

**UNIVERSIDADE ANHANGUERA – UNIDERP**

**LARA PEDOTTI STRIQUER**

**PROSPECÇÃO DE PLANTAS DO PANTANAL COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

**CAMPO GRANDE – MS  
2009**

**LARA PEDOTTI STRIQUER**

**PROSPECÇÃO DE PLANTAS DO PANTANAL COM AÇÃO ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em nível de Mestrado Acadêmico em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional da Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional.

Orientação:  
Prof. Dr. Silvio Favero  
Profa. Dra. Mercedes A. Mercante  
Profa. Dra. Cristiana S. Macedo

**CAMPO GRANDE – MS  
2009**

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Candidata: **Lara Pedotti Striquer**

Dissertação defendida e aprovada em 29 de julho de 2009 pela Banca Examinadora:

---

Prof. Doutor **Silvio Favero (Orientador)**  
Doutor em Produção Vegetal

---

Profa. Doutora **Carla Cardozo Pinto de Arruda (UFMS)**  
Doutora em Biologia Celular e Molecular

---

Profa. Doutora **Cristiana Santos de Macedo (UNIDERP)**  
Doutora em Biologia Humana

Dedico esta obra ao meu marido Agripino e minha filha Yasmin que são a razão do meu viver, a minha força para lutar pelos meus sonhos. Aos meus Pais, Irmãos e sobrinhos que amo tanto e que sempre acreditaram em mim.

AMO VOCÊS!

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente, agradeço a Deus e a Deusa!

Ao meu marido Agripino Maciel Junior e minha mãe Gina M. C. Pedotti pela paciência, pelo apoio e por não nunca me deixar desistir.

A minha filha por ser boazinha e ter nascido só depois da qualificação.

Ao meu pai e meus irmãos pelo apoio e por acreditarem em mim.

Ao Prof. Dr. Silvio Favero pela amizade, pelas oportunidades, pelo conhecimento, por acreditar e nunca desistir de mim desde a época da graduação.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristiana S. Macedo pela oportunidade de realizar o trabalho, pelas horas agradáveis no laboratório trabalhando, pela ajuda na realização desse trabalho e por acreditar em mim.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosemary Matias pela orientação das análises fitoquímicas e por ter disponibilizado um tempo para me ajudar.

Ao Rodrigo Cirino pela amizade e por ter me ajudado muito no Laboratório de Química e pelas conversas.

A Elisângela Manieri pela ajuda nas análises Fitoquímicas.

Aos técnicos dos Laboratórios de Química, Microbiologia e Entomologia.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal em Ensino Superior), pela Bolsa Nível II (Parcial) que foi de grande ajuda.

A todos os meus amigos que de alguma forma me ajudaram e me apoiando.

A turma de mestrado de 2007 pela amizade que espero que dure por muito tempo.

Peço desculpas caso tenha esquecido de alguém, mas saibam que sou grata a todos!

Agradeço de coração a todos que me ajudaram de alguma forma.

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	v
Introdução Geral.....	01
Resumo.....	02
Abstract.....	03
Introdução.....	03
Material e Métodos.....	05
Resultados e Discussão.....	08
Conclusão.....	13
Referências Bibliográficas.....	14

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Resultado da fitoquímica da parte aérea das plantas.....	09
Tabela 02. Média e desvio padrão dos valores em cm, dos halos de inibição.....	09
Tabela 03. Estimativa da Concentração Inibitória Mínima em mg/mL de extrato para <i>E. faecalis</i> por meio de regressão logística.....	11
Tabela 04. Estimativa da Concentração Inibitória Mínima em mg/mL de extrato para <i>S. aureus</i> .....	12

## INTRODUÇÃO GERAL

Não é de hoje a utilização de plantas como remédios. As antigas civilizações, observando animais e as reações do organismo humano ao fazer uso de alguns vegetais, perceberam que eles poderiam curar doenças. O conhecimento desde a identificação até a utilização das plantas era passado de geração para geração. Atualmente, a ciência está verificando o real benefício das plantas.

Com o uso indevido de antibióticos, o fenômeno de resistência bacteriana vem à luz, isso significa que determinados tratamentos já não funcionam, os agentes antimicrobianos não conseguem combater os agentes infecciosos, e como consequência, a infecção não é curada.

Plantas com ação antimicrobiana vêm sendo estudadas em todo o mundo, pois com bactérias cada vez mais resistentes, a procura por novas drogas é de suma importância. Após identificar o princípio ativo capaz de combater bactérias, fungos, dentre outros, as plantas podem ser usadas no tratamento de doenças.

O Brasil possui vários ecossistemas com diferentes tipos de plantas. O Pantanal é uma região com vasta quantidade de plantas pouco estudadas. Assim o objetivo desse trabalho foi verificar se as plantas *Coccoloba ochreolata* Wedd. (Polygonaceae) mais conhecida como Canjiquinha, *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae) mais conhecida como Almécega, *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. (Lauraceae) mais conhecida como Batalha ou canela-amarela e *Sapium haemospermum* (Müll. Arg.) Hub. (Euphorbiaceae) mais conhecida como Leiteira, coletadas no Pantanal do Negro (Estado de Mato Grosso do Sul – MS) possuem ação antibacteriana.

## Prospecção de Plantas do Pantanal com Ação Antimicrobiana.

Striquer, L. P.<sup>1</sup>; Favero, S.<sup>2</sup>; Mercante, M. A.<sup>2</sup>; Macedo, C. S.<sup>2</sup>

1/ Mestre em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional – Anhanguera-Uniderp, Campo Grande - MS

2/ Prof. Dr. Anhanguera-Uniderp, Campo Grande – MS

Email: larapedotti@yahoo.com.br

**RESUMO:** Com o uso indevido de medicamentos, o problema de resistência microbiana vem aumentando, e devido a isso, a procura por novas drogas é de suma importância. A utilização de plantas para tratamentos e como fonte de princípios ativos é uma prática comum. Nesse sentido, a região do Pantanal possui uma grande variedade de plantas ainda bastante inexplorada. Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar se as espécies *Coccoloba ochreolata* (Polygonaceae), *Protium heptaphyllum* (Burseraceae), *Ocotea diospyrifolia* (Lauraceae) e *Sapium haemospermum* (Euphorbiaceae) possuem atividade antibacteriana. Partes aéreas das plantas foram extraídas com etanol a quente e a frio, e a atividade antimicrobiana dos extratos brutos foi avaliada através dos métodos de difusão em ágar e concentração inibitória mínima (CIM/MIC), frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Todos os testes foram realizados em triplicata, utilizando gentamicina e DMSO como controle positivo e negativo, respectivamente. *O. diospyrifolia* foi a planta que apresentou a maior atividade inibitória sobre os microrganismos *E. faecalis* e *S. aureus*, com halos de inibição com valores de 14,5 mm para a extração a frio e 16,33 mm para a extração a quente, e 13,16 mm extração a frio e 13,89 mm extração a quente, respectivamente. Para *E. faecalis*, a planta com maior CIM (99%) foi *S. haemospermum* em extração a quente com CIM estimada em 33 mg/mL, e *P. heptaphyllum* em extração a quente apresentou a menor CIM (99%) com CIM 4,5 mg/mL. Já para o *S. aureus*, a planta *C. ochreolata* a quente apresentou o menor valor de CIM (99%) com valor 1,5 mg/mL, enquanto *S. haemospermum* a quente apresentou o maior de CIM (99%) de 15,5 mg/mL. Podemos dizer que para o teste de difusão em Ágar a planta que obteve melhor resultado foi a *O. diospyrifolia* frente aos microrganismos testados, já para o CIM (99%), a planta com o melhor resultado de inibição do *E. faecalis* foi *P. heptaphyllum* a quente, e para *S. aureus* foi *C. ochreolata*.

Palavras-chave: **Atividade antibacteriana, CIM/MIC, *Coccoloba ochreolata*, *Protium heptaphyllum*, *Ocotea diospyrifolia*.**

**ABSTRACT: Screening of antibacterial activity of the plant extracts from Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil.** With the wide use of antimicrobial drugs, the problem of resistance is increasing, and because of this, the search for new drugs is very important. The use of plants for medical treatments and as source of active compounds is a common practice. Accordingly, the region of Pantanal (Brazilian wetlands) has a big variety of still unexplored plants. The objective of this study was to determine whether the species *Coccoloba ochreolata* (Polygonaceae), *Protium heptaphyllum* (Burseraceae), *Ocotea diospyrifolia* (Lauraceae) e *Sapium haematospermum* (Euphorbiaceae) have antibacterial activity. Aerial parts of the plants were extracted with ethanol by hot and cold methods, and the antimicrobial activity of crude extracts was evaluated by the agar diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC), against the human pathogens *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. All tests were performed in triplicate, using gentamicin and DMSO as positive and negative control, respectively. In the disk diffusion test, *O. diospyrifolia* extracts showed the greatest antimicrobial activity on the microorganisms *E. faecalis* and *S. aureus*, with inhibition zones with values of 14.5 mm for the cold ethanol extract and 16.33 mm for the hot ethanol extract, and 13.16 mm (cold ethanol extract) and 13.89 mm (hot ethanol extract), respectively. For *E. faecalis*, the plant with higher MIC (99%) was *S. haematospermum* (hot ethanol extract) with an estimated MIC of 33 mg/mL. *P. heptaphyllum* (hot ethanol extract) had the lowest MIC (99%) with MIC 4.5 mg/mL. For *S. aureus*, the hot ethanol extract of the plant *C. ochreolata* showed the lowest value of MIC (99%) with value 1.5 mg/mL, while *S. haematospermum* hot ethanol extract gave the higher MIC (99%) of 15.5 mg / mL. For the test agar diffusion, the best results were obtained with *O. diospyrifolia*, and in the MIC (99%), the plant with the best inhibitory effects on *E. faecalis* was *P. heptaphyllum* (hot ethanol extract), and on *S. aureus* was *C. ochreolata*. The difference on the obtained results by different methodologies brings out the importance of the type of assay used in antimicrobial evaluation of plant extracts.

**Key words: Antibacterial activity, MIC, *Coccoloba ochreolata*, *Protium heptaphyllum*, *Ocotea diospyrifolia*.**

## INTRODUÇÃO

No início do desenvolvimento da medicina moderna, o conhecimento tradicional começou a ser abandonado, por ser considerado ineficiente. Entretanto, inúmeras pesquisas mostrando a eficiência e confiabilidade de preparações utilizando plantas reverteram esse processo. Atualmente, o emprego de plantas medicinais para o tratamento de algumas doenças corriqueiras tem sido apoiado pela classe médica e por programas oficiais de saúde (Stefanello *et al.*, 2006).

A história do uso de plantas medicinais tem mostrado que elas fazem parte da evolução humana, e que foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pela humanidade. As antigas civilizações têm suas próprias referências históricas acerca das plantas medicinais e, muito antes de aparecer qualquer forma de escrita, o homem já utilizava as plantas e, entre estas, algumas como alimento e outras como medicamento (Dorta, 1998 *apud* Tomazzoni, *et al.* 2006).

A descoberta humana das propriedades úteis ou nocivas dos vegetais tem suas raízes no conhecimento popular. A observação do comportamento dos animais e a verificação empírica dos efeitos da ingestão de vegetais no organismo humano tiveram um papel importante. Além da crença sobre o poder de cura de certas plantas, a fitoterapia vem sendo estudada, aperfeiçoada e aplicada por diversas culturas, e pela ciência (Tomazzoni *et al.*, 2006). Segundo Martins *et al.* (1995), são consideradas plantas medicinais aquelas que possuem um ou mais princípios ativos, conferindo-lhe atividade terapêutica.

Os seres humanos apresentam abundante flora bacteriana normal onde a maioria das bactérias não provoca doenças. Entretanto, quando a flora residual é perturbada, microrganismos transitórios podem colonizar, proliferar e dar origem a doenças; como exemplo, *Staphylococcus aureus* é um patógeno importante para os seres humanos e responsável por muitas infecções graves (Jawetz *et al.*, 1991).

A resistência de patógenos humanos a medicamentos é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica, e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. O consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública (Duarte, 2006).

Farmacêuticos, botânicos, microbiologistas, químicos dentre outros estudam produtos naturais que poderiam ser usados no tratamento de doenças infecciosas. As plantas são ricas em uma grande variedade de metabólitos secundários, como taninos, terpenóides,

alcalóides e flavonóides, que *in vitro* demonstraram ter propriedades antimicrobianas (Cowan, 1999).

As propriedades antimicrobianas de substâncias e óleos essenciais que as plantas contêm como produtos de seu metabolismo secundário têm sido reconhecidos empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente. Vários grupos de pesquisadores estudam a atividade biológica de plantas medicinais originárias de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas. Extratos e óleos essenciais de plantas mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias (Duarte, 2006).

O Brasil é dono da maior biodiversidade do mundo, e não se conhecem todas as plantas e seus possíveis usos para a medicina. Devido a essa grande importância das plantas, Pott & Pott (1994) em seu livro “Plantas do Pantanal” tentaram resgatar e divulgar o rico conhecimento pantaneiro sobre a “farmácia do mato”, pois os pantaneiros, sob a influência de rádios e televisões, estavam se esquecendo do uso medicinal das plantas.

A flora pantaneira caracteriza-se pela riqueza e abundância de espécies. A planta *Coccoloba ochreolata* Wedd. (Polygonaceae), popularmente conhecida como Canjiquinha, ocorre frequentemente em borda de caapões, clareiras de mata semidecídua, mata ciliar de vazante e campos alagáveis por rio. *Protium heptaphyllum* March. (Burseraceae) ou Almécega ocorre em caapões e cordilheiras, suas folhas e cascas são utilizadas como chá contra tosse, bronquite e coqueluche, úlceras, problemas de pele e hemorragias. *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez. (Lauraceae) é conhecida como batalha ou canela-amarela; *Sapium haematospermum* (Müll. Arg.) Hub. (Euphorbiaceae), vulgarmente chamada de Leiteira, ocorre em bordas inundáveis de lagoa até a mata (Pott & Pott, 1994).

Assim, o objetivo desse trabalho foi verificar se as plantas, *C. ochreolata*, *P. heptaphyllum*, *O. diospyrifolia* e *S. haemospermum* coletadas no Pantanal do Negro (Estado de Mato Grosso do Sul – MS) possuem ação antibacteriana.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **COLETA E PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL**

O material vegetal foi coletado no Instituto de Pesquisa do Pantanal – IPPAN, Pantanal do Negro, município de Aquidauana, MS - em março de 2006; os exemplares foram identificados pela Professora Ubirazilda Maria Resende, com exsiccatas depositadas no Herbário da UNIDERP com registros de 5076 *P. heptaphyllum* (Burseraceae), 5075 *S. haemospermum* (Euphorbiaceae), 5074 *O. diospyrifolia* (Lauraceae) e 5082 *C. ochreolata* (Polygonaceae). As partes aéreas das plantas coletadas foram secas em estufa de circulação forçada, trituradas a pó e levadas ao Laboratório de Química Orgânica para extração.

### **TRIAGEM FITOQUÍMICA**

Para a identificação das classes dos principais metabólitos secundários presentes nas espécies selecionadas, foram realizados ensaios fitoquímicos qualitativos seguindo o método adaptado por Matias (2007), de Simões (2004) e Matos (1997).

Foram pesadas 20,0 g ( $\pm 0,0001$ ) de cada planta, adicionado 100 mL etanol (99,5%); o material foi deixado por 60 minutos no Sonicador (Unique 1450<sup>®</sup>, Modelo Ultrasonic Cleaner) e aquecido em banho-maria a 60°C por dois dias, a amostra foi fervida por 5 minutos, resfriada e filtrada usando algodão. O extrato obtido foi armazenado em frasco âmbar e identificado. Paralelamente, prepararam-se os extratos aquosos seguindo o mesmo método do extrato etanólico.

Tanto os extratos etanólicos quanto os aquosos foram submetidos à triagem fitoquímica, via úmida, quanto às análises de: flavonóides, alcalóides, esteróides, triterpenos, terpenos, antraquinonas livres, compostos fenólicos, taninos, glicosídeos cianogênicos, antocianinas, cumarinas e saponinas.

## ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para o preparo dos extratos para a realização dos testes de ação antibacteriana, foram pesados em balança analítica 25 g do pó de cada planta, sendo submetidos a dois métodos de extração com etanol: método de extração a quente, utilizando aparelho Extrator Soxhlet e método de extração a frio com o auxílio do Sonicador (Unique® 1450, Modelo Ultrasonic Cleaner). O solvente foi evaporado em banho-maria, e os extratos armazenados em frasco plástico transparente em temperatura ambiente.

Os extratos foram diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido), na concentração de 100 mg/mL. Discos de papel de filtro Whatman (6mm de diâmetro) foram impregnados com 10 µL da solução de extrato etanólico de cada planta, tendo assim cada disco 1 mg de extrato.

Os microrganismos utilizados foram cepas padronizadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, tendo sido ativadas de acordo com as orientações do fabricante (Newprov®). As bactérias foram inoculadas em meio TSA (*tryptic soy agar*, Merck®) por 24h à temperatura de 35°C. Após este período, foram ressuspensas em solução fisiológica 0,9% até obter-se uma turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland (NCCLS, 2003).

As bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo agar Müller-Hinton (Merck) com 0.1% de Tween 80 (HOOD et al., 2003). Após a semeadura dos microrganismos, discos com os extratos, disco com gentamicina (10 µg, Newprov®, controle positivo) e

disco com DMSO (controle negativo) foram distribuídos sobre o ágar. Após 24h a 35°C, foi realizada a leitura dos halos de inibição.

Nesse estudo, foram considerados ativos os extratos que apresentaram halo de inibição de 7 mm (Santos-Filho, 1990).

Para a realização do teste Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizada microplaca estéril com 96 poços, onde os extratos etanólicos foram diluídos seriadamente em caldo Müller-Hinton com Tween 80 (0.05%), na concentração inicial de 25 mg/mL. Foi acrescentado 5 µL de suspensão bacteriana padronizada conforme descrito anteriormente e diluída 1:10, a fim de se obter uma concentração final de microrganismos de  $1 \times 10^4$  UFC/mL (NCCLS, 2003). Foram realizados controles com gentamicina (positivo) e DMSO (negativo). A microplaca foi incubada a 35°C, e após 24 horas foi realizada a leitura, através da adição de 20 µL de uma solução alcoólica de INT 0.5 mg/mL (iodonitrotetrazólio, Sigma) e posterior incubação a 35°C por 30 min, mostrando a presença (cor roxa) ou ausência (cor amarela) de atividade celular (Valgas *et al.*, 2007). A CIM foi a menor concentração onde foi observada a ausência de crescimento. Os dados de CIM foram submetidos à regressão logística (logit) para obtenção da CIM<sub>50%</sub> e CIM<sub>99%</sub>, utilizando-se do software Bioestat 5.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da triagem fitoquímica das folhas de *Ocotea dispyrifolia*, ficou evidente a presença de compostos fenólicos, flavonoides e alcalóides. As folhas de *Protium heptaphyllum* possuem compostos fenólicos, flavonóides, saponinas, esteróides e triterpenos livres, antraquinonas livres e alcalóides. As partes aéreas da *Sapium haemospermum* possuem compostos fenólicos, taninos, flavonóides, geninas flavônicas, saponinas e alcalóides. A espécie *Coccoloba ochreolata* contém compostos fenólicos, taninos, flavonóides, geninas flavônicas e antraquinonas livres (Tabela 01).

Assim sendo, todas as espécies estudadas possuem metabólitos com potencial antimicrobiano (Cowan, 1999).

TABELA 01. Resultado da fitoquímica da parte aérea das plantas

Metabólitos secundários	Burseraceae	Euphorbiaceae	Lauraceae	Polygonaceae
	<i>Protium heptaphyllum</i>	<i>Sapium haematospermum</i>	<i>Ocotea diospyrifolia</i>	<i>Coccoloba ochreolata</i>
Compostos fenólicos	+	+	+	+
Taninos	-	+	-	+
Flavonóides	+	+	+	+
Geninas Flavônicas	-	+	-	+
Saponinas	+	+	-	-
Esteroides e triterpenos livres	+	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-
Antraquinonas livres	+	-	-	+
Antocianinas	-	-	-	-
Glicosídeos cianogênicos	-	-	-	-
Alcalóides	+	+	+	-

(+) presença; (-) ausência.

Das seis bactérias testadas, apenas *S. aureus* e *E. faecalis* tiveram seu crescimento inibido pelos extratos, e apenas em relação a esses microrganismos foram estimadas as CIM.

As plantas *O. diospyrifolia* e *S. haematospermum* apresentaram ação antimicrobiana frente o microrganismo *E. faecalis*, conforme ilustrado na tabela 02.

TABELA 02. Média e desvio padrão dos valores em cm, dos halos de inibição

Extrato vegetal Tipo extração	Microorganismo			
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	A frio	A quente	A frio	A quente
<i>Coccoloba ochreolata</i>	Sem ação	Sem ação	7,83±0,25	9,28±0,75
<i>Ocotea diospyrifolia</i>	14,5±0,84	16,33±1,03	13,16±1,54	13,89±0,78
<i>Protium heptaphyllum</i>	Sem ação	Sem ação	Sem ação	Sem ação
<i>Sapium haematospermum</i>	8±0	9±0,63	9,22±1,48	10,33±2,12
Gentamicina	20±1,41	20±1,41	21,66±3,05	21,66±3,05
DMSO	Sem ação	Sem ação	Sem ação	Sem ação

A gentamicina foi utilizada como controle positivo apresentando halos de 20 mm frente *E. faecalis* e 21 mm sobre *S. aureus*, dentro do esperado para estas cepas (NCCLS, 2003).

*O. diospyrifolia* foi a planta que mostrou maior atividade antibacteriana; foi observada uma pequena diferença entre os extratos, sendo que no extrato obtido a

quente os halos foram de  $16,33 \pm 1,03$  mm para a *E. faecalis* e de  $13,89 \pm 0,78$  mm para a *S. aureus*. Segundo Zanin & Lordello (2007), as plantas do gênero *Ocotea* possuem entre outros metabólitos alcalóides; sendo que estes últimos são conhecidos por terem ação antimicrobiana (Cowan, 1999; Martins *et al.*, 1995). Antunes *et al.* (2006), verificaram que a espécie *O. duckei* apresentou atividade antimicrobiana sobre 50% das cepas de *S. aureus* de origem humana, com halos de inibição de crescimento variando entre 7,0 a 10,0 mm.

Estudos realizados com outras plantas da família Lauraceae evidenciam a presença de princípios ativos com potencial antibacteriano, como o extrato das folhas e frutos de *Persea americana* (Boscolo & Valle, 2008), o óleo essencial de *Aniba duckei* (Nascimento *et al.*, 2007), o extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea gratissima* (Reis, 2006), e os óleos voláteis de *O. nectandrifolia* e *O. puberula* (Raggi, 2008).

*C. ochreolata* não apresentou atividade antimicrobiana frente a *E. faecalis*; já para *S. aureus*, o extrato a quente apresentou halo de  $9,28 \pm 0,75$  mm e a extração a frio halo de  $7,83 \pm 0,25$  mm. No caso de outras espécies da família Polygonaceae, Boscolo & Valle (2008) verificaram que a espécie *Polygonum punctatum* (Polygonaceae) possui ação antimicrobiana, sendo que a mesma ação foi observada por Sofiate (2009) em estudo com *P. acre*. No caso do presente estudo, a espécie *C. ochreolata*, também pertencente à família Polygonaceae, apresentou pouca atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*.

O extrato etanólico obtido a quente de *S. haematospermum* mostrou atividade inibitória frente aos microrganismos *E. faecalis* ( $9,0 \pm 0,63$  mm) e *S. aureus* ( $10,33 \pm 2,12$  mm), assim como o extrato obtido a frio  $8,0 \pm 0$  mm para *E. faecalis* e  $9,22 \pm 1,48$  mm para *S. aureus*. Existem diversos relatos de atividade antimicrobiana de espécies da família Euphorbiaceae: Costa *et al.* (2008) verificou que o óleo essencial das folhas de *Croton zehntneri* possui ação antimicrobiana, assim como extratos em hexano, diclorometano e

etanol das folhas de *Croton urucurana* (Oliveira *et al.*, 2008) e folhas de *Phyllanthus niruri* L. e *Ricinus communis* (Boscolo & Valle, 2008).

Os extratos de *P. heptaphyllum* não produziram nenhum halo de inibição, não possuindo assim atividade inibitória frente aos microorganismos testados. Na medicina popular, *P. heptaphyllum* é utilizada como antiinflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante, onde o óleo de sua resina possui atividade antineoplásica (Correia, 1984 *apud* Bandeira *et al.*, 2002; Siani *et al.*, 1999 *apud* Bandeira *et al.*, 2002).

Para todas as plantas que mostraram atividade antibacteriana, o método de extração a quente obteve valores maiores em relação ao método de extração a frio, o que indica que o método a quente é mais eficiente na extração de princípios ativos.

O fato de algumas plantas apresentarem halo de inibição maior que outras, pode estar relacionado às substâncias existentes nas plantas (metabólitos secundários), sendo que um composto pode influenciar o efeito de outro. Serafin *et al.* (2007) sugerem que substâncias presentes na *Plinia glomerata* (Myrtaceae) atuam contra os microorganismos testados ou existe sinergismo entre as substâncias ocasionando o efeito antimicrobiano evidenciado pelos extratos testados.

A estimativa da CIM (99%) para *E. faecalis* (Tabela 3) para as plantas em estudo mostra uma variação entre 4,5 e 33 mg/mL. Observa-se que a planta com maior CIM (99%) foi *S. haematospermum* em extração a quente com CIM estimada em 33 mg/mL, já *P. heptaphyllum* apresentou a menor CIM (99%) para os dois métodos de extração.

TABELA 03. Estimativa da Concentração Inibitória Mínima em mg/mL de extrato para *E. faecalis* por meio de regressão logística

Família/Extração	Espécie vegetal	MIC/CIM*	
		99% <sup>1</sup>	50% <sup>1</sup>
Burseraceae frio	<i>Protium heptaphyllum</i>	4,9	2,3
Burseraceae quente	<i>Protium heptaphyllum</i>	4,5	2,2
Euphorbiaceae frio	<i>Sapium haematospermum</i>	11,1	3,7
Euphorbiaceae quente	<i>Sapium haematospermum</i>	33,0	9,4
Lauraceae frio	<i>Ocotea diospyrifolia</i>	11,7	5,6
Lauraceae quente	<i>Ocotea diospyrifolia</i>	12,0	5,9
Polygonaceae frio	<i>Coccoloba ochreolata</i>	13,6	3,8
Polygonaceae quente	<i>Coccoloba ochreolata</i>	15,7	3,2

\* Concentração dos extratos em mg/mL.

1/ Probabilidade de inibição determinada por regressão logística ( $\chi^2 > 0,05$ ).

A estimativa da CIM (99%) dos extratos para a bactéria *S. aureus* (Tabela 4) variou de 1,5 a 15,5 mg/mL. O extrato obtido a quente de *C. ochreolata* foi o que apresentou menor estimativa de CIM (99%) enquanto *S. haematospermum* a quente foi o de maior CIM (99%).

TABELA 04. Estimativa da Concentração Inibitória Mínima em mg/mL de extrato para *S. aureus*

Familia/Extração	Espécie vegetal	MIC/CIM*	
		99% <sup>1</sup>	50% <sup>1</sup>
Burseraceae frio	<i>Protium heptaphyllum</i>	5,9	2,2
Burseraceae quente	<i>Protium heptaphyllum</i>	5,0	1,26
Euphorbiaceae frio	<i>Sapium haematospermum</i>	12,0	4,3
Euphorbiaceae quente	<i>Sapium haematospermum</i>	15,5	5,3
Lauraceae frio	<i>Ocotea diospyrifolia</i>	2,0	0,46
Lauraceae quente	<i>Ocotea diospyrifolia</i>	5,0	1,1
Polygonaceae frio	<i>Coccoloba ochreolata</i>	3,0	1,1
Polygonaceae quente	<i>Coccoloba ochreolata</i>	1,5	0,75

\*Concentração dos extratos em mg/mL.

1/ Probabilidade de Inibição determinada por regressão logística ( $\chi^2 > 0,05$ ).

Embora *P. heptaphyllum* a quente tenha apresentado resultado negativo no teste de difusão em ágar, foi a que apresentou o melhor CIM (99%) frente ao microrganismo *E. faecalis*, já a *S. haematospermum* a quente apresentou um halo de inibição de 9 cm e foi a planta com o maior CIM (99%).

*C. ochreolata* a quente não foi a planta que inibiu mais eficientemente o crescimento de *S. aureus* (9,28 cm) no teste de difusão em ágar, mas foi a que apresentou o menor CIM (99%), enquanto que *S. haematospermum* a quente apresentou um halo de inibição de 10,33 cm e foi a planta com o maior CIM (99%).

O teste realizado para determinar o CIM, foi considerado mais eficiente que o teste de difusão em ágar, segundo Ostrosky *et al.* (2008), ao realizarem um trabalho comparando alguns métodos de avaliação da atividade antimicrobiana e determinação do CIM, concluíram que dos métodos de diluição, o método de difusão em ágar é o mais utilizado devido à simplicidade de execução. Entretanto, para a determinação do CIM o método da microdiluição é bastante aplicado, principalmente devido à sua grande

sensibilidade e quantidade mínima de reagentes. Foi ressaltada a importância de avaliar os fatores interferentes de cada método para um determinado fim.

Conclui-se que os extratos das espécies em estudo, independente da técnica de extração, parecem promissores para o controle das bactérias gram-positivas *S. aureus* e *E. faecalis*, pois foram capazes de inibir o seu crescimento. Entretanto, a ausência de atividade frente às espécies de bactérias gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* deve-se provavelmente à diferença entre as paredes celulares desses grupos de bactérias (Murray *et al.*, 2008). Além disso, outros estudos sobre atividade antimicrobiana de espécies nativas também observaram a ineficácia de extratos polares e apolares na inibição do crescimento de bactérias gram-negativas (Suffredini *et al.*, 2006). Considerando-se a importância das bactérias *S. aureus* e *E. faecalis* como patógenos causadores de infecções hospitalares (Emori & Gaynes, 1993), estudos como este vêm somar esforços na busca de novos agentes antimicrobianos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, R. M. P. *et al.* Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.517-524, 2006.

BANDEIRA, P. N. *et al.* Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1078-1080, 2002.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Série Botânica**, v.63, n.2, p.263-277, 2008.

COSTA, J. G. M. *et al.* Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade de óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.583-586, 2008.

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

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **MultiCiência: construindo a história dos produtos naturais** v.7. 2006.

- EMORI, T. G.; GAYNES, R. P. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, n. 4, p. 428-442. 1993.
- HOOD, J.R. *et al.* Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v.15, p. 428-433. 2003.
- JAWETZ, E. *et al.* **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 519p.
- MARTINS, E. R. *et al.* **Plantas Medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. 220p.
- MATIAS, R. **Caderno estudo: análise fitoquímica**. Campo Grande: UNIDERP, 2007. 54p.
- MATOS, J. F. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza : UFC, 1998.
- MURRAY, P. R. *et al.* **Medical Microbiology**, 6ª Edição. Mosby: 2008. 960p.
- NASCIMENTO, A. R. *et al.* Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de Sururu, *Mytella falcata*. **Arquivos de Ciências do Mar**, v.40, n.2, p.47-54, 2007.
- NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- OLIVEIRA, I. S. *et al.* Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.587-593, 2008.
- OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. – Corumbá, MS: EMBRAPA – SPI, 1994. 320p.
- RAGGI, L. **Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano**. 2008. 67p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Plantas Vasculares em Análises Ambientais) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- REIS, M. O. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea gratissima* Gaertn – Abacateiro – (Lauraceae)**. 2006. 76p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca, Franca.

- SANTOS FILHO, D. *et al.* Atividade antibacteriana de extratos vegetais. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, Rio de Janeiro, v.12, p. 39-46, 1990.
- SERAFIN, C. *et al.* Avaliação do potencial antimicrobiano de *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, p.578-582, 2007.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2000.
- SOFIATE, F. T. Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* H. B. K. (Polygonaceae) e *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae). 2009. 100p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara.
- STEFANELLO, M. E. A. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.525-530. 2006.
- SUFFREDINI, I. B. *et al.* Antibacterial activity of Brazilian Amazon plant extracts. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, n.6, p.400-402. 2006.
- VALGAS, C. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380. 2007
- TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem**, v.15, n.1, p.115-121, 2006.
- ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v.30, n.1, p.92-98, 2007.