assépticas e em triplicata.

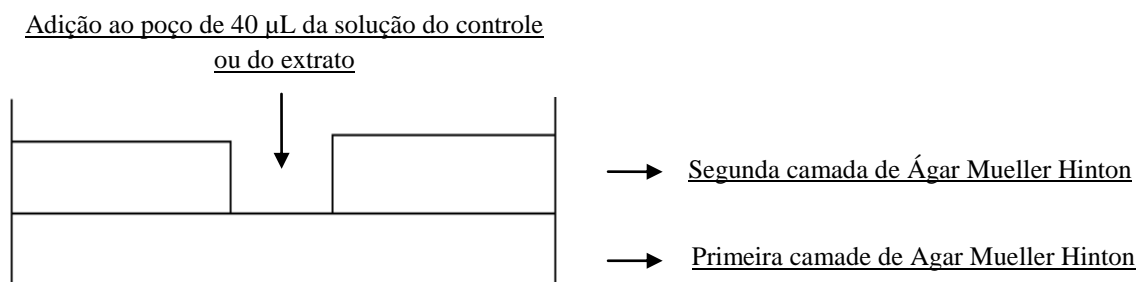
#### A) Preparo da dupla camada de meio de cultura

- Preparou-se o ágar Mueller Hinton conforme especificação do fabricante, a seguir dispensou-se 10 ml do meio de cultura em cada placa de Petri (90 x15 mm).
- Esterilizaram-se tubos de ensaio com tampa de rosca, no qual se dispensou 7,5 mL do Ágar Mueller Hinton (Agar MH) esterilizado. Os tubos foram deixados em repouso para esfriar até a temperatura ambiente de aproximadamente 50 °C. Em seguida, foram esterilizados, também, tubos de ensaio com tampa de rosca, no qual se dispensou 2,5 mL do Ágar Mueller Hinton esterilizado. Os tubos foram deixados em repouso para esfriar até a temperatura ambiente de aproximadamente 50 °C.
- Com o auxílio de uma micropipeta com ponteira esterilizada, transferiu-se as bactérias para o tubo de ensaio contendo 2,5 mL do caldo Mueller Hinton (Caldo MH), até atingir a turvação correspondente à escala 0,5 de McFarland.

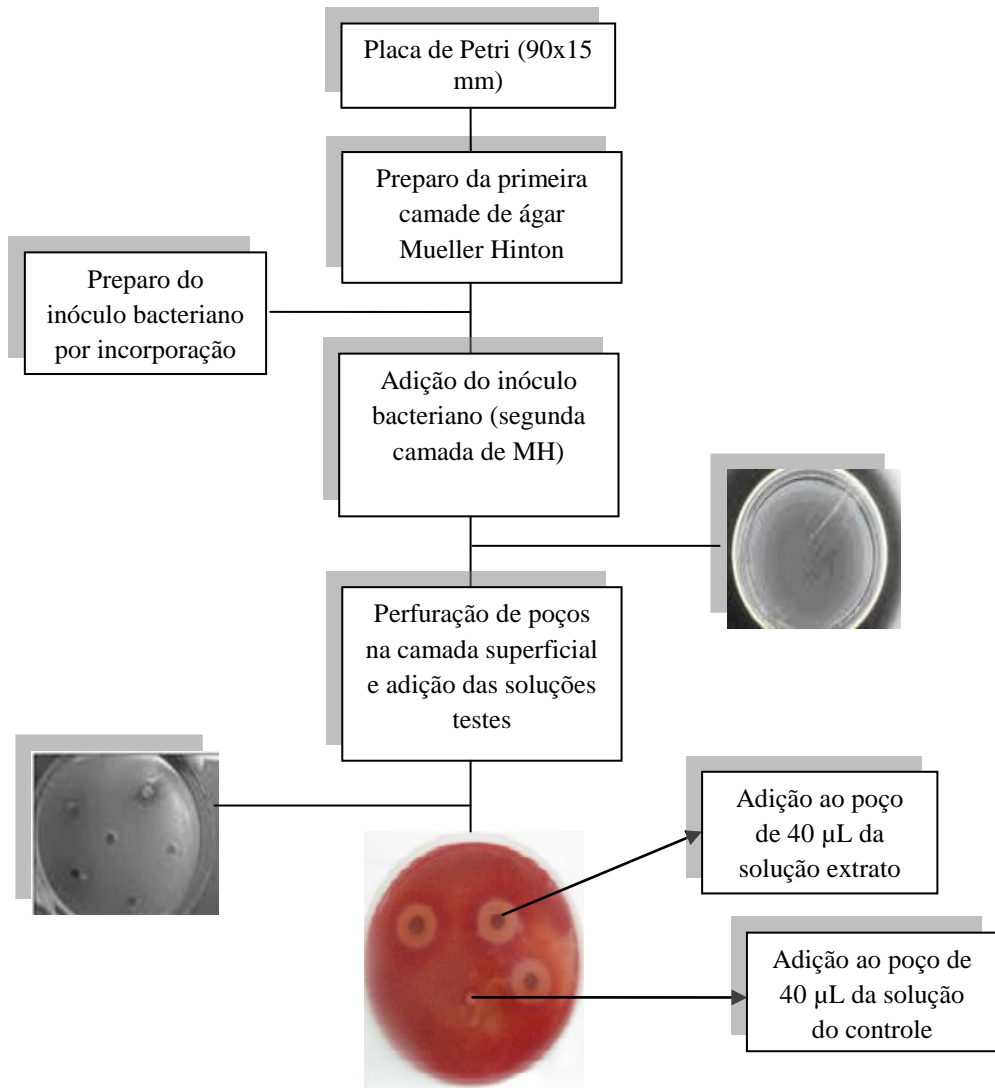
- Incorporou-se o inóculo bacteriano a outros 7,5 mL de meio Ágar MH, imediatamente após o preparo do inóculo. Em seguida, dispensou-se sobre a placa de Petri já com a primeira camada de ágar e deixou-se em temperatura ambiente para solidificar.

#### B) Preparo das placas e leitura dos resultados

- Os poços foram confeccionados apenas na camada superficial do ágar, com auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada.
- Nos poços, devidamente identificados, dispensou-se 40  $\mu$ L dos controles positivo e negativo, assim como de cada extratos (0,4 mg, 1,2 mg e 4 mg ), utilizando-se para isto uma micropipeta.
- Colocou-se um papel de filtro estéril entre a placa e a tampa, para evitar a água de condensação.
- Deixou-se a placa em temperatura ambiente durante 2 horas para a solução ser absorvida pelo ágar, antes do crescimento microbiano.
- Após 18 horas de incubação a 36 °C foi vertido sobre cada placa 7 mL do revelador cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) em gel de ágar bacteriológico a 0,5 %, a fim de otimizar a visualização dos halos. As placas foram reincubadas por 30 minutos e a presença ou ausência dos halos foi descrito.



**Esquema 04.** Dupla camada de Ágar MH. Adição da solução do extrato no poço confeccionado na segunda camada de Ágar (inoculado com a suspensão bacteriana).



**Esquema 05** – Método de difusão em Ágar - utilizando como reservatório do extrato poços confeccionados no meio de cultura.

### 3.3.1.1 Técnica de difusão em disco

Está técnica foi realizada com a finalidade de determinar a atividade antibacteriana dos extratos de *Paullinia cupana* e *Ptychopetalum olacoides*, por meio do teste de difusão em Agar, utilizando como reservatório do extrato discos de papel, foi adaptado de Alves *et al.* (2008) e Bhattacharjee *et al.*, (2006) (**Esquema 05**). Todas as etapas do procedimento foram realizadas em condições assépticas e em triplicata.

#### A) Disco de papel absorvente

- Foram utilizados discos de papel de filtro (Macherey-Nrgel) seco, esterilizados por autoclavação, acondicionados dentro de placas de Petri, medindo seis milímetros de diâmetro.
- As amostras questionadas foram homogeneizadas por agitação mecânica. Utilizando-se de uma micropipeta foram transferidas para cada disco de papel as soluções dos extratos e dos controles. Os disco foram impregnados com 30µL da solução do extrato, contendo 0,3 mg, 0,9 mg e 3 mg e 30µL das solução do controle, após, aguardou-se a evaporação do solvente.

#### B) Preparo do meio de cultura

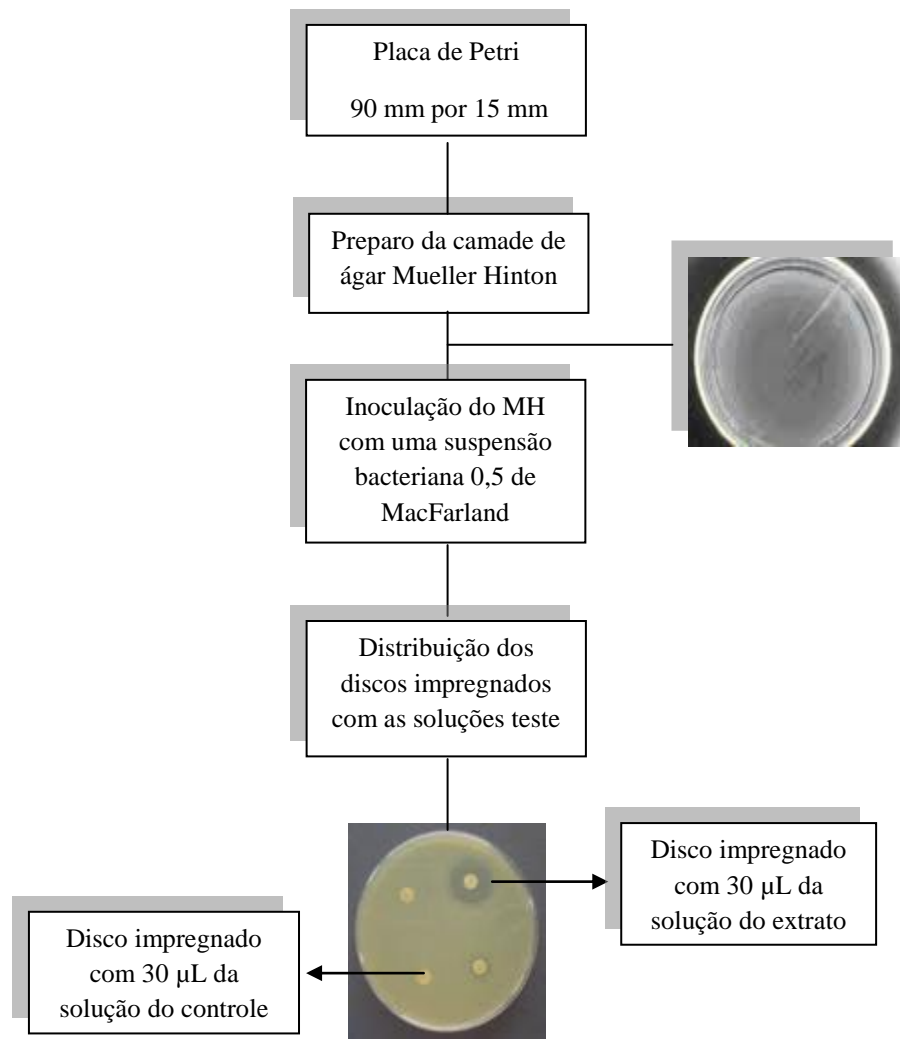
- Preparou-se o meio ágar Müeller Hinton, conforme especificação do fabricante, após, dispensou-se o meio nas placas de Petri e armazenou-as em geladeira. As placas foram retiradas da geladeira antes do procedimento, para o meio atingir a temperatura ambiente.

### **C) Inoculação do meio de cultura**

- O Ágar Müeller Hinton foi inoculado com uma suspensão bacteriana correspondente a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A inoculação foi realizada vertendo-se sobre o meio Müeller Hinton a suspensão bacteriana, esta foi espalhada uniformemente por toda a placa, e ao final o sobrenadante foi desprezado.

### **D) Preparo das placas e leitura dos resultados**

- Utilizando-se uma pinça esterilizada, os discos previamente impregnados com as soluções-testes e controles foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do Ágar.
- As placas permaneceram durante 2 horas à temperatura ambiente para que a solução fosse absorvida pelo Ágar antes do crescimento microbiano.
- Após 18 horas de incubação a 36 °C foi vertido sobre cada placa 7 mL do revelador cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) em gel de ágar bacteriológico a 0,5 %, a fim de otimizar a visualização dos halos. As placas foram reincubadas por 30 minutos e a presença ou ausência dos halos foi descrito.



**Esquema 06** – Método de difusão em Ágar - utilizando como reservatório do extrato discos de papel.

### 3.3.3 Técnica de bioautografia

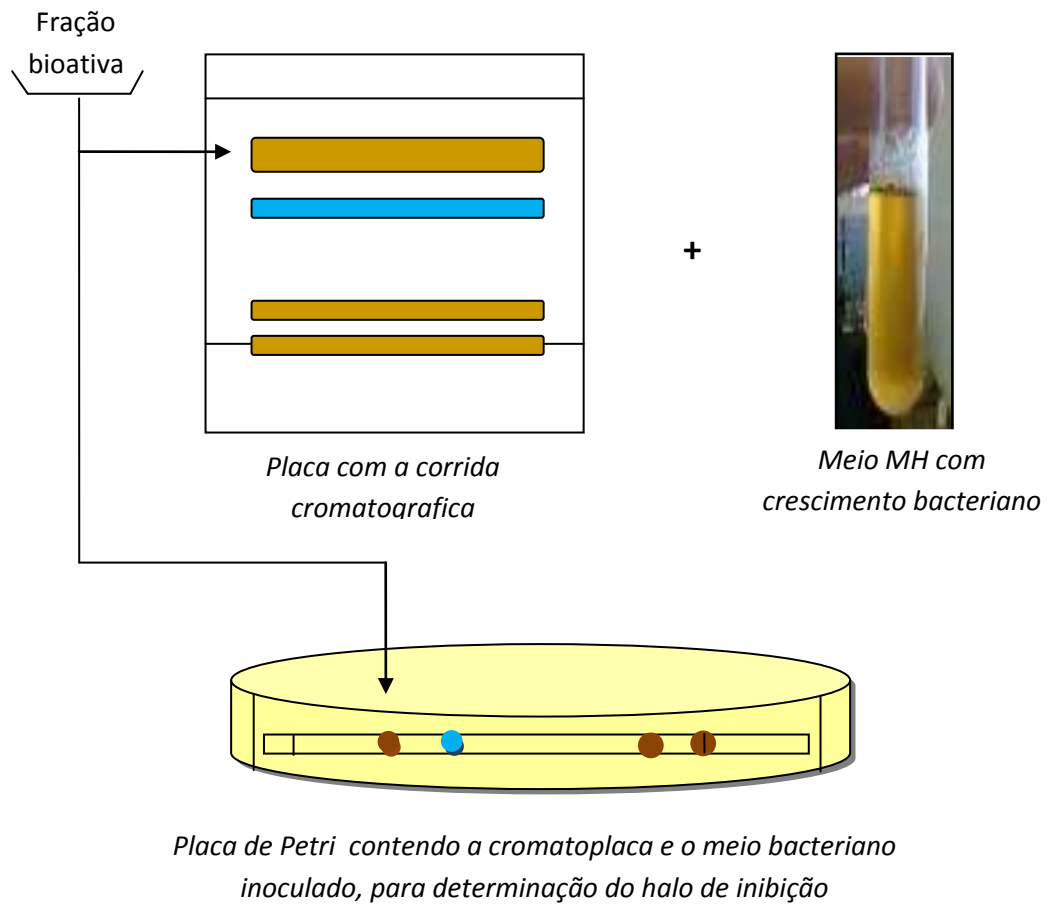
A atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólico do guaraná e em acetato de etila da marapuama foram monitorados por bioautografia, com a finalidade de obter frações semipurificadas bioativas. Técnica adaptada de Truiti *et al.*, (2003), Pessini *et al.*, (2003) e Romeiro (2001) (**Esquema 6**).

- Os extratos bioativos do guaraná e da marapuama foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), com a finalidade de determinar o eluente para a separação de seus constituintes fitoquímicos na cromatoplaca.
- Para este procedimento foram utilizadas placas de sílica Gel como fase estacionária e como eluentes foram utilizados misturas de diferentes proporções com os solventes: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, butanol, etanol, metanol, isopropanol, éter etílico, água e ácido fórmico.
- Aplicou-se à placa de cromatografia delgada (CCD) espotes dos extratos e procedeu-se a corrida cromatografia em cuba, com diferentes sistemas de eluição. Com a finalidade de revelar as manchas e faixas características das amostras incidiu sobre as cromatoplasas a luz ultravioleta com comprimento de 365 nm e a seguir foram reveladas com: vanilina / ácido sulfúrico, solução etanólica de  $\text{FeCl}_3$ , e Dragendorf.
- As placas do extrato hidroalcoólico do guaraná reveladas com Dragendorf foram comparadas com padrões alcalóide (cafeína) e as reveladas com vanilina / ácido sulfúrico foram comparadas com padrões de tanino (catequina e epicatequina)
- Para o preparo da placa cromatográfica utilizada no monitoramento da fração bioativa foram utilizados placas de cromatografia delgada (CCD) com 7 cm de comprimento, sendo 6 cm para a corrida do extrato, já o espaçamento entre as amostras (espotes) foi de



1,0 cm. Foram aplicadas na placa de cromatografia delgada (CCD) duas amostras do extrato e duas do solvente (controle negativo), e procedeu-se a corrida cromatográfica.

- Após a corrida, a placa foi cortada ao meio, obtendo-se assim duas placas, ambas com a corrida do extrato e do solvente. Um conjunto de placas foi usado como cromatograma de referência, no qual as manchas foram reveladas por vanilina / ácido sulfúrico, o outro conjunto foi revelado por meio de um revelador biológico, o cloreto de trifeniltetrazólio, usado para o monitoramento da atividade antibacteriana das amostras.
- Preparou-se o inóculo bacteriano, conforme a Escala 0,5 de McFarland, transferindo, com auxílio de uma micropipeta micro-organismos da uma suspensão bacteriana com 24 horas de crescimento, para um tubo de ensaio contendo 2,5 mL de meio Müeller Hinton (resfriados até aproximadamente 50 °C). Este foi homogeneizado e incorporado a outros 7 mL do meio MH, e vertido sobre a placa de CCD, que se encontrava dentro da placa de Petri.
- Após 18 horas de incubação a 36 °C, verteu-se sobre a placa 7 mL do revelador cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) em gel de ágar bacteriológico a 0,5 %, a fim de otimizar a visualização dos halos. As placas foram reincubadas por 30 minutos e os halos de inibição foram determinados.
- A partir da placa de bioautografia e da placa revelada com vanilina / ácido sulfúrico, foi calculado o *R<sub>f</sub>* (índice de retenção) da mancha ativa. O *R<sub>f</sub>* foi calculado dividindo-se a distância percorrida pela substância que demonstrou atividade pela distância percorrida pelo solvente. Quando a mancha apresentou-se muito grande, ou seja, circular ou alongada, tirou-se a média entre a extremidade superior e a inferior da mancha, calculando-se a distância percorrida pelo seu centro geométrico.

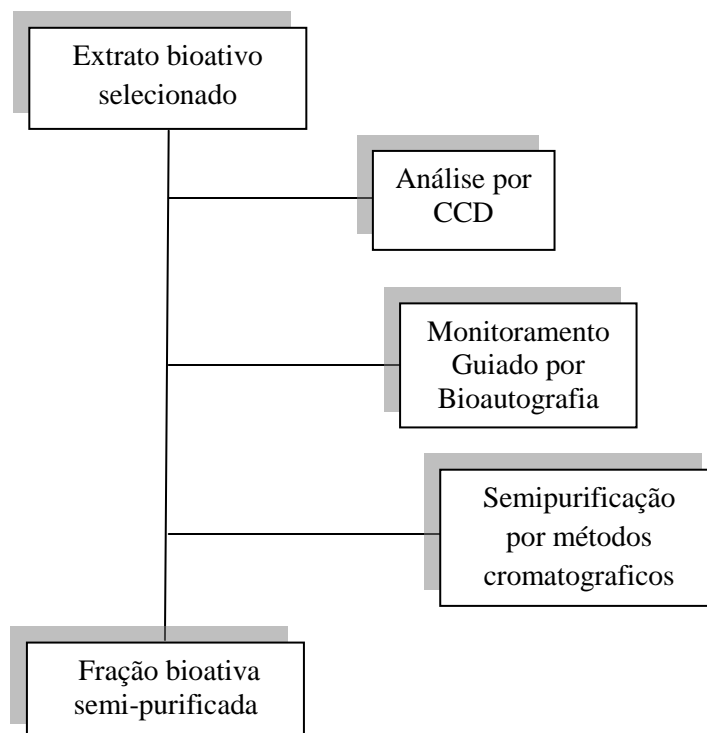


**Esquema 07** . Esquema ilustrativo do método de Bioautografia, no qual o meio de cultura inoculado é vertido sobre uma cromatoplaça eluída com o composto químico de interesse.

### 3.3.4 Técnica de cromatografia - Semipurificação

Amostras do extrato hidroalcoólico do guaraná (27 mg) solubilizado em 1,0 mL de metanol foram aplicadas em placas de alumínio (20x20 cm). A eluição foi realizada utilizando como fase móvel o sistema diclorometano: etanol (40:60).

Ao final da eluição a amostra foi retirada da placa e dissolvida em metanol. Esta amostra foi filtrada em funil de vidro com papel filtro e algodão até não ser observada mais a presença de sílica, após foi concentrada em rotaevaporador (30 °C) e pesada em balança analítica (**Esquema 07**) (HOSTETTMANN; MARSTON, 1994; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).



**Esquema 08** – Organograma dos métodos para a semipurificação dos extratos selecionados

### 3.3.5 Técnica de microdiluição em caldo

Está técnica foi realizada com a finalidade de determinar a concentração inibitória mínima dos extratos bioativos de *Paullinia cupana*, por meio do método de microdiluição em caldo, foi adaptada de Alves *et al.* (2008) e Oliveira (2005). Todas as etapas do procedimento foram realizadas em condições assépticas e em triplicata.

#### A) Procedimento experimental

- A suspensão bacteriana com turvação correspondente a escala de 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  ufc/mL) foi diluída na proporção de 1/300 em caldo LB de forma a obter uma suspensão final com concentração de  $2,5 \times 10^5$  UFC/mL.
- Foi dispensado a onze poços sequenciais da microplaca 100  $\mu$ l de caldo LB, ao primeiro poço da sequencia foi adicionado 100  $\mu$ L da solução do extrato bioativo e procedeu-se a uma diluição seriada até o último poço, deste foi desprezado 100  $\mu$ L. A seguir foi adicionado aos onze poços o inóculo bacteriano na concentração de  $2,5 \times 10^5$  UFC/mL.
- Os extratos bioativos do guaraná foram analisados nas concentrações sequenciais da diluição seriada, as concentrações foram: 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL, 0,39 mg/mL, 0,15 mg/mL, 0,097 mg/mL, 0,048 mg/mL e 0,024 mg/mL.
- A fração bioativa do extrato hidroalcoolico do guaraná foi analisado nas concentrações sequencias da diluição seriada, as concentrações foram: 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,312 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,078 mg/mL, 0,039 mg/mL, 0,019 mg/mL, 0,0097 mg/mL, 0,0048 mg/mL e 0,0024 mg/mL.

- Os controles (imipenem e vancomicina) foram analisados nas concentrações sequências da diluição seriada, as concentrações foram: 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,062 mg/mL, 0,031 mg/mL, 0,015 mg/mL, 0,007 mg/mL, 0,004 mg/mL, 0,002 mg/mL, 0,0009 mg/mL, 0,00048 mg/mL, 0,00024 mg/mL e 0,00012 mg/mL.
- Logo após a micropipetagem, as microplacas foram tampadas e incubadas a 36 °C por 18 horas. Terminado este período adicionou-se em cada orifício das placas 30 µL de resazurina a 0,01 % em solução aquosa esterilizada onde, após 4 horas de reincubação, a leitura foi realizada. Desta maneira foi possível determinar a menor concentração de cada extrato bioativo capaz de inibir o crescimento microbiano.
- Análise estatística: os valores foram expressos como a média e os respectivos valores de desvio-padrão, utilizando o programa Microsoft Office Excel 2007.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.1 Estudo preliminar de técnicas de triagem da atividade antibacteriana**

### 4.1.1 Resultados

Com a finalidade de determinar a técnica mais sensível na detecção das propriedades antibacterianas do guaraná e da marapuama, seus extratos hidroalcoólicos foram inicialmente estudados por meio de duas técnicas de difusão em Agar, a técnica do poço e a do disco.

Os extratos hidroalcoólicos do guaraná e da marapuama foram priorizados neste ensaio, devido principalmente aos relatos descritos na literatura da atividade antibacteriana de extratos alcoólicos destas espécies (BASILE *et al.*, 2005; MAJHENIC *et al.*, 2007; CORREIA *et al.*, 2008). Além disto, segundo o que descreveu Falkenberg *et al.*, (2004), a maioria dos compostos com atividade biológica apresenta solubilidade em misturas alcoólicas.

O controle positivo (imipinem associado à cilastatina) proporcionou a formação de halo de inibição em todos os ensaios, conforme o esperado. Pois, este é um quimioterápico que, juntamente com o meropenem, representa o  $\beta$ -lactâmico com maior espectro e potência antimicrobiana, e são os únicos carbapenêmicos disponíveis para o uso clínico no Brasil (GALES *et al.*, 2002). Já os controles negativos (metanol 10 % e DMSO 1 %) não apresentaram nenhuma ação antibacteriana frente aos micro-organismos testes.

O extrato hidroalcoólico do guaraná foi ativo frente às linhagens Gram-negativas e Gram-positivas: *S. aureus* MSSA, *B. cereus*, *C. violaceum* e *P. aeruginosa* (Tabela 04). O extrato hidroalcoólico da marapuama não demonstrou atividade inibitória



**Tabela 04.** Comparação entre técnicas de triagem da atividade antibacteriana, do extrato hidroalcoólico do guaraná, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias	Técnica do Poço			Técnica do Disco		
	0,4 mg	1,2 mg	4 mg	0,3 mg	0,9 mg	3 mg
<i>S. aureus</i> MSSA ATCC 25923	-	-	+	-	+	+
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 33591	-	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 9634	-	-	-	-	-	+
<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i> ATCC 624	-	-	-	-	-	-
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	-	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i> PaO1	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> EPEC: E2348/60, EAEC: 042, EHEC: 0157:H7 DAEC: C1842	-	-	-	-	-	-
<i>S. arizonae</i> ATCC M90T	-	-	-	-	-	-

(-) Negativo (ausência de halo de inibição bacteriana); (+) Positivo (presença de halo de inibição bacteriana)

### 4.1.2 Discussão

Ao se estudar a atividade antibacteriana dos extratos por meio da técnica de difusão em Agar, utilizando como reservatórios discos e poços confeccionados no meio de cultura, foi possível determinar a técnica mais sensível para o estudo dos extratos abordados neste projeto.

Por meio da técnica de difusão em poço foi observada a formação de halo de inibição contra apenas um micro-organismo (*S. aureus* MSSA) quando utilizado 4 mg do extrato hidroalcoólico do guaraná.

Quando se fez o uso da técnica de difusão em disco foi possível detectar a atividade inibitória do extrato hidroalcoólico do guaraná na concentração de 0,9 mg contra o *S. aureus* MSSA; e quando utilizou-se a concentração de 3 mg determinou-se a atividade frente a quatro bactérias: *S. aureus*, *B. cereus*, *C. violaceum* e *P. aeruginosa*.

Pode-se inferir, portanto que o teste de difusão em poço foi menos sensível no rastreamento da atividade antibacteriana. A menor sensibilidade da técnica do poço observado neste trabalho deve-se provavelmente há uma maior área de difusão do extrato no poço. Além disto, por esta técnica 2,5 mL de inóculo bacteriano com turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland foi incorporada ao meio de cultura. Enquanto na técnica de difusão em disco, a suspensão bacteriana com a mesma turvação foi semeada apenas na superfície do ágar e a difusão do extrato se deu na superfície do mesmo, em contato com a bactéria semeada.

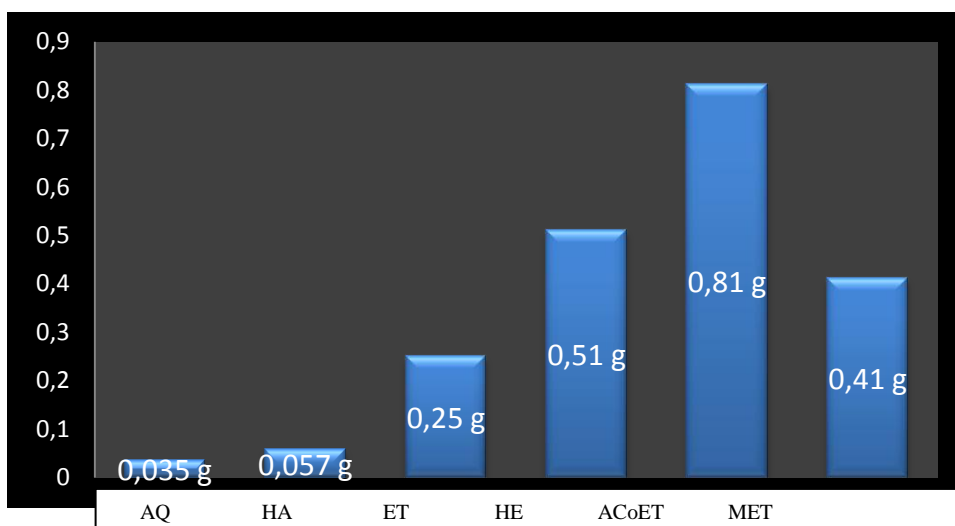
Em vista desses resultados a técnica de difusão em disco foi selecionada para a triagem da atividade antibacteriana dos extratos do guaraná e da marapuama. Esta é uma das técnicas mais utilizadas nos laboratórios de microbiologia, preconizada pelo *National Committe for Clinical Laboratory Starndards* (NCCLS) e está normatizada como parâmetro de análise antimicrobiana na Farmacopéia Brasileira (KIEHLBAUCH *et al.*, 2000; SEJAS *et al.*, 2002).

#### ***4.2 Espécie Ptychopetalum olacoides***

## 4.2.1 Resultados

### 4.2.1.1 Rendimento

A partir da extração de amostras de 20 gramas de marapuama foram calculados os rendimentos. Foi obtido um rendimento de 0,51 g (2,55 %) de extrato aquoso, 0,25 g (1,25 %) de extrato hidroalcoólico, 0,057 g (0,28 %) de extrato etanólico, 0,035 g (0,17 %) de extrato hexânico, 0,81 g (4,05 %) do extrato em acetato de etila e 0,41 g (2,05 %) do extrato metanólico (Gráfico 01).



**Gráfico 01** – Rendimento dos extratos aquoso (AQ), hidroalcoólico (HÁ), etanólico (ET), hexânico (HE), em acetato de etila (ACoET) e metanólico (MET) da marapuama.

### 4.2.1.2 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana da marapuama foi rastreada utilizando-se 3 mg/disco de extrato. Em vista do baixo rendimento obtido com a extração do material vegetal, o estudo foi conduzido utilizando-se pelo menos um extrato com característica polar (aquoso, metanólico, etanólico e hidroalcoólico) e outro com polaridade intermediária ou apolar (acetato de etila e hexano) frente às linhagens testes.

Conforme demonstrado na tabela 05, o extrato etanólico foi ativo frente a *P. aeruginosa* e o aquoso demonstrou atividade à linhagem de *C. violaceum*. Os melhores resultados foram obtidos com o extrato em acetato de etila, inibindo: *C. violaceum*, *S. aureus*, *B. cereus* e *B. licheniformis*.

Os controles negativos (metanol 10 % e DMSO 1 %) não demonstraram ação antibacteriana frente aos micro-organismos testes e o controle positivo (imipinem associado à cilastatina) proporcionou a formação de halo de inibição em todos os ensaios, conforme o esperado.

**Tabela 05** Atividade antibacteriana dos extratos: aquoso, hidroalcoólico, metanólico, etanólico, em acetato de etila e hexânico da marapuama, frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias	AQ	HÁ	MET	ET	ACOET	HE
	<b>3mg/disco</b>					
<i>S. aureus</i> MSSA ATCC 25923	ND	-	-	ND	+	ND
<i>B. cereus</i> ATCC 9634	ND	-	ND	-	+	-
<i>B. licheniformis</i> Isolado clínico	ND	-	-	ND	+	ND
<i>S. mutans</i> ATCC 624	ND	-	-	ND	-	ND
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	+	-	ND	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> Pa01	ND	-	ND	+	-	ND
<i>E. coli</i> EPEC: E2348/60, EAEC: 042, EHEC: 0157:H7 e DAEC: C1842	ND	-	-	-	-	ND
<i>Shigella</i> spp. ATCC M90T	ND	-	-	ND	-	ND
<i>S. arizonae</i> Isolado clínico	ND	-	-	ND	-	ND

(-) Negativo (ausência de halo de inibição); (+) Positivo (presença de halo de inibição); ND (não determinado): ensaio não realizado devido ao baixo rendimento obtido na extração da marapuama e ao enfoque dado aos ensaios com os extratos do guaraná.

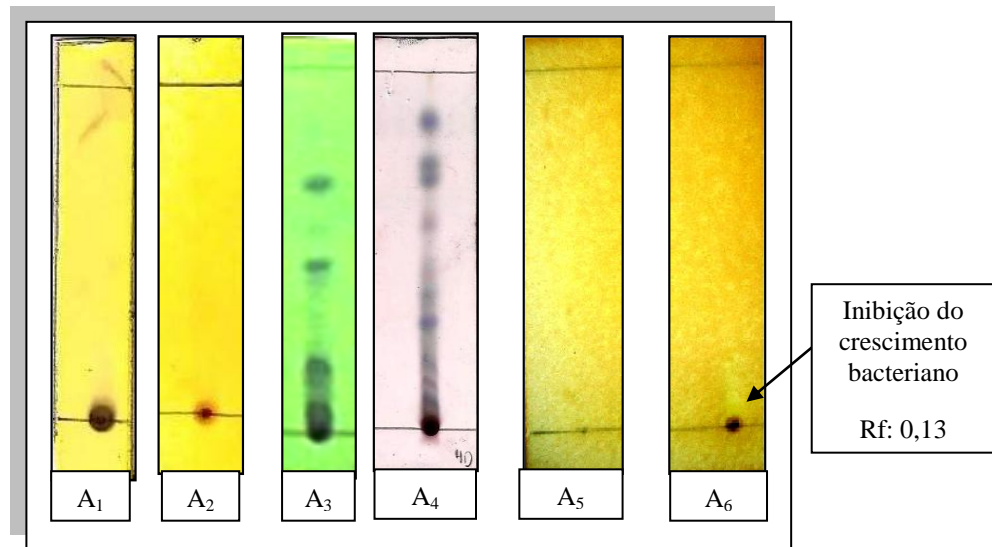
### 4.2.1.3 Bioautografia

O extrato em acetato de etila da marapuama foi selecionado entre as amostras mais promissoras para o monitoramento da atividade antibacteriana por bioautografia devido ao seu espectro de ação frente às linhagens testes e ao rendimento obtido no processo extrativo.

O extrato em acetato de etila da marapuama foi submetido a diferentes eluentes com a finalidade de determinar o sistema mais adequado para a separação dos seus constituintes fitoquímicos na cromatoplaça. Conforme observações dos resultados pode-se inferir que dentre os sistemas testados, o hexano: acetato de etila (8,0:2,0) foi o que forneceu a melhor resolução para as amostras na cromatoplaça.

Na sequência verificou-se de forma preliminar a constituição fitoquímica da amostra, utilizando-se para isto, o revelador físico: luz ultravioleta; químico: solução etanólica de  $\text{FeCl}_3$  a 1%, Dragendorff e vanilina sulfúrica; e biológico: cloreto de trifeniltetrazólio.

Conforme a figura 11 pode-se inferir que o extrato, mais especificamente onde se encontra o princípio ativo, possui substâncias que reagem com o cloreto férrico ( $A_1$ ) e com o Dragendorff ( $A_2$ ), apresentam fluorescência a 365 nm ( $A_3$ ) e inibe o crescimento bacteriano ( $A_6$ ). Pode ser observado nesta figura, mais especificamente “ $A_6$ ” que a fração do extrato em acetato de etila que inibiu o crescimento do *S. aureus* apresenta um fator de retenção de 0,13.



**Figura 11** – Perfil cromatográfico do extrato em acetato de etila da marapuama utilizando como revelador químico: (A<sub>1</sub>) FeCl<sub>3</sub>; (A<sub>2</sub>) Dragendorff; (A<sub>3</sub>): UV 365 nm; (A<sub>4</sub>) vanilina sulfúrica; (A<sub>5</sub>) Controle negativo com metanol; (A<sub>6</sub>) Extrato em acetato de etila frente ao *S. aureus* revelado com cloreto de trifeniltetrazólio.

## 4.2.2 Discussão

### 4.2.2.1 Rendimento

Os extratos da marapuama que demonstraram maiores rendimento foram os obtidos em hexano (0,51g), em acetato de etila (0,81g) e o metanólico (0,41 g), desta forma pode-se concluir que os solventes orgânicos com polaridade intermediária e apolar foram os que demonstraram uma maior capacidade de extrair os compostos fitoquímicos presentes no material vegetal.

O extrato etanólico da marapuama apresentou um rendimento de 0,057g, este é citado na literatura por apresentar atividade antibacteriana contra linhagens teste de *S. aureus* (CORREIA *et al.*, 2008) e atividade antifúngica contra linhagens de *Colletotrichum acutatum* e *Fusarium oxysporum* (MONTRUCCHIO; MIGUEL, 2002).



#### 4.2.2.2 Atividade antibacteriana

No presente trabalho a atividade antibacteriana dos extratos da marapuama foram avaliados pelo método de difusão em ágar, utilizando a escala 0,5 de McFarland. Igualmente neste projeto, Correia *et al.* (2008) e Montrucchio e Miguel (2002) estudaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da marapuama.

Em estudo conduzido por Correia *et al.* (2008), o extrato etanólico da marapuama foi analisado nas concentrações que variaram de 80 µg a 1.25 µg, frente a cepas ATCC (American Type Culture Collection) e multi-resistentes de: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pneumoniae*, sendo observada atividade apenas contra *S. aureus*.

Já em estudo realizado por Montrucchio e Miguel (2002), os extratos etanólicos e suas frações em hexano, clorofórmio, butanol, metanol e etanol foram avaliadas frente às linhagens *E. coli* (ATCC 8739), *S. aureus* (ATCC 6531) e *S. epidermidis* (ATCC 12228). Não foi demonstrada atividade inibitória frente às bactérias, porém foram ativos frente aos fungos *C. acutatum* e *F. oxysporum*.

No presente estudo, igualmente ao estudo conduzido por Correia *et al.* (2008), e Montrucchio e Miguel (2002), o extrato etanólico não apresentou atividade frente as cepas de *E. coli*, porém foi ativo contra a *Pseudomonas aeruginosa*.

Além disto, o extrato em acetato de etila foi ativo contra a linhagem de *S. aureus*. Este resultado é de relevante importância já que o *S. aureus* representa um importante patógeno causador de infecção comunitária e hospitalar, que vem desenvolvendo resistência aos quimioterápicos disponíveis na terapêutica (LENTINO *et al.*, 2008).

Dentre as prováveis substâncias presentes nos extratos polares (etanólico e aquoso) responsáveis pela a atividade antibacteriana podem-se destacar os alcalóides metilxantínicos, pois a marapuama assim com o guaraná contem cafeína e teobromina em sua composição e

existem relatos que demonstra a atividade da cafeína contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (RATES, 2004; ALMEIDA, 2007). Os taninos também fazem parte da constituição fitoquímica da maparuama e podem ser implicados na ação inibitória observada (SCALBERT, 1991; SANTOS; MELO, 2004; CHUNG *et al.*, 1998; MILA *et al.*, 1996).

Mas, além desses grupos de substâncias, devem ser considerados os compostos com caráter menos polar, pois o extrato que demonstrou maior espectro de ação foi o em acetato de etila, que apresenta polaridade intermediária. As substâncias presentes neste extrato difundem-se mais lentamente no Agar, podendo levar a formação de discretas zonas de inibição, dando a falsa impressão de ausência ou fraca atividade antibacteriana (PAULI *et al.*, 2005).

Dentre as substâncias fitoquímicas que podem estar exercendo a atividade observada podem-se citar os esteróides do tipo  $\beta$ -sitosterol e os terpenos: glutinol e  $\alpha$ -amirina, presentes na espécie em estudo (CORRÊA *et al.*, 1998; REVILLA, 2002; MONTRUSCCHIO *et al.*, 2002; MATTA, 2003; KUSTER; ROCHA, 2004; ROLIM *et al.*, 2005; ALONSO, 2007; TANG *et al.*, 2009). Segundo Virtuoso *et al.*, (2005), os esteróides e os triterpenos presentes nas plantas estão concentrados geralmente na fração mais apolar (por exemplo, o extrato em acetato de etila), e são conhecidos por diversas atividades de interesse biológico, dentre as quais a atividade antimicrobiana.

Os terpenos são descritos na literatura como a segunda classe de compostos fitoquímicos com maior número de constituintes bioativos (DI STASI, 1996; MONTRUSCCHIO *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2009). Singh e Singh (2003) estudaram a atividade antibacteriana pelo método de difusão na concentração de 1 mg por disco, da  $\alpha$ -amirina, lupeol e  $\beta$ -sitosterol isolados da espécie *Trichodesma amplexicaule* Roth, e observaram a atividade frente a *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *B. thuringiensis*.

Em estudo conduzido por Padmaja *et al.*, (1993) foram fracionados e identificados substâncias presentes nos extratos hexânicos e em acetato de etila das casca das raízes de *Narum uvaria* Wall e *Uvaria hookeri* King, que demonstraram atividade antibacteriana. Segundo os autores, as prováveis substâncias que proporcionaram a atividade foram o triterpeno glutinol e  $\beta$ -sitosterol. Outro componente que foi descrito fazendo parte da composição da marapuama é o  $\alpha$ -pineno. Este foi descrito por Cabral (2008) como inibidor do *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) com uma concentração inibitória mínima de 6500  $\mu\text{g/mL}$ .

Os flavonóides constituem uma classe de substâncias que se encontram presente tanto no guaraná quanto na marapuama, são descritos por possuírem atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana. Os mecanismos propostos para a atividade dos flavonóides têm sido atribuídos à inibição da DNA girase e a inibição da função da membrana citoplasmática (CUSHNIE; LAMB, 2005).

#### **4.2.2.3 Bioautografia**

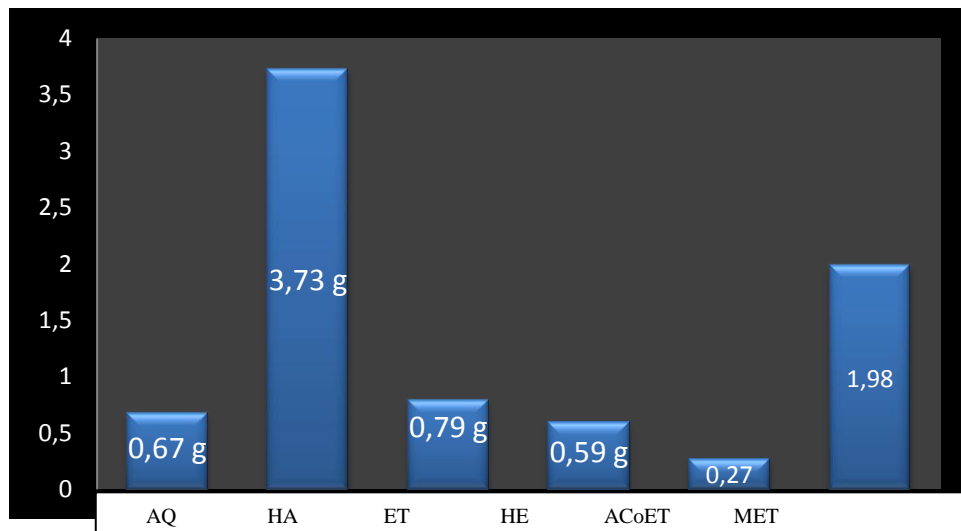
O ensaio de bioautografia realizado com o extrato em acetato de etila da marapuama detectou a atividade antibacteriana de um composto químico com  $R_f$  0,13, sendo desta forma de relevante importância novos estudos que conduza a semi-purificação e elucidação da fração bioativa.

### **4.3 Espécie *Paullinia cupana***

## 4.3.1 Resultados

### 4.3.1.1 Rendimento

Em conformidade com os procedimentos executados para a obtenção dos extratos da marapuama, foram conduzidas operações para a extração dos compostos fitoquímicos do guaraná. O extrato hidroalcoólico (70 % de etanol v/v) apresentou um rendimento de 3,73 g (18,65 %), o extrato etanólico de 0,79 g (3,95 %), o extrato aquoso de 0,67 g (3,25 %) e o extrato hexânico de 0,59 g (2,95 %). Estes resultados podem ser vistos no Gráfico 02.



**Gráfico 02** – Rendimento dos extratos aquoso (AQ), hidroalcoólico (HÁ), etanólico (ET), hexânico (HE), em acetato de etila (ACoET) e metanólico (MET) do guaraná.

Para a obtenção dos extratos em acetato de etila e em metanol procedeu-se uma extração sequencial a partir do resíduo obtido com a extração em hexano. O extrato em acetato de etila apresentou um rendimento de 0,27 g (1,35 %) e o metanólico um rendimento de 1,98 g (9,9 %).

#### 4.3.1.2 Atividade Antibacteriana

O extrato aquoso, metanólico, etanólico, hidroalcoólico, em acetato de etila e hexânico do guaraná foram estudados frente às linhagens de *E. coli* diarreio gênicas, *S. arizonae*, *P. aeruginosa*, *C. violaceum*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *S. aureus* meticilina sensível (MSSA), *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) e *S. mutans*.

Utilizou-se nos ensaios extratos na concentração de 3 mg/disco, conforme descrito por Salvane *et al.*, (2008) e Alves *et al.*, (2008). Além disto, esta concentração foi escolhida fundamentada principalmente no fato de que na maioria das vezes o composto bioativo encontra-se em pequenas quantidades no extrato, sendo interessante, portanto que se utilize no rastreio da atividade uma concentração que permita a detecção dessas substâncias. Pois um dos objetivos deste projeto foi o de obter uma fração que concentrasse a substância ativa (CHEMICAL FILHO; YUNES, 2001).

Ao se analisar a atividade antibacteriana dos extratos obtidos do guaraná observou-se que os extratos metanólico, etanólico e hidroalcoólico apresentaram um espectro de ação similar, inibindo *C. violaceum*, *S. aureus* e *Bacillus spp.* O extrato hidroalcoólico inibiu também a *P. aeruginosa*, o extrato aquoso apresentou atividade frente ao *B. licheniformis*, já o extrato hexânico não demonstrou atividade (**Tabela 03**).

Os controles negativos (metanol 10% e DMSO 1 %) não apresentaram nenhuma ação antibacteriana frente aos micro-organismos testes. Já o controle positivo (imipinem\cilastatina) proporcionou a formação de halo de inibição em todos os ensaios.

**Tabela 06** Atividade antibacteriana dos extratos: aquoso, hidroalcoólico, metanólico, etanólico, em acetato de etila e hexânico do guaraná, frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

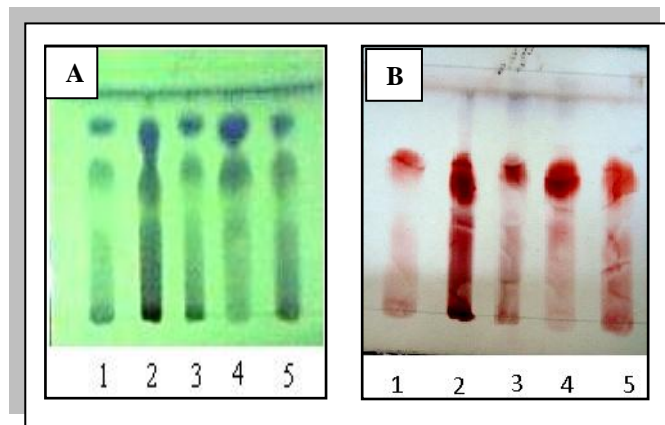
Bactérias	AQ	HA	MET	ET	ACOET	HE
	<b>3mg/disco</b>					
<i>S. aureus</i> MSSA ATCC 25923	-	+	+	+	-	-
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 33591	-	-	+	+	-	-
<i>B. cereus</i> ATCC 9634	-	+	+	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> Isolado clínico	+	-	-	+	+	-
<i>S. mutans</i> ATCC 624	-	-	-	-	-	-
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	-	+	+	+	+	-
<i>P. aeruginosa</i> PaO1	-	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> diarrreio gênicas EPEC: E2348/60, EAEC: 042, EHEC: 0157:H7 e DAEC: C1842	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella spp.</i> ATCC M90T	-	-	-	-	-	-
<i>S. arizonae</i> Isolado clínico	-	-	-	-	-	-

(+) Positivo: presença de halo de inibição; (-) Negativo: ausência de halo de inibição.

### 4.3.1.3 Perfil cromatográfico e Semipurificação da fração bioativa

Os extratos bioativos do guaraná foram submetidos a diferentes eluentes com a finalidade de determinar o sistema de eluição mais adequado para a separação dos seus constituintes fitoquímicos na cromatoplaça.

Ao se analisar diferentes eluentes para os extratos bioativos do guaraná chegou-se a conclusão de ser o sistema: diclorometano: hexano: metanol (4,5: 3,0 : 2,5) o que forneceu a melhor resolução para as amostras. Após a eluição com este eluente as placas foram reveladas com luz ultravioleta e vanilina sulfúrica conforme observado na figura 12.



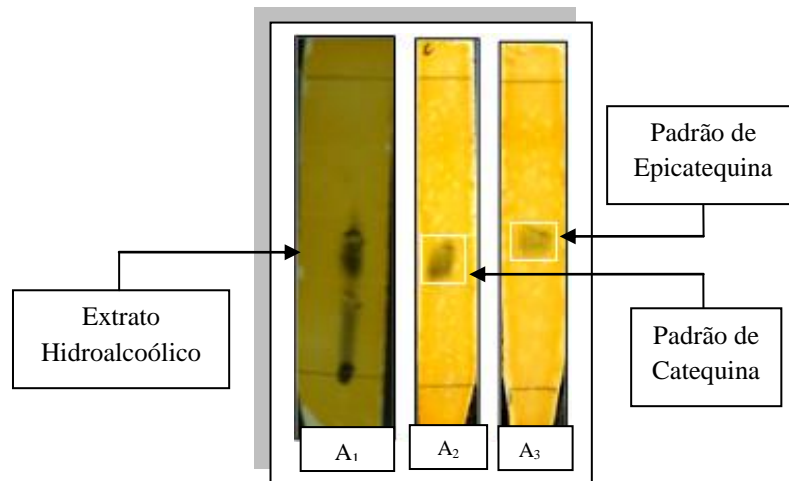
**Figura 12** – Perfil cromatográfico das amostras biativas do guaraná. (A) Luz ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm. (B) Vanilina / ácido sulfúrico. (1) Extrato AQ; (2) Extrato HA; (3) Extrato ET; (4) Extrato ACOET; e (5) Extrato MET.

Por meio do perfil cromatográfico observado na figura 12, dos resultados de triagem da atividade antibacteriana e dos cálculos dos rendimentos obtidos com o material vegetal foi possível selecionar dentre os extratos estudados aquele mais viável para a obtenção de uma fração bioativa.

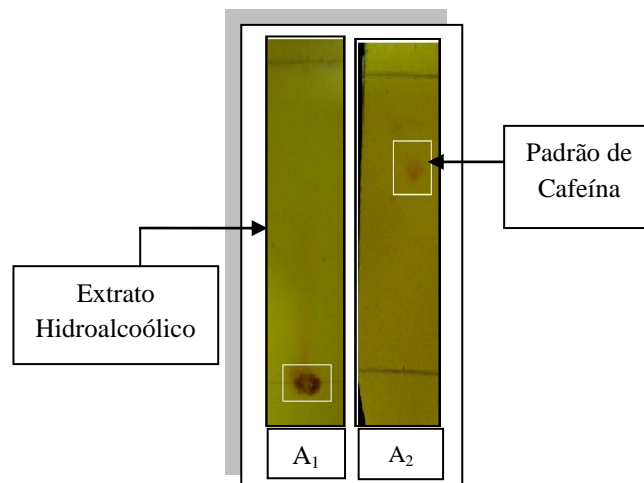
O extrato hidroalcoólico do guaraná foi selecionado entre as amostras mais promissoras para o rastreamento da atividade biológica por bioautografia, devido ao seu espectro de ação frente às linhagens testes e ao rendimento obtido no processo extrativo.



Após determinar o eluente, diclorometano: hexano: metanol (4,5:3,0:2,5), as placas cromatografias eluidas foram reveladas com solução etanólica de  $\text{FeCl}_3$ , Dragendorff e vanilina sulfúrica, e comparadas com padrões de tanino (catequina e epicatequina) (Figura 13) e alcalóide (cafeína) (Figura 14), permitindo uma estudo fitoquímico preliminar da amostra analisada.



**Figura 13** – (A<sub>1</sub>) Extrato hidroalcoólico revelado com solução etanólica de  $\text{FeCl}_3$ ; (A<sub>2</sub>) Padrão de catequina revelado com solução etanólica de  $\text{FeCl}_3$ ,  $R_f$ : 0,4; (A<sub>3</sub>) Padrão de epicatequina revelado com solução etanólica de  $\text{FeCl}_3$ ,  $R_f$ : 0,5

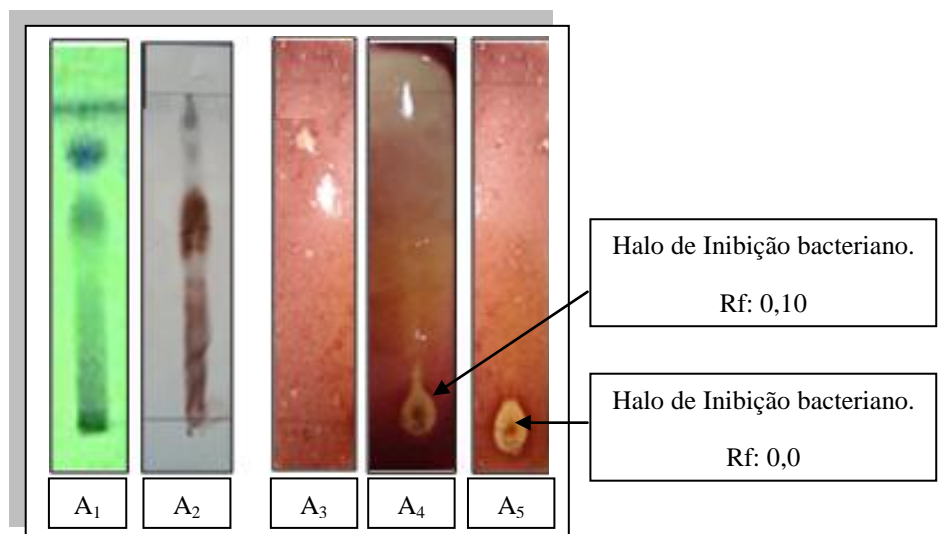


**Figura 14** – (A<sub>1</sub>) Extrato hidroalcoólico revelado com Dragendorff; (A<sub>2</sub>) Padrão de cafeína revelado com Dragendorff,  $R_f$ : 0,7.

Conforme a figuras 13 e 14 pode-se concluir que o extrato possui substâncias que reagem com o cloreto férrico e com o dragendorff, o que sugere a presença de taninos e alcalóides na amostra, e corrobora com o descrito na literatura (Henmam, 1982; Basile *et al.*, 2005).

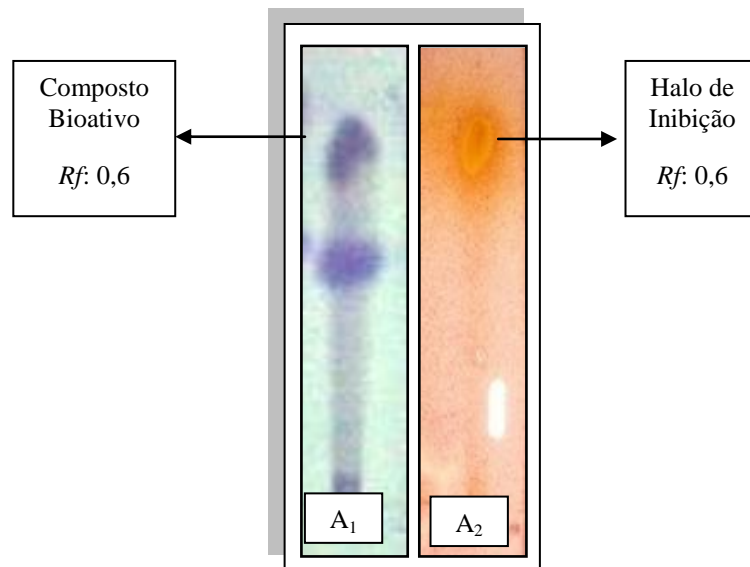
Na sequência o extrato hidroalcoólico foi estudado frente às bactérias: *S. aureus* e *B. cereus*. Para isto, o meio bacteriológico já inoculado foi vertido sobre a cromatoplaça eluída, utilizando como revelador biológico o cloreto de trifeniltetrazólio. A cromatoplaça foi preparada aplicando-se com um capilar um volume de 7  $\mu\text{L}$  do extrato hidroalcoólico na concentração de 50 mg/mL, o que equivale a uma massa de 350  $\mu\text{g}$  do extrato.

Conforme observado na figura 15, mais especificamente A<sub>4</sub> e A<sub>5</sub> a fração do extrato hidroalcoólico que inibiu o crescimento do *S. aureus* e do *B. cereus*, apresenta um fator de retenção de 0,10 e 0,0, respectivamente.



**Figura 15** – Placas eluídas em conjunto com a finalidade de monitorizar a atividade antibacteriana. (A<sub>1</sub>) Extrato hidroalcoólico revelado com luz ultravioleta a 365 nm; (A<sub>2</sub>) Extrato hidroalcoólico revelado com vanilina sulfúrica; (A<sub>3</sub>) Controle negativo com metanol; (A<sub>4</sub>) Extrato hidroalcoólico frente ao *S. aureus* revelado com cloreto de trifeniltetrazólio; (A<sub>5</sub>) Extrato hidroalcoólico frente ao *B. cereus* revelado com cloreto de trifeniltetrazólio.

Dando continuidade, o extrato hidroalcoólico foi estudado frente a diversos eluentes com a finalidade de determinar o mais adequado para a separação dos fitoquímicos ativos na cromatoplaça e posterior semipurificação da fração bioativa (Figura 16).



**Figura 16** – Extrato hidroalcoólico eluído pelo sistema diclorometano:etanol (40:60). A<sub>1</sub>: revelada em luz ultravioleta. A<sub>2</sub>: revelada com revelador biológico (cloreto de trifeniltetrazólio): frente ao *S. aureus* MRSA

Após determinar o eluente – diclorometano:etanol (DCM: ET – 40:60) procedeu-se a semipurificação da fração bioativa, para isto, foi utilizado placas de cromatografia de sílica gel de fase normal (base de alumínio). As manchas foram visualizadas com uso de luz ultravioleta e a olho nu, a de interesse foi raspada do alumínio, filtrada e concentrada dando origem a uma fração bioativa. Esta foi submetida ao ensaio de concentração inibitória mínima (CIM).

#### **4.3.1.4 Concentração Inibitória Mínima**

O estudo da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo foi realizado com os extratos que apresentaram atividade antibacteriana no teste de difusão em disco, com a finalidade de determinar a sua potência. Os resultados da concentração inibitória mínima dos extratos bioativos do guaraná estão demonstrados na Tabela 07.

**Tabela 07.** Média e desvio padrão das concentrações inibitória mínima dos extratos: em acetato de etila, hidroalcoólico, aquoso, metanólico e etanólico do guaraná, frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias	AQ	HA	MET	ET	ACOET	HE
	<b>Concentração Inibitória Mínima</b>					
	Média (mg/mL) + Desvio Padrão					
<i>S. aureus</i> MSSA ATCC 25923	ND	3,12 ± 0,0	1,56 ± 0,0	5,25 ± 1,8	ND	ND
<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 33591	ND	ND	1,56 ± 0,0	3,12 ± 0,0	ND	ND
<i>B. cereus</i> ATCC 9634	ND	1,56 ± 0,0	1,56 ± 0,0	1,56 ± 0,0	ND	ND
<i>B. licheniformis</i> Isolado Clínico	ND	ND	0,39 ± 0,0	1,56 ± 0,0	6,25 ± 0,0	ND
<i>S. mutans</i> ATCC 624	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	25 ± 0,0	6,25 ± 0,0	3,12 ± 0,0	5,25 ± 1,8	4,17 ± 1,8	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 12472	ND	25 ± 0,0	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> EPEC: E2348/60, EAEC: 042, EHEC: 0157:H7 e DAEC: C1842	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Shigella</i> spp. ATCC M90T	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. arizonae</i> Isolado Clínico	ND	ND	ND	ND	ND	ND

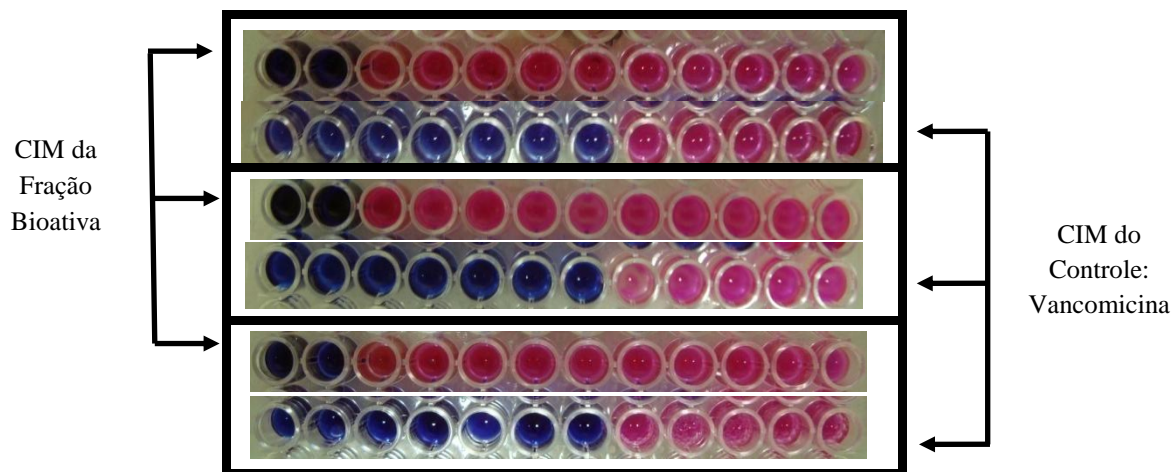
**ND:** Não Determinado por não ter apresentado atividade no teste de difusão em disco. **AQ** (extrato aquoso); **HA:** extrato em etanol 70 % (hidroalcoólico); **MET:** extrato metanólico; **ET:** extrato etanólico; **ACOET:** extrato em acetato de etila; **HE:** extrato hexânico.

A partir do extrato hidroalcoólico do guaraná obteve-se uma fração bioativa ao qual foi submetida a novos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) com a finalidade de determinar o seu potencial antibacteriano. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 08 e Figuras 17 a 20**.

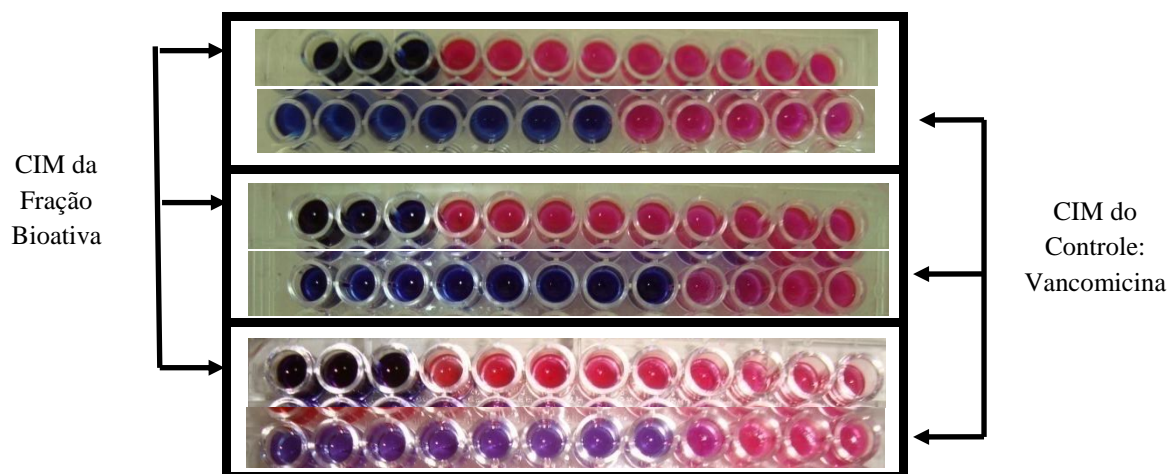
**Tabela 08.** Média e desvio padrão das concentrações inibitória mínima da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná e do controle (vancomicina) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias	Fração Hidroalcoólica do Guaraná	Controle positivo (vancomicina)
Média (mg/mL) + Desvio Padrão		
<i>S.aureus</i> MSSA ATCC 25923	1,25 ± 0,0	0,0039 ± 0,0
<i>S.aureus</i> MRSA ATCC 33591	0,625 ± 0,0	0,0026 ± 0,001
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	0,625 ± 0,0	0,250 ± 0,0
<i>B. cereus</i> ATCC 9634	1,04 ± 0,36	0,0039 ± 0,0
<i>S. mutans</i> ATCC 624	-	0,25 ± 0,0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 12472	-	0,125 ± 0,0

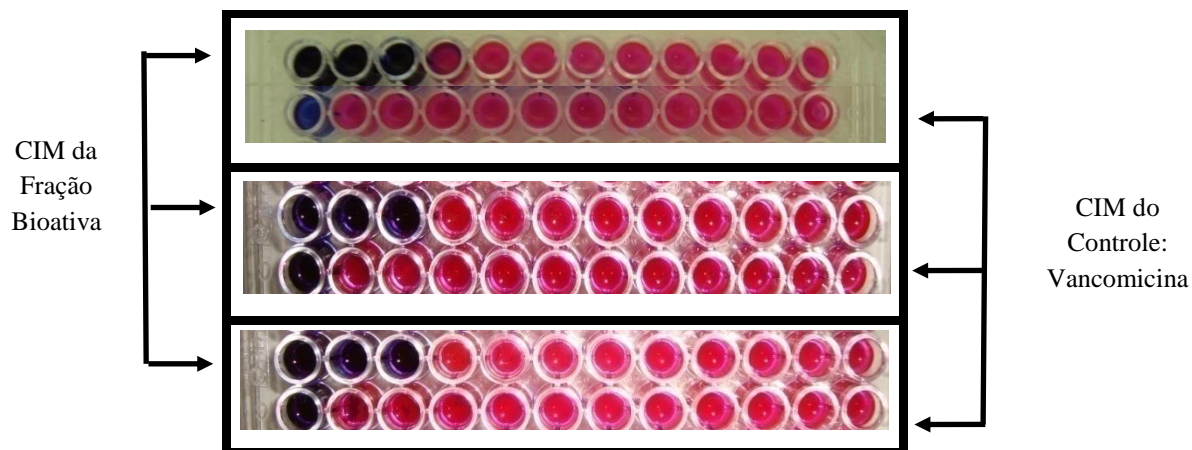
(-): ausência de atividade na concentração estudada



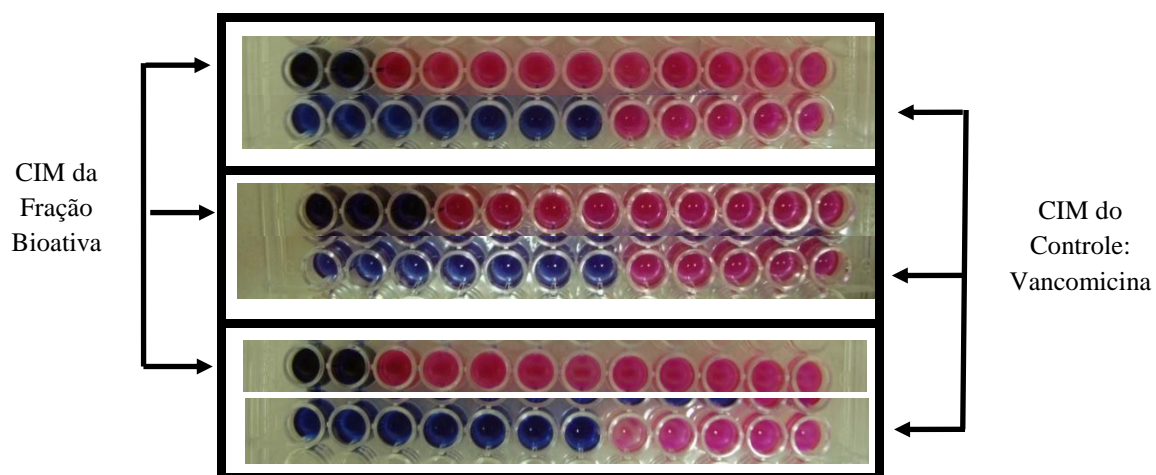
**Figura 17** – Placa de microdiluição demonstrando a ação antibacterina da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná (CIM: 1,25 mg/mL) e da vancomicina (CIM: 0,0039 mg/mL) frente ao *S. aureus* MSA.



**Figura 18** – Placa de microdiluição demonstrando a ação antibacterina da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná (CIM: 0,625 mg/mL) e da vancomicina (CIM: 0,0026 mg/mL) frente ao *S. aureus* MRSA.



**Figura 19** – Placa de microdiluição demonstrando a ação antibacteriana da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná (CIM: 0,625 mg/mL) e da vancomicina (CIM: 0,250 mg/mL) frente à *C. violaceum*.



**Figura 20** – Placa de microdiluição demonstrando a ação antibacteriana da fração bioativa do extrato hidroalcoólico do guaraná (CIM de 1,04 mg/mL) e da vancomicina (CIM de 0,0039 mg/mL) frente ao *B. cereus*.



## 4.3.2 Discussão

### 4.3.2.1 Rendimento

O extrato hidroalcoólico foi o que apresentou o maior rendimento. Este resultado é relevante, pois, segundo Falkenberg *et al.*, (2004) 80 % de praticamente todos os compostos de interesse para a análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas alcoólicas. Além disto, foi demonstrado por Majhenic *et al.*, (2007) que o extrato obtido da semente do guaraná a partir de misturas alcoólicas inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, resultado corroborado pelos estudos de Basile *et al.*, (2005).

Na extração sequencial, realizada a partir do resíduo hexânico, o rendimento obtido com o metanol foi superior, em relação ao em acetato de etila e hexânico. Este resultado pode ser atribuído à natureza dos componentes fitoquímicos do extrato em que o metanol apresenta uma maior capacidade extrativa, em relação ao acetato de etila e hexano (SAWAYA *et al.*, 2004).

### 4.3.2.2 Atividade antibacteriana

Igualmente neste projeto, Basile *et al.* (2005) e Majhenic *et al.*, (2007) estudaram a atividade antibacteriana de extratos obtidos a partir da semente do guaraná, ajustado segundo a escala 0,5 de McFarland. Sendo encontrados resultados similares com o presente estudo, entre eles a ação inibitória ao *S. aureus* e à *P. aeruginosa*.

Os extratos das sementes do guaraná foram ativos frente ao *S. aureus* e à *P. aeruginosa*, dois importantes agentes de infecção comunitária e hospitalar. Estes patógenos têm provocado, nos últimos anos, grande preocupação entre os profissionais de saúde por passarem por um processo de adaptação diferencial, isto é, evolução, que tem permitido a eles

desenvolverem resistência aos antimicrobianos disponíveis na terapêutica (LENTINO *et al.*, 2008).

Além disto, neste estudo foi observada a atividade dos extratos frente à linhagem de *B. cereus*, atividade verificada também nos ensaios conduzidos por Majhenic *et al.*, (2007). Este micro-organismo é agente de gastroenterites, o que poderia justificar, portanto o seu uso para o tratamento de distúrbio gastrointestinal (JAWETZ *et al.*, 1998; MURRAY *et al.*, 2004; WEHRLE *et al.*, 2010).

Segundo Henman (1982) os efeitos medicinais do guaraná podem ser consequência de sua elevada concentração de alcalóides, taninos e saponinas, o que é corroborado por Basile *et al.*, (2005), que pressupõe serem os polifenóis presentes no extrato os responsáveis diretos pela sua ação antimicrobiana.

Os taninos têm sido reportados na literatura por demonstrarem atividade antibacteriana, ao complexar proteínas e inibir enzimas extracelulares dos micro-organismos privando-os dos substratos necessários para o seu desenvolvimento, além de agirem diretamente no metabolismo bacteriano inibindo a fosforilação oxidativa (SCALBERT, 1991; MILA *et al.*, 1996; CHUNG *et al.*, 1998; MELO, 2004). Já xantonas, consideradas alcalóides verdadeiros, têm sido descritas por demonstrarem atividade frente a cepas de *S. aureus* meticilina resistentes (DHARMARATNE *et al.*, 1999; RATES 2004; SOBRAL *et al.*, 2009).

A cafeína é uma metilxantina presente em mais de 63 espécies de plantas, entre elas o guaranazeiro, que apresenta os maiores teores, principalmente na semente (SPOLADORES *et al.*, 1987; TFOUNI *et al.*, 2007). Segundo Almeida (2007), essa substância induz a inibição do crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, quando estudada pelo método de difusão em ágar utilizando como reservatório do extrato disco de papel de filtro, e uma suspensão bacteriana com turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland.

Simão e Nascimento (2002) compararam a atividade antimicrobiana da cafeína e do extrato do guaraná por meio do método de difusão em ágar sobre dez cepas microbianas: *S. aureus* (ATCC 6538) e *E. coli* (ATCC 25922), levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) e isolados bacterianos resistentes a antibióticos obtidos em ambiente hospitalar (*P. aeruginosa* e seis isolados de *S. aureus* resistentes a oxacilina). Os mesmos chegaram à conclusão de ser a cafeína a responsável pela atividade antibacteriana observada nos extratos do guaraná.

Portanto, pode-se concluir, concordando com Henman (1982) e Basile *et al.* (2005) que os prováveis responsáveis pelos efeitos antibacterianos observados neste estudo são os polifenóis, entre eles os taninos. Porém, é importante pontuar que, conforme observado nas figuras 15 e 16 o *Rf* da catequina, epicatequina e cafeína não correspondem ao *Rf* da substância bioativa.

Ainda não se sabe qual o mecanismo de ação das substâncias presentes no guaraná e na marapuama sobre as bactérias analisadas Gram-positivas e Gram-negativas, mas é provável que atue em mecanismos cruciais para a sobrevivência do micro-organismo, como por exemplo, inibição da síntese protéica, degradação da parede celular e a biossíntese de ácido fólico, dentre outros (BAX *et al.*, 2000), atuando de forma irreversível, que corresponde à atividade bactericida, ou reversível, atividade bacteriostática (SMITH-PALMER *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos pela análise dos extratos de guaraná e da marapuama demonstram um maior espectro de ação frente linhagens teste Gram-positivas. Sendo importante destacar que os extratos não apresentaram atividade contra as linhagens diarreogênicas de *E. coli*, *Shigella spp.* e *Salmonella arizonae*.

Conforme Nikaido (2003), Pessini *et al.*, (2003) e Nostro *et al.*, (2000) a razão da diferença de sensibilidade entre as bactérias Gram-positivas e negativas pode ser atribuída às

diferenças morfológicas entre estes micro-organismos, pois as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que age como uma barreira para muitas substâncias, incluindo quimioterápicos.

#### **4.3.2.3 Bioautografia**

O ensaio de bioautografia com o extrato hidroalcoólico do guaraná possibilitou a semipurificação de uma fração bioativa. Foi realizado um ensaio onde se utilizou uma placa de alumínio e obteve-se uma única fração, esta fração foi submetida ao ensaio de concentração inibitória mínima onde se pode determinar a sua potência antibacteriana (concentração inibitória mínima) por meio do ensaio microdiluição em caldo (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

#### **4.3.2.4 Concentração inibitória mínima do extrato**

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser comparados com os de Basile *et al.* (2005) que estudaram a atividade do extrato etanólico das sementes do guaraná (adquiridos em Verona/Itália) pelo método de diluição em caldo (concentração inibitória mínima). Estes pesquisadores obtiveram concentrações inibitórias de 16 mg/mL para *P. aeruginosa*, 32 mg/mL para *E. coli*, 64 mg/mL para *S. aureus*, não sendo observado por eles inibição contra o *Bacillus subtilis* e o *Streptococcus faecalis*.

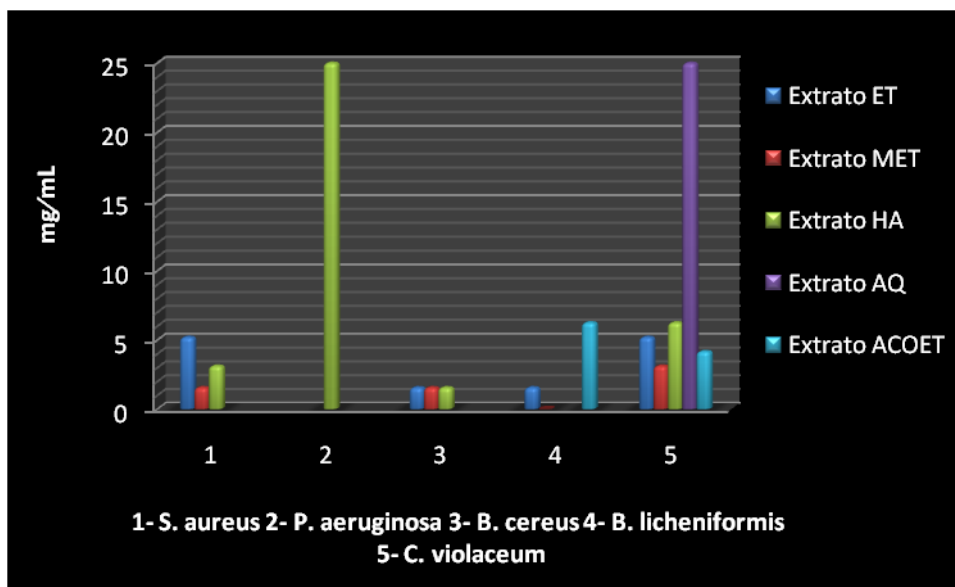
Majhenic *et al.*, (2007) estudaram a atividade de extrato aquoso, metanólico, etanólico 60 % e em acetona a 35 % da semente do guaraná (comprado em um mercado do Brasil) e verificaram a ação contra *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* (exceção do extrato aquoso) e *B. cereus*.

Apesar dos extratos do presente trabalho terem sido testados contra quatro linhagens de *E. coli* (EPEC: E2348/60, EAEC: 042, EHEC: 0157:H7 e DAEC: C1842), não foi observado atividade pelas técnicas adotadas.

A comparação entre os resultados permite inferir que as amostras estudadas, apesar de obtidas em locais e período diferente mantêm correlação entre efeitos, inibindo tanto Gram-positivos quanto Gram-negativos. Sendo observado neste estudo um maior espectro de ação contra as linhagens Gram-positivas, não apresentando atividade contra *E. coli* diarreogênicas, *Shigella spp.* e *Salmonella arizonae*.

Conforme Nikaido (2003), Pessini *et al.*, (2003) e Nostro *et al.*, (2000) a razão da diferença de sensibilidade entre as bactérias Gram-positivas e negativas pode ser atribuída às diferenças morfológicas entre estes micro-organismos, pois as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa que age como uma barreira para muitas substâncias, incluindo quimioterápicos.

Ao se analisar a atividade antibacteriana dos extratos obtidos observou-se que o metanólico e etanólico apresentaram um espectro de ação similar, inibindo *C. violaceum*, *S. aureus* e *Bacillus spp.* Já o extrato hidroalcoólico foi o único que inibiu além dos acima citados a *P. aeruginosa*, apresentando desta forma o maior espectro de ação, sendo selecionado para a obtenção de uma fração bioativa (**Gráfico 03**).



**Gráfico 03** - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos frente às linhagens testes Gram-positivas e Gram-negativas.

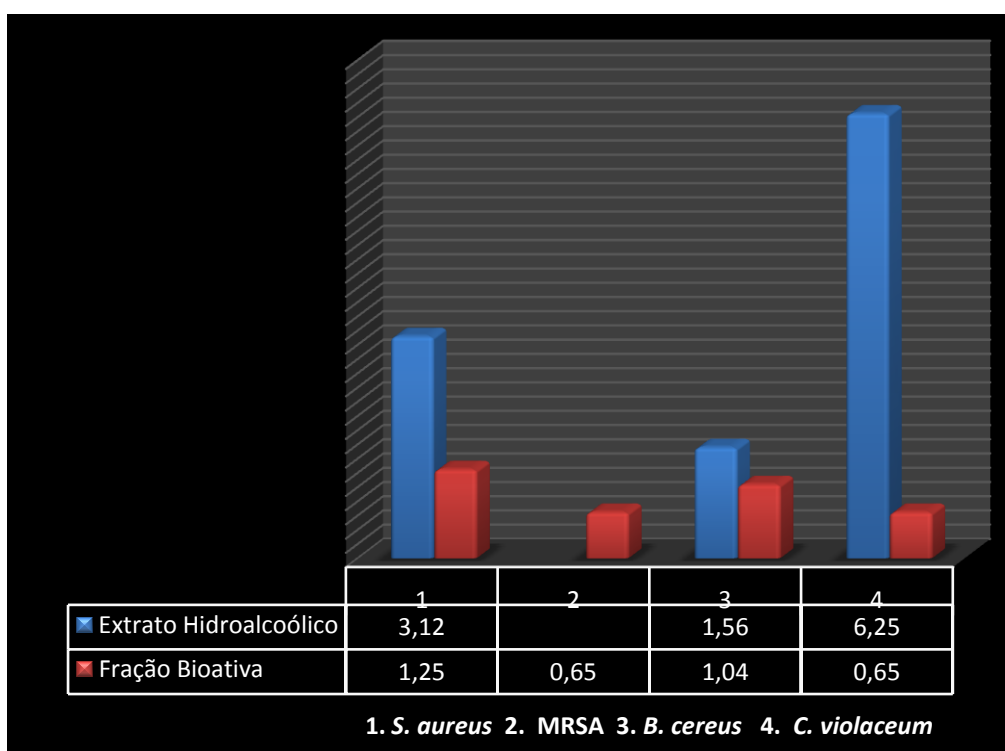
Além do maior espectro de ação, o extrato em etanol 70 % apresentou maior rendimento, podendo assim ser demonstrado: o extrato em etanol (70 %) (hidroalcoólico) rendimento de 3,73 g, o metanólico 1,98 g, o extrato etanólico 0,79 g, o extrato aquoso 0,67 g, o extrato hexânico 0,59 g e extrato em acetato de etila 0,27 g.

De acordo com Majhenic *et al.*, (2007) os extratos mais polares demonstraram maior potencial antibacteriano, sendo observado por eles maiores atividades dos extrato obtidos em metanol, acetona 35 % e etanol 60 %, o que é corroborado por este trabalho. Conforme Sawaya *et al.*, (2004) o maior efeito dos extratos polares pode ser consequência direta da maior capacidade de difusão no Agar dos componentes (polares) extraídos por esses solventes.

#### 4.3.2.5 Concentração inibitória mínima da fração

A amostra do extrato hidroalcoólico foi eluída pelo sistema escolhido (diclorometano: etanol, 40:60). Após a eluição a fração bioativa com *Rf* 0,6 foi raspada da cromatoplaça, filtrada e concentrada. Esta fração foi submetida ao ensaio de microdiluição (CIM) com a finalidade de ter-se uma correlação entre o CIM obtido com o extrato hidroalcoólico e o CIM obtido com a fração bioativa.

A fração hidroalcoólica apresentou uma CIM de 1,25 mg/mL para o *S. aureus* MSSA, 1,04 mg/mL para o *B. cereus*, 0,65 mg/mL para a *C. violaceum*, e 0,65 mg/mL para o *S. aureus* MRSA (**Gráfico 04**).



**Gráfico 04** – Comparativo entre a concentração inibitória mínima (mg/mL) do extrato hidroalcoólico do guaraná e a sua fração bioativa frente às linhagens testes Gram-positivas e Gram-negativas.

A ação contra o *S. aureus* aumentou em 60 %, valor significativo, visto que, este é um dos principais agentes patogênicos. Assim como o *S. aureus* resistente a meticilina, que na última década tem provocado infecções não apenas no ambiente hospitalar, mas também na comunidade, apresentou um CIM de 0,65 mg/mL (TAVARES, 2000; BASILE *et al.*, 2005; CARVALHO *et al.*, 2009).

Contra a *C. violaceum* o aumento foi de 89,6 % (CIM: 0,65 mg/mL), resultado relevante, já que a taxa de mortalidade por infecções por este agente é alta (com mais de 65% nos casos localizados e 80 % nos casos de bacteremia) apresentando um perfil de resistência a múltiplas drogas, incluindo as penicilinas (MARTINEZ *et al.*, 2000; ANDRIGHETTI-FROHNERL, 2003; FANTINATTI-GARBOGGINIL *et al.*, 2004; HUNGREIA, 2004; GUEVARA *et al.*, 2007; MANJUNAT, 2007; PEREZI *et al.*, 2007).

A *C. violaceum* apresenta resistência aos antimicrobianos usados rotineiramente, muitos como penicilinas e cefalosporinas. Isto pode ser explicado pela presença de genes que codificam mecanismos de resistência, tais como bombas de efluxo, serina [3-lactamases e metalo (3-lactamasas) e beta-lactamases. Estas abrem o anel beta-lactâmico das penicilinas e cefalosporinas, destruindo sua atividade antimicrobiana (FANTINATTI-GARBOGGINIL *et al.*, 2004; GUEVARA *et al.*, 2007).

É interessante observar que a *C. violaceum* é resistente as penicilinas, por apresentarem enzimas que degradam estas, as b-lactamases. Desta forma pode-se pressupor que a fração em estudo é composta por substâncias que apresentam mecanismos de ação diferente das penicilinas.

Este pressuposto permiti explicar a menor atividade observada (CIM) frente ao *S. aureus* sensível (1,25 mg/mL) em relação ao *S. aureus* resistente a meticilina (0,65 mg/mL), pois o fator que diferencia o MRSA é a presença de um receptor alterado para



penicilina, e se o princípio ativo da fração não precisar se ligar a esse receptor, a CIM do MRSA pode ser menor frente ao MSSA (UENO; JORGE, 2001).

O aumento do CIM frente ao *B. cereus* foi de 33,4 % (CIM: 1,04 mg/mL), atividade que poderia justificar alguns de seus usos etnofarmacológicos no tratamento de diarreia, corroborando com Basile *et al.*, (2005). Já que este micro-organismo é agente de infecções gastrointestinais, sendo comum em intoxicações alimentares (KOTIRANTAA *et al.*, 2000; HELGASON *et al.*, 2000; HOFFMASTER *et al.*, 2004).

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi estudada a atividade antibacteriana de duas espécies vegetais:

*Paullinia cupana* e *Ptychopetalum olacoides* contra treze linhagens bacterianas:

- Os ensaios de rastreio pelo método de difusão e de monitoramento por bioautografia dos extratos da marapuama e do guaraná permitiram detectar a atividade antibacteriana dos extratos frente aos micro-organismos em estudo, abrindo novas perspectivas para a semipurificação e elucidação dos compostos bioativos.
- O extrato hidroalcoólico, etanólico, metanólico, aquoso e em acetato de etila do guaraná apresentaram atividade inibitória contra: *S. aureus* MSSA ATCC 25923, *S. aureus* MRSA ATCC 33591, *B. cereus* ATCC 9634, *B. licheniformis* (isolado clínico), *C. violaceum* ATCC 12472 e *P. aeruginosa* (PaO1).
- Os extratos em acetato de etila, aquoso e etanólico da marapuama inibiram o crescimento das bactérias: *S. aureus* ATCC 25923, *B. cereus* ATCC 9634, *B. licheniformis* (isolado clínico), *C. violaceum* ATCC 12472 e *P. aeruginosa* (PaO1).
- Os extratos não demonstraram atividade contra as bactérias: *E. coli* diarréogênicas, *Shigella spp.* ATCC M90T, *Salmonella arizonae* (isolado clínico) e *Streptococcus mutans* ATCC 624.
- A semipurificação do extrato hidroalcoólico do guaraná permitiu a obtenção de uma fração com maior potencial antibacteriano em relação ao extrato, atividade de 650 µg/mL contra a *C. violaceum* ATCC 12472 e *S. aureus* ATCC 33591 resistente à meticilina, dois importantes agentes infecciosos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.A.; SALEH, S.A.; ABDEL-FATTAH, A.F. *Stabilization of Bacillus licheniformis ATCC 21415 alkaline protease by immobilization and modification*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, v.13, n.31, p.313-322, 2007.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. *Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two origanum species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.49, n.9, p.4168-4170, 2001.

ALMEIDA, A.A.P. *Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação in vitro e em modelo alimentar*. 2007. 137f. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais.

ALONSO, J. *Tratado de fitofármacos y nutraceuticos*. Corpus Editorial y Distribuidora. Argentina, 2007.

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

ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. *Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by Chromobacterium violaceum*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.98, n.6. 2003.

APPELBAUM, P.C.; JACOBS, M.R. *Recently approved and investigational antibiotics for treatment of severe infections caused by Gram-positive bacteria*. Current Opinion in Microbiology, v.8, n.5, p.510-517, 2005.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. *Atividade bacteriostática e bactericida do decocto do Baccharis trimera (Less.) D.C., compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.52, n.3, 2000.

BARREIO, E.J. *Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de novo agente cardioativo*. Química Nova, v.25, n.6b, 2002.

BASILE, A.; FERRARA, L.; PEZZO, M.D.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. *Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from Paullinia cupana Mart*. Journal of Ethnopharmacology, v.102, n.1, p.32-36, 2005.

BASSO, L.A.; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A, G.; JUNIOR, W.F.A.; MOREIRA, Í.S.; PALMA, M.S.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, D.S. *The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A review*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.100, n.6, p.475-506, 2005.

BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J.; *The Millennium bugs – the need for and development of new antibacterials*. International Journal of Antimicrobial Agents, v.16, n.1, p.51-59, 2000.

BECKER, S.; SOARES, C.; PORTO, L.M. *Análise computacional sugere que a virulência de Chromobacterium violaceum pode estar ligado à formação de biofilme e poly- NAG biossíntese*. Genetics and Molecular Biology, v.32, n.3, 2009.

BEECHER, G.R. *Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake*. The American Society for Nutritional Sciences: Journal Nutrition, v.133, n.10, p.32485-32545, 2003.

BHATTACHARJEE, I.; CHATTERJEE, S.K.; CHATTERJEE, G.C.. *Antibacterial potentiality of Argemone mexicana solvent extracts against some pathogenic bacteria*. Memória do Instituto Oswaldo Cruz, v.101, n.6, p.645-648, 2006.

BIER, O. *Microbiologia e imunologia*. 24ª edição. São Paulo: Editora Melhoramentos, 1985.

BITTENCOURT, A.B.C.; BITTENCOURT, L.S.; MARINOWIC, D.R.; CRUZ, I.B.M.; MACHADO, D.C. *Efeitos de extratos de Paullinia cupana (guaraná) em linhagem de fibroblastos NIH3T3*. XI Salão de Iniciação Científica (PUCRS), 2010.

BLACK, F.L. *Infectious diseases in primitive societies*. Science, v.187, n.4176, p.515-518, 1975.

BUTLER, M.S.; BUSS, A.D. *Natural products – the future scaffolds for novel antibiotics?*. *Biochemical Pharmacology*, v.71, n.7, p.919-929, 2006.

CABRAL, I.S.R. *Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira*. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências: ciência e tecnologia de alimentos) – Escola Superior de Agricultura.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M.C.B.; MAIA, M.B.S. *Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.132-135, 2002.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. *Medicamentos fitoterápicos*. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. *Guarana (Paulinnia cupana Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats*. *Phytotherapy Research*, v.17, n.10, p.1199-1202, 2003.

CARNEIRO, A.L.B.; TEIXEIRA, M.F.S.; OLIVEIRA, V.M.A.; FERNANDES, O.C.C.; CAUPER, G.S.B.; POHLIT, A.M. *Screening of Amazonian plants from the Adolpho Duck reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.103, n.1, p.31-38, 2008.

CARVALHO, M.J.; PIMENTA, F.C.; HAYASHIDA, M.; GIR, E.; SILVA, A.M.; BARBOSA, C.P.; CANINI, S.R.M.; SANTIAGO, S. *Prevalência de S. aureus resistente e sensível a meticilina na saliva de profissionais de saúde*. *Ciência Clínica*, v.64, n.4, p.295-302, 2009.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, A.R. *Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividadeestrutural*. *Química Nova*, v.21, n.1, 1998.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, A.R. *Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos ativos*. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001.

CHUNG, K.T.; LU, Z.; CHOU, M.W. *Mechanism of inhibition of tannic acid and related compounds on the growth of intestinal bacteria*. Food and Chemical Toxicology, v.36, n.12, p.1053-10603, 1998.

COE, F.G.; ANDERSON, G.J. *Screening of medicinal plants used by the Garífuna of Eastern Nicaragua for bioactive compounds*. Journal of Ethnopharmacology, v.53, n.1, p.29-50, 2006.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. *Plantas medicinais do cultivo à terapêutica*. Petrópolis: Editora Vozes, 1998.

CORREIA, A.F.; SEGOVIA, J.F.O.; GONÇALVES, M.C.A.; OLIVEIRA, V.L. SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.I.B. *Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria*. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, v.12, 2008.

COSTA, M.A.S.; ACEVEDO, P. *Sapindaceae*. In: RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L. *Flora da Reserva Ducke*. Manaus: INPA-DFID, 1999.

COSTA, P.R.C.; SANTOS, S.M.P.B.; SILVA, L.E.W.; MENEZES, C.S. *Plantas medicinais climatizadas da região amazônica*. Manaus, Governo do Estado do Amazonas, 1991.

COUTINHO, L.M. *O conceito de bioma*. Acta botbotânica Brasilica, v. 20, n.1, p.13-23, 2006.

CRUZ, A.S. *Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de draize na avaliação de produtos cosméticos*. 2003. Tese (Pós-graduação em Fármacos e medicamentos) - Universidade de São Paulo.

ALMEIDA, A.A.P. *Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação in vitro e em modelo alimentar*. 2007. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. *Antimicrobial activity of flavonoids*. International Journal of Antimicrobial Agents, v.265, n.256, p.343-356, 2005.

DAHANUKAR, S.A.; KULKARNI, R.A.; REGE, N.N. *Pharmacology of medicinal plants and natural products*. Indian Journal of Pharmacology, v.32, 2000.

DHARMARATNE, H.R.W.; WIJESINGHE, W.M.N.M.; THEVANASEM, V. *Antimicrobial activity of xanthones from Calophyllum species, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Journal of Ethnopharmacology, v.66, n.3, p.339-342, 1999.

DI STASI, L.C. (Org.). *Química de produtos naturais: principais constituintes ativos*. In: DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

DUARTE, M.C. *Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromática utilizadas no Brasil*. Multiciência, Campinas, 2006.

DUARTE, M.C.T. *Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromática utilizadas no Brasil*. Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp, Campinas, 2006.

ELISABETSKY, E.; SOUZA, G.C. *Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

ESPINOLA, E.B.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. *Pharmacological activity of Guarana (Paullinia cupana Mart.) in laboratory animals*. Journal of Ethnopharmacology, v.55, n.3, p.223-229, 1997.

FALKENBERG, M.B. *Taninos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. *Introdução a análise fitoquímica*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

FANTINATTI-GARBOGGINIL, F.; ALMEIDA, R.; PORTILHO, V.A.; BARBOSA, A.P.T.; TREVILATO, P.B.; RAMALHO, C.E.; COELHO, R.; SILVA, D.W.; BARTOLETI, L.A.;

HANNA, E.S.; BROCCHI, M.; MANFIO, G.P. *Drug resistance in Chromobacterium violaceum*. Genetics and Molecular Research, v.3, n.1, p.134-147, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3 ed. São Paulo: Organização Andrei, 1977.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

FERGUSON, L.R. *Role of plant polyphenols in genomic stability*. Mutation Research, v.475, n.1, p.89-111, 2001.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. *Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar*. Multiciências. 2008.

FREITAS, C.C. *O fenômeno da tolerância bacteriana aos antibióticos*. Journal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis, v.1, n.3, p.103-108, 1989.

FREITAS, R.S.; MORENO, S.R.F.; LIMA-FILHO, G.L.; FONSECA, A.S.; BERNARDO-FILHO, M. *Effect of a commercial extract of Paullinia cupana (guaran) on the binding of <sup>99m</sup>Tc-DMSA on blood constituents: An in vivo study*. Applied Radiation and Isotopes, v.65, n.5, p.528-533, 2007.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; HEIDOR, R.; SILVA, T.C.; ATROCH, A.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L.Z. *Protective effects of guaraná (Paullinia cupana Mart. Var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver*. Food and Chemical Toxicology, v.44, n.6, p.862-867, 2006.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O.; *Ethical use of the Brazilian biodiversity: necessity and opportunity*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.15, n.2, 2005.

GALES, A.C.; MENDES, R.E.; RODRIGUES, J.; SADER, H.S. *Comparative antimicrobial activity between meropenem and imipenem/cilastatina: does the clinical laboratory need to teste both imipenem and meropenem routinely?*. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.38, n.1, 2002.



GHAFOURIAN, H.; RABBANI, M.; NAZERI, Y.; SADEGHI, S. *Uptake and removal of nickel by new bacterial strain (NRC-BT-1)*. International Congress Series, p.270-271, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. *Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites* Plantas medicinais: fatores de influencia no conteúdo de metabolites secundários. Química Nova, v.30, n.2, 2007.

GOMES, M.J.P. *Gênero Bacillus spp.* Veterinária da UFRGS: Microbiologia Clínica, 2008.

GUEVARA, A.; SALOMÓN, M.; OLIVEROS, M.; GUEVARA, E.; GUEVARA, M.; MEDINA, L. *Sepsis caused by pigmented and no pigmented Chromobacterium violaceum*. Revista Chilena de Infectologia, v.24, n.5, 2007.

HACKBARTH, C.J.; CHAMBERS, H.F. *Methicillin-Resistant Staphylococci: detection methods and treatment of infections*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v.33, n.7, p.995-999, 1989.

HADACEK, F.; GREGER, H. *Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice*. Phytochemical Analysis, v.11, n.3, p.137-147, 2000.

HAGHIGHAT, S.; SEPAHY, A.A.; ASSADI, M.M.; PASDAR, H. *Ability of indigenous Bacillus licheniformis and Bacillus subtilis in microbial enhanced oil recovery*. International Journal of Environmental, v.5, n.2, p.385-390, 2008.

HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A. *A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity*. Journal of Natural Products, v.50, n.1, p.19-22, 1987.

HEARD, C.M.; JOHNSON, S.; MOSS, G.; THOMAS, C.P. *In vitro transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of guaraná, Paullinia cupana*. International Journal of Pharmaceutics, v.317, n.1, p.26-31, 2006.

HELGASON, E.; CAUGANT, D.A.; OLSEN, I.; KOLSTO, A. *Genetic structure of population of Bacillus cereus and B.thuringiensis isolates associated with periodontitis and other human infections*. Journal of Clinical Microbiology, v.38, n.4, p.1615-1622, 2000.

HENMAN, A.R. *Guaraná (Paullinia cupana var. sorbilis): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin*. Journal of Ethnopharmacology, v.6, n.3, p.311-338, 1982.

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. *Alcalóides: generalidades e aspectos básicos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 5ª edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

HOAG, J.B.; SESSLER, C.N. *A comprehensive review of disseminated Salmonella Arizonae infection with an illustrative case presentation*. Southern Medical Journal, v.98, n.11, p.1123-1129, 2005.

HOPKINS, K.L.; PETERS, T.M.; LAWSON, A.J.; OWEN, R.J. *Rapid identification of Salmonella enteric subsp. Arizonae and S. enterica subsp. Diarizonae by real-time polymerase chain reaction*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v.64, n.4, p.452-454, 2009.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. *Search for new antifungal compounds from higher plants*. Pure and Applied Chemistry, v.66, n.10-11, p.2231-2234, 1994.

HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M.F.; GUIMARÃES, C.T.; JARDIM, S.N.; GOMES, E.A.; VASCONCELOS, A.T.R. *Tolerance to stress and environmental adaptability of Chromobacterium violaceum*. Genetics and Molecular Research, v.3, n.1, p.102-116, 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *IBGE lança o mapa de biomas do Brasil e o mapa de vegetação do Brasil, em comemoração ao dia mundial da biodiversidade*. 2004. Disponível em < <http://IBGE.gov.br> >. Acesso em setembro de 2010.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A.; BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, L.N. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara S.A., 1989.

JELJASZEWICZ, J.; MLYNARCZYK, G.; MLYNARCZYK, A. *Antibiotic resistance in Gram-positive cocci*. International Journal of Antimicrobial Agents, v.16, n.4, p.473-478, 2000.

KABAIVANOVA, L.; DIMITROV, P.; BOYADZHIEVA, I.; ENGIBAROV, S.; DOBREVA, E.; EMANUILOVA, E. *Nitrile degradation by free and immobilized cells of the thermophile Bacillus sp. UG-5B, isolated from polluted industrial Waters*. World Journal of Microbiology Biotechnology, v.24, n.1124, p.2383-2388, 2008.

KAMIO, Y.; NIKAIDO, H. *Outer membrane of Salmonella typhimurium: accessibility of phospholipid head groups to phospholipase cC and cyanogen bromide activated dextran in the external médium*. Biochemistry, v.15, n.12, p.2561-2570, 1976.

KENNEDY, D.O.; HASKELL, C.F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-MAUND, C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARA, A.; SCHOLEY, A.B. *Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (Paullinia cupana)*. Appetite, v.50, n.2-3, p.506-513, 2008.

KIEHLBAUCH, J.A.; HANNETT, G.E.; SALFINGER, M.; ARCHINAL, W.; MONSERRAT, C.; CARLYN, C. *Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories*. Journal of Clinical Microbiology, v.38, n.9, p.3341-3348, 2000.

KOEHLER, T.M. *Bacillus anthracis physiology and genetics*. Molecular Aspects of Medicine, v.30, n.6, p.386-3916, 2009.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL, V.R.; SOMMERS, H.M. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 2º edição*. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1989.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAAA, K.; HAAPASALO, M. *Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections*. Microbes and Infection, v.2, n.2, p.189-198, 2000.

KURAMITSU, H. *Virulence factors of mutans Streptococci: role of molecular genetics*. Critical Reviews in Oral Biology e Medicine. Sage Journal on-line, v.4, n.2, p.159-176, 1993.

KURI, C.M.B.; *The guaraná industry in Brazil*. International Business & Economics Research Journal, v.75, n.57, 2008.

KUSTER, R.M.; ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5º edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. *Farmacologia e toxicologia de produtos naturais*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5º edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

LECASTRE, H.; OLIVEIRA, D.; TOMAS, A. *Staphylococcus aureus* resistente aos antibióticos: um paradigma de poder de adaptação. *Current Opinion in Microbiology*, v.10, n.5, p.428-435, 2007.

LEDERBERG, J. *Infectious History*. The American Association for the Advancement of Science, v.288, n.5464, p.287-293, 2000.

LEE, D.D.; LEE, E.Y.; JEONG, S.H.; CHANG, C.L. *Evaluation of a colorimetric broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride*. *Korean Journal of Clinical Microbiology*, v.10, n.1, p.49-53, 2007.

LENTINO, J.R.; NARITA, M.; YU, V.L. *New antimicrobial agents as therapy for resistant Gram-positive cocci*. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, v.27, n.1, p.3-15, 2008.

LOGAN, N.A. *Bacillus species of medical and veterinary importance*. *Journal of Medical Microbiology*, v.25, p.157-165, 1988.

LOPESSTEFANIE, S.C.P.L.; BLANCO, Y.C.; JUSTO, G.Z.; NOGUEIRA, P.A.; RODRIGUES, F.L.; UTA, G.; WUNDERLICH, G.; FACCHINI, G.; BROCCHI, M.; DURAN, N.; COSTA, F.T.M. *Violacein extracted from Chromobacterium violaceum inhibits Plasmodium growth in vitro and in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.53, n.5, p.2149-2152, 2009.

LORENZO, J.M.; CACHALDORA, A.; FONSECA, S.; GÓMEZ, M.; FRANCO, I.; CARBALHO, J. *Production of biogenic amine in vitro in relation to the growth phase by Enterobacteriaceae species isolated from traditional sausages*. *Meat Science*, v.86, n.3, p.684-691, 2010.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. *Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares*. Química Nova, v.25, n.3, 2002.

MAIA-ARAÚJO, Y.L.F.; MENDONÇA, L.S.; ORELLANA, S.C.; ARAUJO, E.D. *Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha*. Scientia Plena, v.7, n.4, 2011.

MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ ŽELJKO, ZK. *Antioxidant and antimicrobial activity of guaranaá seed extracts*. Food Chemistry, v.104, n.3, p.1258-1268, 2007.

SANTA-MARIA, A.S.; DIAZ, M.M.; LÓPEZ, A.; MIGUEL, M.T.; FERNANDEZ, M.J.; ORTIZ, A.I. *In vitro toxicity of stimulant soft drinks*. Ecotoxicology and Environmental Safety, v.53, n.1, p.70-72, 2002.

MARIA, A.S.; LOPEZ, A.; DIAZ, M.M.; MUNOZ-MINGARRO, D.; POZUELO, J.M. *Evaluation of the toxicity of guaraná with in vitro bioassays*. Ecotoxicology and environmental safety, v.39, n.3, p.164-167, 1998.

MARTINEZ, R.; VELUDO, M.A.S.; SANTOS, V.R.; DINAMARCO, P.V. *Chromobacterium violaceum – Infection in Brazil. A case report*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v.42, n.2, 2000.

MARTINS, J.E.C. *Plantas medicinais de uso na Amazônia*. 2ª edição: Editora CEJUP, 1989.

MARWAN, A.G.; NAGEL, C.W. *Microbial inhibitors of Cranberries*. Journal of Food Science, v.51, n.4, p.1009-1013, 2006.

MATTA, A.A. *Flora Médica Brasileira*. 3ª edição. Manaus: Editora Valler/Governo do Estado do Amazonas, 2003.

MATTEI, R.; DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; CARLINI, E.AB.; BARROS, S.B.M. *Guarana (Paullinia cupana): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro*. Journal of Ethnopharmacology, v.60, n.2, p.111-116, 1998.

MCINTYRE, L.; BERNARD, K.; BENIAC, D.; RENTON, J.L.I.; NASEBY, D.C. *Identification of Bacillus cereus group species, associated with food poisoning outbreaks in British Columbia*. Applied and Environmental Microbiology, v.74, n.23, p.7451-7453, 2008.

MCMICHAEL, A.J. *Environmental and social influences on emerging infectious diseases: past, present and future*. Philosophical Transactions of Royal Society, v.359, n.1447, p.1049-1058, 2004.

MELO, R.C.A. *Plantas medicinais, oleos essenciais e aromas*. Revista Eletrônica, n.2, v.2, p.193-200, 2005.

MILA, I.; SCALBERT, A.; EXPERT, D. *Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots*. Phytochemistry, v.42, n.6, p.1551-1555, 1996.

MIYAGI, F.; TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. *Avaliação da contaminação bacteriana em desinfetantes de uso domiciliary*. Revista de Saúde Pública, v.34, n.5, 2000.

MONTRUCCHIO, D.P.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. *Phychopetalum olacoides Benth.: principais características botânicas, fitoquímicas e farmacológica*. Revista de Ciências Farmacêuticas, v.23, n.1, p.11-24, 2002.

MORTON, J.F.; *Widespread tannin intake via stimulants and masticatories, especially guaraná, kola nut, betel vine, and accessories*. Basic Life Science, v.59, p.739-765, 1992.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PTALLER, M.A. *Microbiologia médica*. 4ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

NARISAWA, N. *Development, characterization and ecological implications of a smooth colony variant of biofilm-forming cariogenic Streptococcus mutans*. Journal of Oral Biosciences, v.52, n.3, p.245-251, 2010.

NIKAIDO, H. *Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.67, n.4, p.593-656, 2003.

NOSTRO, A.; GERMANO, M.P.; D'ANGELO, V.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A. *Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity*. Letters in Applied Microbiology, v.30, n.5, p.379-384, 2000.

OLIVEIRA G.F. *Avaliação da atividade antimicrobiana, in vitro, do extrato hidroalcoólico bruto das folhas de Syzygium cumini (L.) SKEELS (Jambolão)*. 2005. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) - Universidade de Franca.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. *Farmacognosia*. São Paulo: Editora Atheneu, p.7-9, 1998.

OLIVEIRA, F.P.; LIMA, E.O.; JÚNIOR, J.P.S.; SOUZA, E.L.; SANTOS, B.H.C.; BARRETO, H.M. *Atividade do óleo essencial de Lippia sidoides cham. (Verbenaceae) na inibição do crescimento de Staphylococcus aureus isolados de material clínico*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, n.4, p.510-516, 2006.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOL, C.M.; TOCOUTI, N.R.; SINTO, S.I. *Procedimentos básicos em microbiologia clínica*. 2ª edição. São Paulo: Editora Sarvier, 2004.

PACHECO, A.G. *Estudo fitoquímico de Aristolochia esperanzae Kuntze (Aristolochiaceae)*. 2009. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal de Minas Gerais.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HISHAM, A. *Antibacterial, antifungal and anthelmintic activities of root barks of Uvaria hookeri and Uvaria narum*. Journal of Ethnopharmacology, v.40, n.3, p.181-186, 1993.

PAULI, G.F.; CASE, R.J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, N.H.F.; FRANZBLAU, S.G. *New perspectives on natural products in TB drug research*. Life Sciences, v.78, n.5, p.485-494, 2005.

PEREZI, J.A.D.; GARCIAL, J.; VILLAMIZAR, L.A.R. *Sepsis by Chromobacterium violaceum: first case report from Colombia*. Revista Brasileira de Doenças Infecciosas, v.11, n.4, p.441-442, 2007.

PESSINI, G.L.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. *Antibacterial activity of extracts and neolignans from Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C.DC.) Yunc.* Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.98, n.8, p.1115-1120, 2003.

PETERSON, J.; DWYER, J. *Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity*. Nutrition Research, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. 5º edição. Editora Elsevier, 2004.

RATES, S.M.K. *Metilxantinas*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5º edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

REVILLA, J. *Apontamentos para a cosmética amazônica*. 2º edição. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2001.

ROLIM, A; OISHI, T.; MACIEL, C.P.M.; ZAGUE, V.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, M.V.R. *Total flavonoids quantification from o/w emulsion with extract of Brazilian plants*. International Journal of Pharmaceutics, v.308, n.1-2, p.107-114, 2006.

ROLLER, S.; ERNEST, N.; BUCKLE, J. *The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and resistant Staphylococcus aureus (MSSA and MRSA)*. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, v.15, n.3, p.275-279, 2009.

ROMEIRO, R.S. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: Editora UFV, 2001.

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

SADER, H.S.; FARRELL, D.J.; JONES, R.N. *Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from skin and skin-structure infections in European medical centres*. International Journal of Antimicrobial Agents, v.36, n.1, p.28-32, 2010.

SANTINI, F.; BORGHETTI, V.; AMALFITANO, G.; MAZZUCCO, A. *Bacillus licheniformis prosthetic aortic valve endocarditis*. Journal of Clinical Microbiology, v.33, n.11, p.3070-3073, 1995.



SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5º edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. *Taninos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 5º edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. *Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals*. *Methods*, v.42, n.4, p.321-324, 2007.

SAWAYA, A.C.H.F; SOUZA, K.S.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.B.S.; SHIMIZU, M.T. *Analysis of the composition of Brazilian própolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positiva bactéria*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.104-109, 2004.

SCALBERT, A. *Antimicrobial Properties of Tannins*. *Phytochemistry*, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5º edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

SCHULZ, G.E. *Porins: general to specific, native to engineered passive pores*. *Current Biology in Structural Biology*, v.6, n.4, p.485-490, 1996.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. *Fitoterapia racional*. Editora Malone, 2002.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A.M.F.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S. MENDES-GIANNINI, M.J.S. *Comparative study of disk diffusion and microdilution methods form evaluation fo antifungal activity of natural compounds against medical yeasts Candida spp and Cryptococcus sp*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.28, n.1, p.25-34, 2007.

SEJAS, L.M.; SILBERT, S.; REIS, A.O.; SADER, H.S. *Evaluation of the quality of the antimicrobial agents disks used in disk-diffusion tests commercially available in Brazil*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.39, n.1, p.27-35, 2003.

SILVA, A.A. *Efeito de ligaduras elásticas sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células J774*. 2008. Dissertação (Pós-graduação em Saúde Brasileira) - Universidade Federal de Juiz de Fora.

SILVA, A.L.; PIATO, A.L.S.; BARDINI, S.; NETTO, C.A.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. *Memory retrieval improvement by *Phychopetalum olacoides* in Young and aging Nise*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.95, n.2-3, p.199-203, 2004.

SILVA, A.L.; BARDINI, S.; NUNES, D.S.; ELISABETSKY, E. *Anxiogenic properties of *Phychopetalum olacoides* Benth. (Marapuama)*. *Phytotherapy Research*, v.16, n.3, p.223-226, 2002.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERENCEZI, H. *Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana*. *Química Nova*, v.29, n.4, 2006.

SIMÃO, T.A.; NASCIMENTO, G.G.F. *Atividade antibacteriana de alcalóides de origem vegetal*. *Saúde em Revista*, v.4, n.8, p.9-18, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5ª edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

SINGH, B.; SINGH, S. *Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth*. *Phytotherapy Research*, v.17, n.7, p.814-816, 2003.

SIQUEIRA, I.R.; FOCHESSATTO, C.; SILVA, A.L.; NUNES, D.S.; BATTASTINI, A.M. **Ptychopetalum olacoides*, a traditional Amazonian “nerve tonic” possesses anticholinesterase activity*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v.75, n.3, p.645-650, 2003.

SIQUEIRA, I.R.; FOCHESSATTO, C.; TORRES, I.L.S.; DA SILVA, A.L.; NUNES, D.S. ELISABETSKY, E.; NETTO, C.A. *Antioxidant activities of *Phychopetalum olacoides* (muirapuama) (“muirapuama”) in mice brain*. *Phytomedicine*, v.14, n.11, p.763-769, 2007.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYLE, L. *Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against* f. Five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, v.26, n.2, p.118-122, 1998.

SOBRAL, I.S.; SOUZA-NETA, L.C.; COSTA, G.A.N.; GUEDES, M.L.S.; MARTINS M D.; CRUZ, F.G. *Xantonas, triperpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de Kiehmeyera cuspidata Saddi, Clusiaceae*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.3, 2009.

SOMBRA, L.L.; GÓMES, M.R.; OLSINA, L.D.M.; SILVA, M.F. *Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in `guaraná`based phytopharmaceuticals*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.36, n.5, p.989-994, 2005.

SONAGLICO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. *Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5ª edição. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2004.

SPOLADORE, D.S.; BOAVENTURA, M.A.M.; SÃES, L.A. *Teor de cafeína em sementes matrizes do guaranazeiro*. VI Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo. Bragantina, Campinas, n.2, v.46, p.425-429, 1987.

STERN, J.L.; HAGERMAN, A.E.; STEINBERG, P.D.; MASON, P.K. *Phlorotannin-protein interactions*. *Journal of Chemical Ecology*, v.22. n.10, p.1877-1899, 1996.

STROHL, W.A.; ROUSE, H.; FISCHER, B.D. *Microbiologia ilustrada*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004.

SUDHA, K.KIRAN, S.; KANTA, R.R.RATHO, R.K.; PRINCE, S.SHARMA, P.; KUSUM, H.HARJAI, K.; NEENA, C.CAPALASH, N.; TIWARI, R.P. *Effect of black tea (Camellia sinensis) on virulence traits of clinical isolates of Shigella dysenteriae and Escherichia coli EPEC P<sub>2</sub> 1265 strain*. *European Food Research Technology*, v.231, n.5, p.763-770, 2010.

SULTANBAWA, Y.; CUSACK, A.; CURRIE, M.; DAVIS, C. *An innovative microplate assay to facilitate the detection of antimicrobial activity in plant extracts*. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, v.17, n.4, p.519-534, 2009.

TANG, W.; KUBO, M.; HARADA, K.; HIOKI, H.; FUKUYAMA, Y. *Novel NGF-potentiating diterpenoids from a Brazilian medicinal plant, Ptychopetalum olacoides*. Biogarnic & Medicinal Chemistry Letters, v. 19, n.3, 2009.

TAVARES, W. *Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.33, n.3, 2000.

TFOUNI, S.A.V.; CARMAGO, M.C.R.; VITORINO, S.H.P.; MENEGÁRIO, T.F.; TOLEDO, M.C.F. *Contribuição do guaraná em pó (Paullinia cupana) como fonte de cafeína na dieta*. Revista de Nutrição, v.20, n.1, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiology: na introuction*. 8º edição. Editora Pearson Education, 2005.

TRUITI, M.C.T.; SARRAGIOTTO, M.H.; FILHO, B.A.A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. *In vitro antibacterial activity of a 7-O-β-D-glucopyranosy-nutanocoumarin from Chaptalia nutans (Asteraceae)*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.98, n.2, p.283-286, 2003.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. *Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.42, n.2, 2006.

UENO, M.; JORGE, A.O.C. *Caracterização de Staphylococcus aureus resistente à metilina, envolvidos em infecções nosocomiais, por meio de técnicas fenotípicas e análises de perfil plasmidial*. Revista Brasileira de Biociência, v.7, n.2, p.15-22, 2001.

USHIROBIRA, T.M.A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L.M.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D.; MELLO, J.C.P. *Chemical and microbiological study of extract from seeds of guaraná (Paullinia cupana var. sorbilis)*. Latin American Journal of Pharmacy, v.26, n.1, p.5-9, Maringá, 2007.

VALGAS, C.; SOUZA, S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JUNIOR, A. *Métodos de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais*. Brazilian Journal of Microbiology, v.38, n.2, p.369-380, 2007.

VEIGA JUNIOR, V.F. *Study of the medicinal plants consumption in the Middle-North region of the Rio de Janeiro state: acceptance by health professionals, way of use of the population* Estudo do consume de plantas medicinais na Região centro-norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.2, 2008.

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

VELASCO, M.V.R.; MACIEL, C.P.M.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. *Desenvolvimento e teste preliminar da estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de Trichilia catiguá Adr. Juss (e) Ptychopelatum olacoides Bentham*. Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada, v.29, n.2, p.179-194, 2008.

VERPOORTE, R. *Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development*. Drug Discovery Today, v.3, n.5, p.232-238, 1998.

VICENTINI, A.; ROSSI, L. Olacaceae. In: RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L. Flora da Reserva Ducke. Manaus, INPA-DFID, 1999.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J.F.G.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; OLIVEIRA, A.B.; MIGUEL, O.G. *Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de Erythrina velutina Willd., Fabaceae (Leguminosae)*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.15, n.2, p.137-142, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. 2ª edição: Springer Dordrecht Heidelberg London New York, 2006.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. *Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas*. 2ª edição: São Paulo, Pharmabooks, 2006.

WEHRLE, E.; DIDIER, A.; MORAVEK, M.; DIETRICH, R.; MARTLBAUER, E. *Detection of Bacillus cereus with enteropathogenic potential by multiplex real-time PCR based on SYBR green I*. Molecular and Cellular Probes, v.24, n.3, p.124-130, 2010.

WEISS, S.H.; BLASER, M.J.; PALEOLOGO, F.P.; BLACK, R.E.; MCWHORTER, A.C.; ASBURY, M.A.; CARTER, G.P.; FELDMAN, R.A.; BRENNER, D.J. *Ocorrence and distribution of serotypes of the Arizona Subgroup of Salmonella strains in the United States from 1967 to 1976*. Journal of Clinical Microbiology, v.23, n.6, p.1056-1064, 1986.

WOODS, G.L.; WASHINGTON, J.A. Testagem *in vitro* de agentes antimicrobianos. In: Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. 19º Edição. Editora Malone LTDA, p.1170-1174, 1999.

WRIGHT, G.D. Q&A: Antibiotic Resistance: where does it come from and what can we do about it?. BMC Biology, v.8, n.123, 2010.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, D.R.; DUNCAN, K.E.; MCINERNEY, M.J.; FOLMSBEE, M.; FINCHER, T.; KNAPP, R.M. *In situ biosurfactant production by Bacillus strains injected into a limestone petroleum reservoir*. Applied and environmental microbiology, v.73, n.4, p.1239-1247, 2007.

YUNES, A.R.A.; CECHINEL FILHO, V. *Breve histórico da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental*. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. *Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria e fitofármacos no Brasil*. Química Nova, v.24, p.147-152, 2001.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. *Fabamins: new antimicrobial plant peptides*. FEMS Microbiology Letters, v.149, n.1, p.59-64, 1997.