



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MICROBICIDA DAS FOLHAS DA  
ESPÉCIE *Ayapana triplinervis* Vahl.**

**Tamyris Regina Matos Lopes**

BELÉM – PA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MICROBICIDA DAS FOLHAS DA  
ESPÉCIE *Ayapana triplinervis* Vahl.**

Autora: Tamyris Regina Matos Lopes

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Chagas Monteiro**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Baetas Gonçalves**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA

2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP) Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

---

Lopes, Tamyris Regina Matos.

Avaliação do potencial microbicida das folhas da espécie *Ayapana triplinervis* Vahl. / Tamyris Regina Matos Lopes ; orientadora, Marta Chagas Monteiro, co-orientadora, Ana Cristina Baetas Gonçalves. — 2014

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2014.

1. *Ayapana triplinervis*. 2. Plantas Medicinais. 3. Ação Antimicrobiana. I. Título.

---

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

Tamyris Regina Matos Lopes

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MICROBICIDA DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Ayapana triplinervis* Vahl.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 06/12/2013

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Ana Cristina Baetas Gonçalves – UFPA

---

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira – UFPA

---

Profa. Dra. Marcieni Ataíde de Andrade – UFPA  
(Suplente)

---

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro – UFPA  
Orientadora

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	03
	<b>2.1</b> PLANTAS MEDICINAIS .....	03
	<b>2.2</b> MEDICINA TRADICIONAL NO BRASIL .....	04
	<b>2.3</b> ESPÉCIE <i>AYAPANA TRIPLINERVIS</i> VAHL .....	06
	2.3.1 <i>Ayapana triplinervis</i> V. e seu uso empírico no mundo e no Brasil .....	06
	<b>2.4</b> ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	11
	<b>2.4.1</b> Principais bactérias importantes na clínica associados ao mecanismo de <b>resistência</b> .....	15
	2.4.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
	2.4.1.2 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	18
	2.4.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
	2.4.1.4 <i>Escherichia coli</i> .....	24
	2.4.1.5 <i>Proteus mirabilis</i> .....	25
	2.4.1.6 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	26
	<b>2.5</b> DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS A PARTIR DE PLANTAS .....	27
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
	<b>3.1</b> OBJETIVO GERAL .....	29
	<b>3.2</b> OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	30
	<b>4.1</b> TRATAMENTO PRELIMINAR DO MATERIAL VEGETAL .....	30
	4.1.1 <b>Coleta do material botânico</b> .....	30
	4.1.2 <b>Limpeza, secagem e preparo do material vegetal</b> .....	30
	4.1.3 <b>Obtenção dos extratos hexânico, de acetato de etila, metanólico e         hidroalcoólico</b> .....	30
	4.1.4 <b>Obtenção das frações do extrato metanólico</b> .....	31
	<b>4.2</b> AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	34
	4.2.1 <b>Obtenção e manutenção das cepas testadas</b> .....	34
	4.2.2 <b>Preparo dos meios de cultura</b> .....	36
	4.2.3 <b>Preparo dos inóculos bacterianos</b> .....	36

4.2.4	Avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de <i>A. triplinervis</i> V. frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas pela técnica de microdiluição.....	36
4.2.5	Detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	39
4.2.6	Contagem da Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>

*Resultados com os extratos de Ayapana triplinervis*

<b>5.1</b>	<b>ANÁLISE FITOQUÍMICA</b> .....	<b>41</b>
<b>5.2</b>	<b>ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À <i>S. AUREUS</i></b> .....	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À <i>E. FAECALIS</i></b> .....	<b>43</b>
<b>5.4</b>	<b>ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À <i>E. COLI</i></b> .....	<b>45</b>
<b>5.5</b>	<b>ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE À <i>P. AERUGINOSA</i></b> .....	<b>47</b>

*Resultados com as frações do extrato metanólico de Ayapana triplinervis*

<b>5.6</b>	<b>ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO METANÓLICO FRENTE A BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS</b>	
5.6.1	<i>Escherichia coli</i> - ATCC 8739.....	49
5.6.2	<i>Escherichia coli</i> – Isolado Clínico.....	52
5.6.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – ATCC 25853 .....	53
5.6.4	<i>Proteus mirabilis</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> – ATCC 15290 e 10031 .....	54
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1 -</b>	Fotografia da espécie <i>Ayapana triplinervis</i> V.	7
<b>Figura 2 -</b>	Estrutura básica das cumarinas.	10
<b>Figura 3 -</b>	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.	11
<b>Figura 4 -</b>	Estruturas químicas de compostos antimicrobianos comumente encontrados em plantas	13
<b>Figura 5 -</b>	Componentes estruturais de <i>S. aureus</i> . Fonte: Adaptado de Lowy, 1998. O painel A mostra a superfície e as proteínas secretoras. A síntese de muitas destas proteínas depende da fase de crescimento, como mostra o gráfico, e é controlada por genes regulatórios. O painel B e C mostra segmento do envelope celular. TSST-1 simboliza a toxina do choque tóxico.	17
<b>Figura 6 -</b>	Esquema de empacotamento da cromatografia em coluna.	32
<b>Figura 7 -</b>	Esquema de eluição da cromatografia camada delgada	34
<b>Figura 8 -</b>	Bactérias em meio específico. <b>A.</b> <i>S. aureus</i> semeado em ágar manitol; <b>B.</b> <i>E. faecalis</i> em ágar sangue; <b>C.</b> <i>E. coli</i> em ágar Mac-Conkey e <b>D.</b> <i>P. aeruginosa</i> em ágar cetrimide.	35
<b>Figura 9 -</b>	Representação esquemática simplificada da microdiluição em placas de 96 poços para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).	37
<b>Figura 10 -</b>	Esquema representativo da Diluição de extratos e frações – de eppendorfs aos poços.	38
<b>Figura 11 -</b>	Representação esquemática simplificada da microplacas de 96 poços na microdiluição dos diferentes extratos – 1ª etapa de experimentos. A. 500 µg/mL; B. 250 µg/mL; C. 125 µg/mL; D. 62,5 µg/mL; E. 31,3 µg/mL.	38
<b>Figura 12 -</b>	Representação esquemática simplificada da microplacas de	39

	96 poços na microdiluição das frações do extrato metanólico. 2ª etapa de experimentos. A. 500 µg/mL; B. 250 µg/mL; C. 125 µg/mL; D. 62,5 µg/mL; E. 31,3 µg/mL.	
<b>Figura 13 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do <b>Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>S. aureus</i> (ATCC 6538).	42
<b>Figura 14 -</b>	Controle de crescimento positivo <i>S. aureus</i> (ATCC 6538).	42
<b>Figura 15 -</b>	Concentração inibitória mínima (CIM) e menor concentração testada do <b>Extrato Hidroalcoólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212).	43
<b>Figura 16 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e maior concentração testada do <b>Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212).	43
<b>Figura 17 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e menor concentração testada do <b>Extrato Acético</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212).	44
<b>Figura 18 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e menor concentração testada do <b>Extrato Hexânico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212).	44
<b>Figura 19 -</b>	Inóculo e DMSO 10%. frente a <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212).	45
<b>Figura 20 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do <b>Extrato Hidroalcoólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. coli</i> (ATCC 8739).	45
<b>Figura 21 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do <b>Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. coli</i> (ATCC 8739).	46
<b>Figura 22 -</b>	Concentração Bactericida Mínima (CBM) e maior concentração testada do <b>Extrato de Acetato de Etila</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. coli</i> (ATCC 8739).	46
<b>Figura 23 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do <b>Extrato Hexânico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. coli</i> (ATCC 8739).	47

<b>Figura 24 -</b>	Inóculo e DMSO 10%. frente a <i>E. coli</i> (ATCC 8739).	47
<b>Figura 25 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do <b>Extrato Hidroalcoólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 25853).	48
<b>Figura 26 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e maior concentração testada do <b>Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 25853).	48
<b>Figura 27 -</b>	Inóculo e DMSO 10%. frente a <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 25853).	49
<b>Figura 28 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) <b>da Fração 1 do Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. coli</i> (ATCC 8739).	50
<b>Figura 29 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) <b>da Fração 3 do Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. coli</i> (ATCC 8739).	50
<b>Figura 30 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) <b>da Fração 4.1 do Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. coli</i> (ATCC 8739).	51
<b>Figura 31 -</b>	DMSO 10% e penicilina-streptolisina mostrando 100% de morte bacteriana.	51
<b>Figura 32 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) <b>da Fração 3 do Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>E. coli</i> ( <b>ISOLADO CLÍNICO</b> ).	52
<b>Figura 33 -</b>	Controle de crescimento positivo de <i>E. coli</i> ( <b>ISOLADO CLÍNICO</b> ) com DMSO 10% e penicilina-estreptolisina com morte de 100% das bactérias.	52
<b>Figura 34 -</b>	Concentração Inibitória Mínima (CIM) <b>da Fração 3 do Extrato Metanólico</b> de <i>A. triplinervis</i> V. frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25853.	53

<b>Figura 35 -</b>	Controles do ensaio com <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (a.) DMSO 10 e (b.) Antibiótico.	53
<b>Figura 36 -</b>	Controles do ensaio com <i>Proteus mirabilis</i> . (a.) DMSO 10% e (b.) Antibiótico.	54
<b>Figura 37 -</b>	Controles do ensaio com <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 0000. (a.) DMSO 10% e (b.) Antibiótico.	54
<b>Figura 38 -</b>	Metabólitos secundários isolados de <i>Ayapana triplinervis</i> V.: aiapanina (1), aiapina (2), dafnetina (3), dimetil éter dafnetina (4), metil-7-éter dafnetina (5), hidrangetina (6), umbeliferona (7), estigmasterol (8), éter metil timol (9), éter dimetil timoquinol (10), e timoquinona (11).	56

## LISTA DE QUADROS

		<b>Página</b>
<b>Quadro 1 -</b>	Presença de compostos já isolados na Japana	8
<b>Quadro 2 -</b>	Informações etnomedicinais sobre a Japana no Brasil.	10
<b>Quadro 3 -</b>	Análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólico; Metanólico; de Acetato de etila e Hexânico de folhas de <i>Ayapana triplinervis</i> V. (+)Resultado Positivo (-) Resultado negativo.	41
<b>Quadro 4 -</b>	Atividade biológica dos extratos da japana.	60

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
<b>Tabela 1-</b>	Principais classes de componentes antimicrobianos derivados de plantas.	12
<b>Tabela 2-</b>	CIMs do extrato de folhas cruas de <i>A. triplinerve</i> contra bactérias testadas – experimento RAHMAN e JUNAID (2008).	14
<b>Tabela 3-</b>	Resumo da atividade antibacteriana dos extratos frente às diferentes bactérias testadas (dados em $\mu\text{g/mL}$ ).	50
<b>Tabela 4 -</b>	Resumo da atividade antibacteriana das Frações do Extrato metanólico frente as diferentes bactérias testadas.	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>EPEC</b>	E. coli enteropatogênica
<b>EIEC</b>	E. coli enteroinvasora
<b>ETEC</b>	E. coli enterotoxigênica
<b>EAEC</b>	E. coli enteroagregativa
<b>EHEC</b>	E. coli entero-hemorrágica
<b>ESBLs</b>	$\beta$ -Lactamases de amplo espectro
<b>ERV</b>	Enterococos Resistente À Vancomicina
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetil-2-Tiazol)-2,5-Difenil-Brometo de Tetrazolium
<b>NCCLS</b>	National Committee for Laboratory Standards
<b>ND</b>	Não Detectado
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-americana de Saúde
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>PNPMF</b>	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
<b>PBP</b>	proteínas de ligação às penicilinas
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>TSST-1</b>	toxina do choque tóxico
<b>UPEC</b>	Escherichia coli - extra-intestinal
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônias
<b>UTIs</b>	unidades de terapia intensiva
<b>WHO</b>	World Health Organization

“– Por que eles falam tão difícil? – perguntou certa noite ao Inglês. Notou também que o Inglês andava meio aborrecido e sentindo falta de seus livros.

– Para que só os que têm responsabilidade de entender que entendam – disse ele. – Imagine se todo mundo saísse transformando chumbo em ouro. Daqui a pouco o ouro não ia valer nada. Só os persistentes, só aqueles que pesquisam muito, é que conseguem a Grande Obra. Por isso estou no meio deste deserto. Para encontrar um verdadeiro Alquimista, que me ajude a decifrar os códigos”.

*O Alquimista*

**Dedico este trabalho ao meu filho João Paulo.**

## Agradecimentos

A **Deus**, pela oportunidade de concluir com sacrifício mais uma etapa dessa breve passagem.

À minha **Família – Mãe, Pai, Vovó, Irmão e namorado Alexandre Nogueira** que me deram o suporte necessário e também são responsáveis pela conclusão deste trabalho.

Ao meu filho **João Paulo** que me mostrou o que é o amor verdadeiro e dá sentido a minha vida todos os dias.

Todos os **colegas, amigos, técnicos e professores** da Faculdade de Farmácia, em especial Profa. Dra. **Ester Baptista** pelos momentos de amizade e incentivo, **Fabio Chada, Rosyanna Albuquerque e Fábio Oliveira** pela ajuda muito valiosa nos momentos de laboratório.

À Profa. Dra **Marta Chagas Monteiro** pela orientação, apoio e atenção dedicados durante a realização desse trabalho.

À Prof. Dra. **Ana Cristina Baetas Gonçalves** pela gentil cessão do seu espaço no Laboratório de Bromatologia e todo o apoio necessário de seus IC's que acompanharam e muito ajudaram a produção dos experimentos neste trabalho.

Aos **colegas** do Grupo de Microbiologia pelo convívio e longa amizade.

Às Profas. Dras. **Ester Baptista e Marcieni Andrade** pelas contribuições durante algumas etapas do trabalho e pela amizade que construímos.

Aos colegas **Rosyanna Albuquerque, Jefferson Pereira e Flávia Filocreão**, pela amizade e companheirismo que eu espero durar a vida inteira.

À **UFPA** e à **CAPES**, pelo apoio financeiro.

# 1 INTRODUÇÃO

---

Inúmeros microrganismos apresentam elevada resistência aos antimicrobianos, dentre as bactérias e fungos que sofreram este processo destacam-se os *Staphylococcus sp.*, a família Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, o *Acinetobacter baumannii* e, mais recentemente, os hemófilos, gonococos, enterococos e pneumococos. Atualmente a resistência bacteriana é razão de grande preocupação entre pesquisadores, microbiologistas e clínicos da área, devido aos problemas ocasionados por este processo na terapêutica (CORREA et al., 1989 e SWARTZ, 1997)

Diante deste contexto, há a necessidade da pesquisa para a descoberta de novas drogas antimicrobianas contra estes patógenos multirresistentes que veem crescendo, progressivamente, durante os últimos anos. As potencialidades de uso das plantas medicinais contra estes microrganismos se encontram em estado de evolução inicial, seja como recurso terapêutico, seja como fundamento para o surgimento de novos fármacos. Também vale atentar para o fato de que a biodiversidade amazônica constitui fator relevante no estado para a pesquisa destas novas terapêuticas baseadas nos recursos vegetais disponíveis.

As plantas são a matéria-prima para a produção de medicamentos, sejam estes de origem natural ou sintética e são também utilizadas em práticas empíricas e tradicionais como remédios caseiros e comunitários - processo conhecido como medicina tradicional. Este acervo genético do Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais inclusive um vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais. Uma estratégia relevante de ampliação das opções terapêuticas ofertadas à população com vistas à melhoria da atenção a saúde é o emprego do material vegetal como fitoterápico ou fonte de substâncias ativas para o desenvolvimento de novos fármacos (ADAME et al., 2006).

As pesquisas atuais enfocam as áreas de fitoquímica, farmacognosia e horticultura para a maioria das plantas medicinais. Na primeira, as plantas são caracterizadas por sua possível composição de compostos bioativos, que são separadas e submetidas à análise estrutural detalhada (BRISKIN, 2000). Na Farmacognosia, os ensaios envolvem a pesquisa de bioatividade, identificação de ação e potencial farmacológico, e busca de sítios de ação destes compostos bioativos. A pesquisa em horticultura, dentre outras funções busca aperfeiçoar o processo de desenvolvimento de capacidade e crescimento ideal no cultivo destes vegetais. Partindo do princípio que muitas plantas medicinais ainda são colhidas na natureza e as

condições de cultivos ainda não foram padronizadas, os métodos de pesquisa são muito pertinentes, visto que a colheita de plantas medicinais selvagens pode ser problemática à perda da biodiversidade, as variações de qualidade em potencial do vegetal e, ocasionalmente, dificuldades de identificação, com isso levando a sérias consequências do uso aleatório de plantas medicinais (BRISKIN, 2000).

Tratando-se de uma prática que estimula a participação direta da população no processo saúde-doença, a realização da avaliação da espécie *Ayapana triplinervis* V., que é uma planta de prevalência amazônica e de uso tradicional, mostra-se essencial, principalmente para preconizar a realização de prospecções fitoquímicas. Além de possibilitar a caracterização de seus componentes e de frações do material vegetal, assim como determinar avaliações farmacológicas destes produtos, tais como atividade antimicrobiana, a fim de determinar a eficácia e garantir a segurança ao uso de plantas medicinais, e de seus derivados e produtos fitoterápicos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 PLANTAS MEDICINAIS

O emprego de plantas medicinais é uma prática secular, fundamentada no conhecimento empírico e transmitida entre as gerações, conhecida por medicina tradicional. O uso empírico destas plantas, cuja maioria é cultivada em residências, vem sendo amplamente discutido pelos serviços de saúde e pela sociedade científica, devido sua preocupação pela utilização correta e racional dessas plantas com possíveis propriedades farmacológicas.

Dentre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (ADAME et al., 2006). Partindo deste conceito, a fitoterapia é a prática do uso de plantas ou suas partes com a finalidade terapêutica (FETROW e ÁVILA, 2000), cuja terapia é regulamentada pela RDC nº 14, de 31 de março de 2010 da Agência de Vigilância Sanitária.

Segundo Baptista (2007) as plantas medicinais são aquelas que têm atividade biológica, possuindo um ou mais princípios ativos úteis à saúde humana. No Brasil, de acordo com a RDC nº 14 as plantas medicinais são consideradas, em muitos casos, como suplemento alimentar. Além disso, podem ser adquiridas em farmácias de manipulação, supermercados ou feiras livres apesar de serem regulamentadas pelo Ministério da Saúde; o controle de qualidade é precário ou inexistente; não há necessidade de registro obrigatório no próprio Ministério da Saúde ou qualquer outro órgão controlador para o comércio e venda de plantas medicinais, a granel ou embalados como chás e podem ser utilizadas em cosméticos e, neste caso, se denominam cosmeceuticos. Os fitoterápicos são, portanto, “remédios” originados, exclusivamente, de material botânico integral ou de seus extratos e, importa definir outro termo, o fitofármaco, que é a substância ou a base medicamentosa, isolada de extratos de plantas (BRASIL, 2010).

Graças a sua expansão territorial e posição geográfica, o Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, inclui-se neste contexto as plantas, concentrando entre 15% a 20% do número total de espécies do globo (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2006.). Além da biodiversidade, a diversidade cultural das populações tradicionais também impressiona pelo seu próprio aspecto cultural e pelos conhecimentos acumulados de uso sustentável da biodiversidade. Tais populações são detentoras de ampla gama de conhecimentos sobre os recursos genéticos, principalmente no que se refere à utilização de espécies da flora como

produtos medicinais ou fitoterápicos. Somado a este fato, o Brasil é detentor de um parque científico, com laboratórios e universidades capazes de trabalhar no desenvolvimento de fármacos. Entretanto, apesar de possuir a maior biodiversidade do planeta com potencial medicinal, conhecimento tradicional e ainda de deter parque científico e tecnológico para desenvolvimento de novos fármacos, o Brasil representa o décimo mercado farmacêutico mundial e importa fármacos e medicamentos principalmente da Alemanha, Reino Unido e Estados Unidos (GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 85% da população mundial utiliza plantas medicinais para tratar agravos à saúde, no Brasil, os percentuais são próximos, estimando-se que 82% da população brasileira utilize produtos a base de ervas, e ainda o setor fitoterápico movimenta anualmente R\$ 1 bilhão em toda sua cadeia produtiva e emprega mais de 100 mil pessoas (ADAME et al., 2006).

Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001). Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS, 11% são originárias de plantas e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Além disso, nas últimas décadas, o interesse populacional pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados e encontra-se em expansão o uso de plantas medicinais e fitoterápicos (WHO, 2002).

É reconhecida mundialmente a importância dos produtos naturais no desenvolvimento de modernas drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). Estas plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese ou modelos de compostos farmacologicamente ativos (WHO, 2002). Partindo deste princípio, se pensa, cada vez mais, na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos a partir destes materiais vegetais.

## 2.2 MEDICINA TRADICIONAL NO BRASIL

Estudar a relação entre meio ambiente e saúde é um tema difícil, pois envolve a qualidade de vida dos seres humanos e do planeta em geral, além de interesses e políticas variadas em todas as esferas do contexto nacional, principalmente em se tratando de um país com biodiversidade tão extensa (MALHEIROS E LOPES, 2011).

De acordo com a OMS (WHO, 2002), é cada vez maior o número de organizações não governamentais e institutos de pesquisas envolvidos com a medicina tradicional, na maioria dos países em desenvolvimento, dentre eles o Brasil que possui entre 15 e 20% de toda a diversidade biológica do mundo, aproximadamente 55 mil espécies pertencentes à flora nacional, o que representa 25% de todas as espécies conhecidas. Esse número, baseado em levantamentos bibliográficos, fornece pistas sobre o potencial brasileiro, pois, provavelmente menos de 1% dessas 55 mil espécies foram estudadas química e farmacologicamente, informam Barata e Queiroz (1995) e Guerra e Nodari (2004). Aliado à falta de recursos para a identificação e pesquisa das espécies de plantas medicinais nativas, o Brasil não tem uma legislação eficaz sobre a exploração comercial de seus recursos genéticos, abrindo espaço para a biopirataria.

No país, dentre os fitoterápicos mais utilizados estão a babosa, usada no tratamento de queimaduras; o boldo e a carqueja, indicados para má digestão; a hortelã, utilizada como expectorante; o alho, para o tratamento de gripes e resfriados e redução de colesterol; e a calêndula, a andiroba e copaíba como anti-inflamatórios e antissépticos (SOLER, 2000). A fitoterapia sobreviveu no Brasil devido às raízes profundas na consciência popular que reconheceu sua eficácia e legitimidade (SACRAMENTO, 2001). Embora haja centenas de instituições e prefeituras trabalhando com fitoterapia no atendimento da população, ainda não há um apoio oficial do Ministério da Saúde (DANIELE e DULCIAN, 2012).

A fitoterapia vem despontando com excelentes avanços devido aos trabalhos desenvolvidos em comunidades (ONGs) e Instituições públicas (municipais, estaduais e federais), dentro do grande conflito econômico e social deste país que tem o maior índice de exclusão social na América Latina. Tendo em vista que, aproximadamente, 100 milhões de pessoas não têm acesso a medicamentos, há movimentos muito fortes no país, tentando fortalecer as iniciativas que utilizam práticas “não convencionais” no atendimento da população (MARQUES, 2001; SACRAMENTO, 2001).

Dentre as espécies encontradas na região amazônica, relata-se o uso da Japana (*Ayapana triplinervis* V.), que em perspectiva real é uma das plantas utilizadas na medicina tradicional, com grande foco sob algumas áreas de tratamento, como antibacteriana, consistirá como objeto de estudo desta pesquisa.

## 2.3 ESPÉCIE *AYAPANA TRIPLINERVIS* VAHL.

### 2.3.1 *Ayapana triplinervis* V. e seu uso empírico no mundo e no Brasil.

A espécie *Ayapana triplinervis* Vahl. R. M. King & H. Robinson pertence à família Asteraceae e na literatura pode aparecer com os seguintes sinônimos: *Eupatorium triplinerve* Vahl e *Eupatorium ayapana* (Vent.). É vulgarmente conhecida como: Aypana, Aypana Chá (Inglaterra); Aypan, Ayapan, Bishallakarani (Bangladesh); Aiapana, Iapana, Japana, Japana Branca, Japana Roxa, Erva-de-Cobra, Erva-Santa (Brasil); Aiapana, Diapana, Thé de L'amazone (Guiana Francesa); Sekreptoewiwiri (Suriname) e Herbe à Thé, HerbeVulneraire (Antilhas do oeste da França) (GAUVIN-BIALECKI e MARODON, 2009).

Waring (1868) descreveu na Farmacopéia da Índia *Eupatorium ayapana* (*Ayapana triplinervis* V.) como uma espécie sul-americana, naturalizada em várias partes da Índia, mas geralmente conhecida pelo seu nome brasileiro Ayapana, sendo a planta inteira aromática, de sabor ligeiramente amargo e adstringente. Há razões para afirmar que possui propriedade estimulante, tônica e sudorífica. De acordo com as declarações de Bouton (1864), ela ocupa um lugar entre as principais plantas medicinais das ilhas Maurícias, usada sob a forma de infusão contra dispepsia e outras infecções do estômago e dos pulmões. Nas epidemias de cólera na ilha, em 1854 e 1856, foi amplamente utilizada para restaurar o calor corporal e para melhorar a circulação. Relata-se seu uso também como antídoto para picadas de cobra, utilizada tanto interna quanto externamente, com sucesso alegado, segundo Montgomery (1862).

Bondurant (1887) estudou a *Ayapana* e suas características botânicas e observou que: suas folhas são largas, castanhas e/ou verde, lisas, lanceoladas, oblongas, com margens pouco revolutas. Duas veias laterais são proeminentes e se ramificam a partir da nervura central, perto da base, estendem-se paralelas com a margem para o ápice. O odor é leve como a cumarina, e seu sabor levemente adstringente e aromático. As folhas eram recomendadas contra indigestão, reclamações peitorais e cólera, e foram utilizados para estes fins na Europa no início do século retrasado.

Esta planta cresce até um metro de altura e é uma erva ornamental ereta, perene e semi-lenhosa na base. As folhas (4,5-10,5 cm de comprimento e 0,8-1,7 cm de largura) são aromáticas, suaves, simples, opostas, subsésseis, trinervadas, acuminadas, glabras e lanceoladas. As hastes são de coloração marrom-avermelhada. As cabeças de muitas flores

variam de 6-13 milímetros de comprimento cada (GAUVIN-BIALECKI & MARODON, 2009).



Figura 1: Fotografia da espécie *Ayapana triplinervis* V. Fonte: <http://healthmad.com/alternative/philippines-medicinal-plants-part-two/3/>. Acesso em: fev. 2012.

A espécie é nativa da América do Sul e pode ser encontrada na Região Amazônica do Brasil, Equador, Peru, Guiana, Porto Rico, Havaí, mas também está bem representada em outros países como na Índia, Vietnã e Ilhas Mascarenhas (Reunião, Maurícias, Rodrigues) (GAUVIN-BIALECKI & MARODON, 2009). De acordo com levantamento do Governo das Filipinas (2006), a espécie é cultivada ocasionalmente para fins medicinais, mas não tem ocorrência espontânea. Foi introduzida a partir do México, e agora a sua distribuição é pantropical.

Nas Filipinas as folhas em infusão são tidas como sudoríficas e tônicas, sobretudo nas febres. Compara-se a Japana com a Camomila em seus efeitos (MARTIN, 2004), pois é estimulante e tônico em pequenas doses e laxativa em grandes quantidades. A infusão quente é emética e diaforética, e pode ser administrada com vantagens na fase inicial da malária e no estado que precede as alterações inflamatórias agudas. Segundo Koster (1935) as folhas maceradas são eficazes para curar febres, resfriados e diarreia, e auxiliam no tratamento de dores de cabeça. A planta é referida ainda por Barbuiya et al. (2009) como medicinal também no nordeste da Índia, em Barak Valley, onde a medicina natural é rica e diversificada.

A Japana é amplamente utilizada na medicina popular e tem sido extensivamente investigada por suas propriedades biológicas e farmacológicas. No entanto, até o momento, as informações sobre sua composição química e atividade biológica permanecem ainda escassas. Alguns componentes já foram isolados do vegetal e os dados foram representados no Quadro 1.

Quadro 1: Presença de compostos já isolados na Japana.

Componente	Tipo químico	Parte da planta	Origem
7-metóxi-cumarina	Cumarina	Planta	Não relatado
Aiapanina	Cumarina	Folhas	Índia
Aiapina	Cumarina	Planta	Índia
Aiapina	Cumarina	Folhas	Índia
Borneol	Não relatado	Planta	Não relatado
Acetato de borneol	Não relatado	Planta	Não relatado
1-8-Cineol	Monoterpeno	Folhas	Índia
Cumarina	Cumarina	Planta	Não relatado
Dafnetina	Cumarina	Folhas	Índia
Éter DimetilDafnetina	Cumarina	Folhas	Índia
Éter-7-Dimetil Dafnetina	Cumarina	Folhas	Índia
Dipenteno	Não relatado	Planta	Não relatado
Hernarina	Cumarina	Planta	Índia
Hidrangetina	Cumarina	Planta inteira	Índia
Linalol	Não relatado	Planta inteira	Não relatado
Metileno-Dioxi-6,7-Cumarina	Cumarina	Planta inteira	Não relatado
Alfa-Felandreno	Não relatado	Planta	Não relatado
Sabineno	Não relatado	Planta	Não relatado
Beta-Selineno	Sesquiterpenos	Óleo essencial da planta	Canadá
Estigmasterol	Esteróide	Folhas	Índia
Alfa-Terineol	Não relatado	Planta	Não relatado
Timoquinona	Monoterpeno	Partes aéreas da planta	Vietnam
Éter DimetilTimoidroquinona	Monoterpeno	Óleo essencial das	Índia

		flores	
Éster Metil Timoidroquinona	Monoterpeno	Planta inteira	Não relatado
Umbeliferona	Cumarina	Planta	Índia

Fonte: Taylor, 2006.

Estudos anteriores com a japana isolaram constituintes pertencentes às classes: cumarinas, esteróides, carotenóides, óleos essenciais e vitaminas, com presença relatada nos extratos altamente polares de folhas (BOSE e ROY, 1936; 1937; CHATURVEDI e MULCHANDANI, 1989; NATARAJAN e NATARAJAN, 1979; SPÄTH et al., 1937; TRANG et al., 1992, 1993a,b). De acordo com estes, os metabólitos secundários mais característicos da espécie são as cumarinas. Há um total de sete cumarinas relacionadas ao nome *Ayapana triplinervis* V.: (1) aiapanina (ou herniarina), (2) aiapina, (3) dafnetina, (4) dimetil éter dafnetina, (5) metil-7- éter dafnetina, (6) hidrangetina e (7) umbeliferona. Cumarinas são consideradas componentes da resposta de defesa geral das plantas e provou-se que várias cumarinas substituídas apresentam atividade antiinflamatória ou antimicrobiana e agem como inibidores de numerosos sistemas enzimáticos (MURRAY et al., 1982). Isto pode explicar porque Japana é usada como planta medicinal.

Dentre os principais componentes, destacam-se as cumarinas que são amplamente distribuídas nos vegetais, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. Estruturalmente, são lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas). Cerca de 1.300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais. Suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas dependem de seus padrões de substituição (EVANS, 1996).

Muitas cumarinas são conhecidamente hemorrágicas, podendo causar também hipersensibilidade à luz. Muitas sementes apresentam toxalbuminas, que causam diarreias violentas. Substâncias histaminóides ou alergênicas estão presentes em várias espécies da família da Japana, podendo causar edema de glote e morte por asfixia se ingeridas em excesso. Existe ainda um grande número de outras substâncias tóxicas presentes na espécie (LORENZI e MATOS, 2002).

Murray et al. (1982) relatam que as cumarinas são consideradas componentes da resposta de defesa geral das plantas e que dependendo das substituições, elas podem apresentar atividade antimicrobiana e antiinflamatória, agindo como inibidor de numerosos sistemas enzimáticos no homem. Estes estudos estão de acordo com o potencial antimicrobiano apresentado pelos extratos hidroalcoólicos obtidos da espécie. Diversos

autores como Natarajan e Natarajan (1979), Bose e Roy (1936) Chaturvedi e Mulchandani (1989) e Beckstrom-Sternberg et al. (1994) já isolaram cumarinas da espécie *Eupatorium ayapana* V., corroborando com os resultados obtidos.

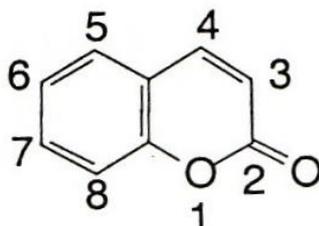


Figura 2: Estrutura básica das cumarinas. Fonte: Simões et al., 2001.

No Brasil, a japana é utilizada para variados fins, porém, seus usos não são validados por pesquisas científicas sobre algumas atividades biológicas quanto aos seus componentes isolados. No Quadro 2 foram descritos os usos etnomedicinais da Japana no Brasil.

Quadro 2: Informações etnomedicinais sobre a Japana no Brasil.

Parte utilizada do vegetal/Localização	Uso etnomedicinal documentado	Tipo de extrato/ Via
Folhas/Brasil	Tônico, estimulante, adstringente, antidiarréico, sudorífero, para tosse, garganta inflamada, febre, resfriados, dor de cabeça, náuseas, indigestão, diarreia, insônia, vômitos e úlceras gástricas.	Infusão/Oral
Folhas/Brasil	Sedativo, antipirético, acidentes ofídicos e úlceras.	Decocção/Oral
Folhas/Brasil	Adstringente, emoliente e cicatrizante.	Sumo das folhas/Externa
Folhas/Brasil	Adstringente, contra úlceras bucais, gengivite e picada de cobra.	Infusão/Externa

Fonte: Taylor, 2006.

Dentre as atividades biológicas, várias plantas possuem compostos com ação antimicrobiana e assim protegem o vegetal dos microrganismos, com isso é de grande importante enfatizar essa atividade.

## 2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A propriedade antimicrobiana das plantas pode ser explicada pela produção de compostos ativos gerados durante o metabolismo secundário. Atualmente os conhecimentos, às vezes empíricos, desta propriedade têm sido confirmados cientificamente, revelando assim o enorme potencial das plantas no controle de doenças infecciosas, enquanto verifica-se um aumento nos casos de microrganismos patogênicos resistentes aos antimicrobianos conhecidos. Extratos e óleos essenciais de plantas têm mostrado efeitos sobre desenvolvimento de microrganismos em inúmeras situações, o que sugere uso prático destes produtos (SILVA, 2010)

Uma planta pode conter muitos metabólitos secundários, mas apenas os compostos que estão em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica clássica. No entanto, analisar os compostos ativos é uma tarefa mais complexa e longa, pois geralmente os compostos minoritários estão entre os que apresentam melhores efeitos biológicos. Por isso é indispensável analisar a potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração. Desta forma, a partir desta avaliação podemos prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (Cechinel Filho e Yunes, 1998).

Muitos podem ser os fatores ambientais capazes de influenciar a quantidade e qualidade dos compostos secundários das plantas (Gobbo-Neto e Lopes, 2007), dentre estes os principais estão expostos na figura 3.

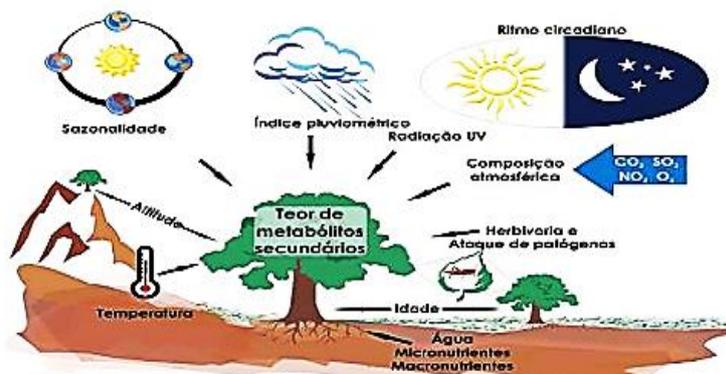


Figura 3 - Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas. Fonte: adaptado de Gobbo-Netto & Lopes, 2007.

Várias plantas possuem compostos com ação antimicrobiana e assim protegem o vegetal dos microrganismos (SILVA, 2010) As plantas têm uma capacidade quase ilimitada para sintetizar substâncias aromáticas, principalmente fenóis ou seus derivados (GEISSMAN, 1963). A maioria destes são metabólitos secundários, dos quais pelo menos 12.000 já foram isolados, um número estimado que corresponde a 10% do total de componentes (SCHULTES, 1978). Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa da planta contra predadores, assim como contra microrganismos, insetos e herbívoros (Tabela 1 e Figura 4). Por outro lado, alguns componentes como os terpenóides, são responsáveis propriedades odoríferas da planta, e outros, como quinonas e taninos são responsáveis pela pigmentação. Além disso, também há compostos responsáveis pelo sabor da planta (por exemplo, a capsaicina), e algumas ervas e especiarias são utilizadas como temperos na alimentação. Segundo Cowan (1999) compostos fitoquímicos antimicrobianos úteis podem ser divididos em categorias, expostos em resumo na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais classes de componentes antimicrobianos derivados de plantas.

<b>Classe</b>	<b>Subclasse</b>	<b>Exemplo</b>	<b>Mecanismo</b>
<b>Fenóis</b>	Fenóis simples	Catecol	Privação de substrato
		Epicatequina	Ruptura de membrana
	Fenóis ácidos	Acido cinâmico	?
	Quinonas	Hipericina	Ligação com adesinas; Complexos com parede celular e Inativação de enzimas.
	Flavonóides	Crisinas	Ligação a adesinas
	Flavonas		Complexos com parede celular; Inativação de enzimas.
	Taninos	Elagitaninos	Ligação a proteínas, Ligação a adesinas; Inibição de enzimas; Privação de substratos; Complexo com parede celular; Rompimento de membranas; Complexação com íons metálicos.
	Coumarinas	Warfarinas	Interação com DNA eucariótico (atividade antiviral)
<b>Terpenóides e óleos essenciais</b>		Capsaicina	Ruptura de membrana
<b>Alcalóides</b>		Piperina	Intercalação com parede celular e/ou DNA

Fonte: adaptado de Cowan (1999).

Nesse sentido, a Figura 4 apresentada as fórmulas estruturais de alguns compostos antimicrobianos que são mais frequentemente encontrados em plantas.

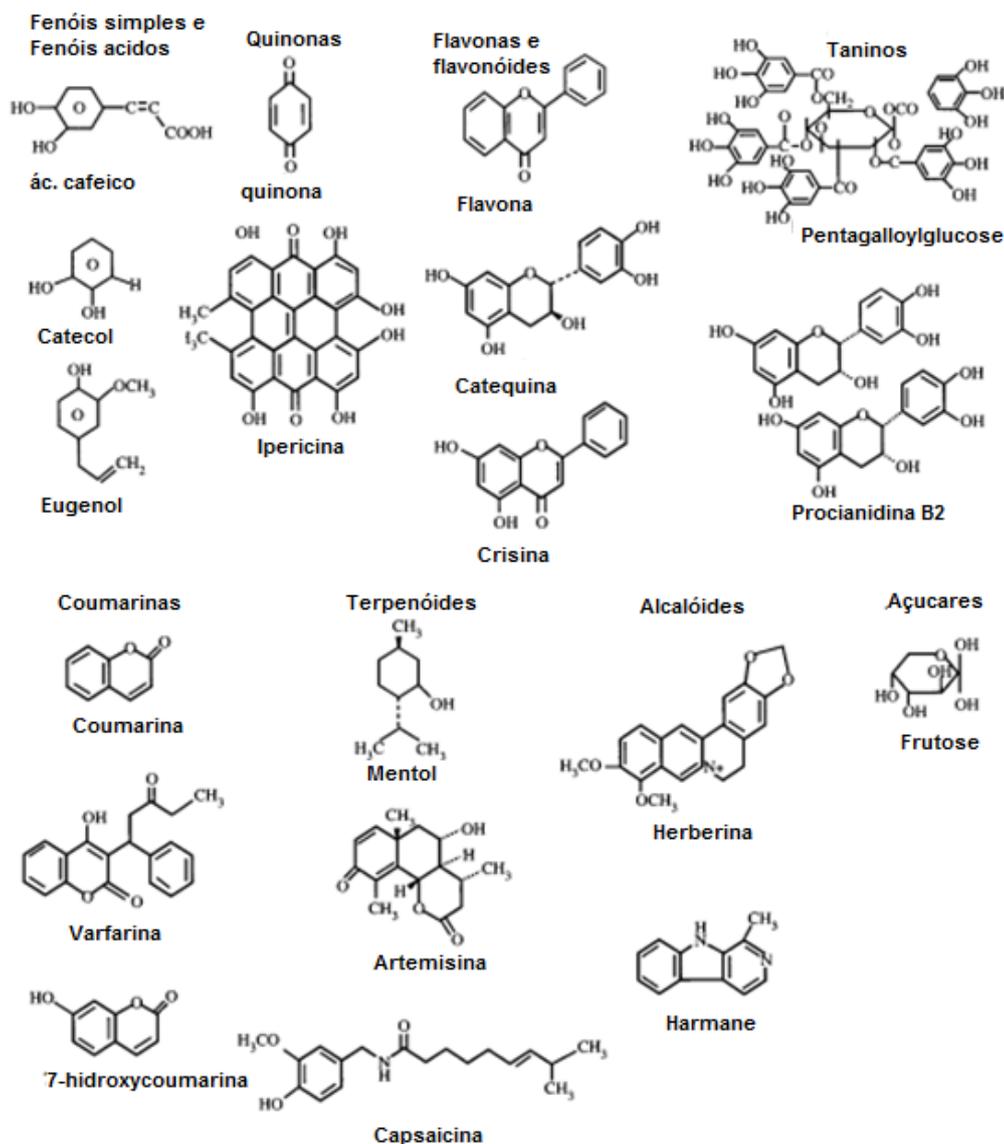


Figura 4 – Estruturas químicas de compostos antimicrobianos comumente encontrados em plantas. Fonte: adaptado de Cowan (1999).

Outros estudos, como os relatados por RAHMAN e JUNAID (2008) mostraram a ação antimicrobiana do extrato bruto da espécie *Ayapana triplinervis* frente a 11 bactérias patogênicas: *Shigella dysenteriae* AE 14396, *S. sonnei* CRL. (ICDDR, B), *Salmonella typhi* AE 14.612, *S. paratyphi* AE 14.613, *Bacillus subtilis* BTCC 17, *B. megaterium* BTCC 18, *B. cereus* BTCC 19, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* CRL (ICDDR'B), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Inaba et (Vibrio)* AE 14748; e 5 fungos fitopatogênicos, viz., *Alternaria alternata* (Fr.) Kedissler, *E Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Colletotrichum corchori* Ikata (Yoshida), *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc.,

*Macrophomina phaseolina* (Maubl) Ashby. *Botryodiplodia theobromae* Pat. Nesse estudo, todos os extratos avaliados (1000 µg / disco) apresentaram de moderada a boa atividade antibacteriana contra os agentes patogênicos acima descritos, sendo que a técnica utilizada foi a de difusão em disco e o antibiótico padrão foi a ampicilina 20 µg / disco (Tabela 2).

Tabela 2: CIMs do extrato de folhas cruas de *A. triplinerve* contra bactérias testadas.

BACTÉRIAS	CIM Extratos Brutos (µg/ml)			
	ÉTER DE PETRÓLEO	TETRACLOROETO DE CARBONO	CLOROFÓRMIO	ACETATO DE ETILA
<i>Bacillus subtilis</i>	750	500	250	250
<i>B. megaterium</i>	1000	500	500	750
<i>B. cereus</i>	750	250	250	250
<i>Staphylococcus aureus</i>	750	250	250	250
<i>E. coli</i>	1000	500	250	750
INABA ET ( <i>Vibrio</i> )	1000	500	125	250
<i>Shigella dysenteriae</i>	1000	750	500	750
<i>S. sonnei</i>	750	500	500	250
<i>Salmonella typhi</i>	1000	500	250	250
<i>S. paratyphi</i>	750	500	250	250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1250	750	500	750

Fonte: Adaptado de RAHMAN e JUNAID (2008).

Além disso, RAHMAN E JUNAID (2008) também demonstraram que os extratos brutos inibiram o crescimento micelial de todos os fungos testados na concentração de 100 µg/ml. Sendo que, os extratos de tetracloreto de carbono, clorofórmio e extrato de acetato de etila foram os que inibiram mais de 50% do crescimento micelial dos fungos, com exceção do *Botryodiplodia theobromae*, quando comparado ao antifúngico padrão, a nistatina (100 µg/ml).

Outros estudos antimicrobianos relacionados à espécie *Ayapana triplinervis* já foram realizados, e dentre estes, um que merece destaque foi o estudo de Gupta e colaboradores em 2002, que mostrou a ação dos extratos de éter de petróleo e metanólico dessa planta frente a 10 bactérias (*Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Micrococcus leuteus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Salmonella typhi*; *Shigella dysenteriae*; *Vibrio cholerae*; *Vibrio parahaemolyticus*) e 4 espécies de fungos (*Aspergillus niger*; *Aspergillus fla*; *Alternaria solani*; *Fusarium solani*) pela técnica de microdiluição em caldo. O extrato de éter de petróleo mostrou largo espectro de atividade contra todas as estirpes bacterianas na concentração testada 250 e 1000 µg/ml, exceto para *Shigella dysenteriae*, e também atividade antifúngica. Por outro lado, o extrato metanólico mostrou

uma menor atividade do que a de éter de petróleo nas concentrações testadas contra as espécies bacterianas e fúngicas testadas.

Em estudos realizados por pesquisadores nas Maurícias, em 1998, os extratos de folhas de Ayapana não evidenciaram qualquer atividade antibacteriana, mas mostraram uma fraca atividade antifúngica (JELAGER et al., 1998). Além disso, um extrato etanólico da planta inteira (colhido no Suriname) foi mostrado ser ativo contra *Bacillus subtilis* em 50 mg/ml, mas inativo contra espécies de leveduras, bactérias e fungos (VERPOORTER et al., 1987). Pesquisadores indianos também reportaram fraca atividade do óleo essencial das folhas contra várias cepas de fungos (CHAURASIA et al., 1978).

O óleo essencial das flores rendeu melhores resultados em testes antimicrobianos do que a própria planta. Em 1979, os pesquisadores relataram na Índia uma forte atividade do óleo essencial de flores de Japana in vitro contra 10 cepas de fungos (SHARMA et al., 1979). Em 1993, pesquisadores na Índia mostraram que o óleo essencial das flores de Ayapana possui ação antibacteriana contra estafilococos, bactérias da cólera e pneumonia, e *Shigella*, bem como helmintos (*Ascaris* e *Taenia*) por (GARG et al., 1993). Em outro estudo, o óleo essencial das flores injetado em camundongos apresentou ação depressora sobre o SNC, analgésica e sedativa, bem como ação antibacteriana in vitro (KOKATE et al., 1971). Além disso, diversas universidades estão apoiando a investigação sobre o uso da Japana como um aditivo para alimentos armazenados, com o intuito de manter afastadas as pragas comuns e insetos que se alimentam destes (FACKNATH e LALLJEE, 1999).

#### **2.4.1 Principais bactérias importantes na clínica associados ao mecanismo de resistência**

Na atualidade, a resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias, conhecendo-se detalhes dos seus mecanismos de aquisição e os mecanismos moleculares da manifestação desta característica (CUNHA, 1998; JACOBY et al., 1991). Trata-se de um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no germe durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético. A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível, que podem ocorrer por mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons (CUNHA, 1998; LACEY, 1973, 1984;

LEVY, 1982; McDONALD, 1966; NOVICK, 1980; SAUNDERS, 1984; SUASSUNA, 1983; TRABULSI, 1973; ZULIANNI e TRABULSI, 1972).

Embora existente, a resistência a drogas específicas nas bactérias causadoras de infecção humana foram pouco frequentes no início da era da antibioticoterapia. A importância do problema coincidiu com a introdução e a ampla utilização de inúmeros antimicrobianos na década de 1950, expandindo-se a partir de 1960, com a introdução dos novos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e agravando-se nas décadas de 1980 e 1990, com o surgimento de novas formas de resistência e a disseminação de microrganismos multirresistentes.

A importância das substâncias antimicrobianas no aumento do fenômeno da resistência reside no seu papel selecionador dos exemplares resistentes, através da pressão seletiva resultante de seu emprego clínico (humano e veterinário), industrial (conservação de alimentos), comercial (engorda de animais) e experimental (BUU-HOI, 1986; FEINMAN, 1998; SAUNDERS, 1984; SUASSUNA, 1971; WITTE, 1998; W.H.O., 1983). Atualmente, a resistência constitui fator de grande preocupação aos clínicos quanto às drogas já utilizadas em terapias correntes no âmbito de saúde mundial e é principal motivador de novas pesquisas e desenvolvimentos de fármacos contra estes patógenos resistentes.

#### 2.4.1.1 *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são bactérias esféricas, piogênicas por excelência. Gram-positivas em forma de cachos de uva (do grego staphile = cacho de uva), cujo tamanho varia entre 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A parede celular estafilocócica é constituída de 50% de peptidoglicano em peso, que consiste em subunidades polissacarídicas alternantes de N-acetilglicosamina e ligações 1,4- $\beta$  de ácido N-acetilmurâmico. Além disso, estas estruturas são interligadas por cadeias de tetrapeptídeos vinculadas ao ácido N-acetilmurâmico por uma ponte pentaglicídica específica para *S. aureus*. O peptidoglicano também pode ter atividade similar a endotoxinas, estimulando a liberação de citocinas por macrófagos, ativação do sistema complemento e agregação plaquetária (LOWY, 1998). Ácidos Teicóicos covalentemente ligados à camada do peptidoglicano, são os constituintes majoritários da parede, assim como o ácido lipoteicóico que é um polímero de glicerol fosfato ligado a um terminal glicolípido ancorado a membrana citoplasmática (LOWY, 1998). Com isso, diferenças estruturais na parede celular das diferentes cepas de *Staphylococcus* contribuem para as variações na capacidade deste agente em induzir a coagulação intravascular disseminada (KESSLER et al., 1991).

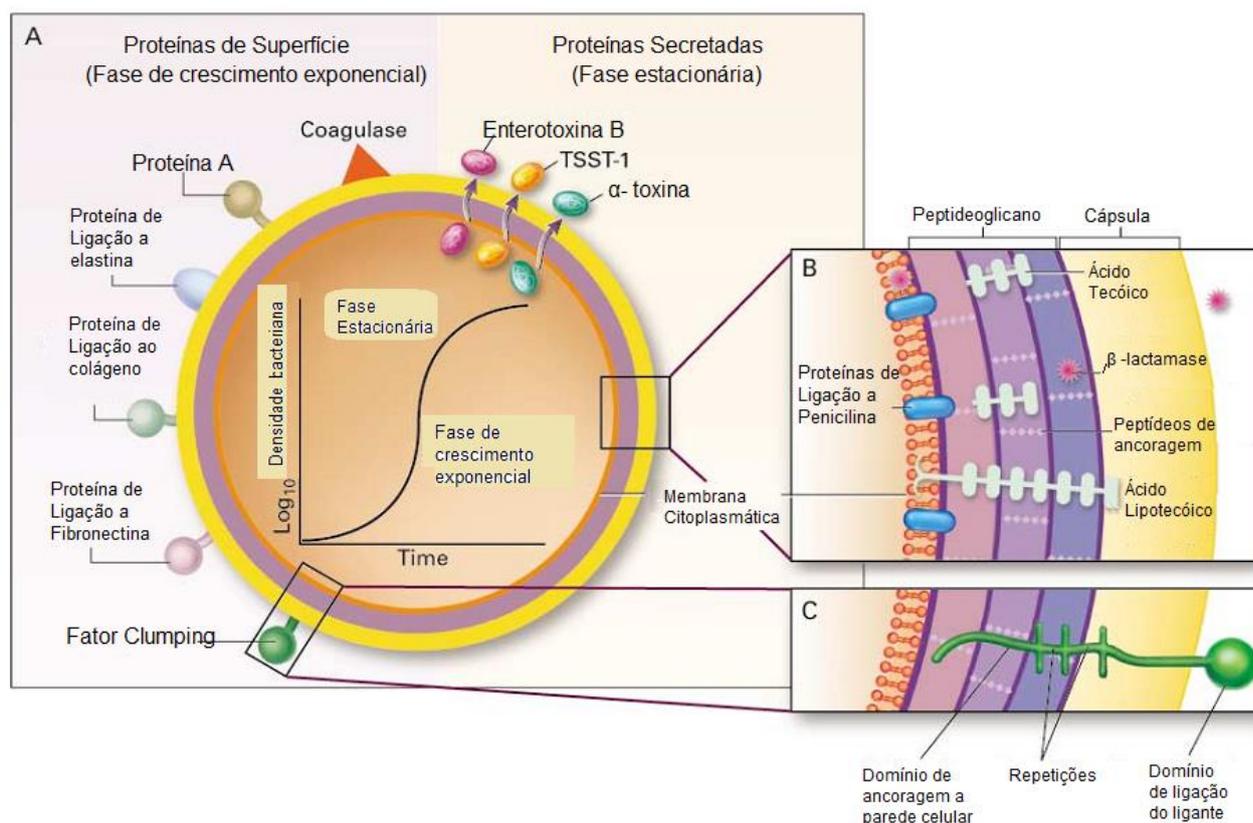


Figura 5: Componentes estruturais de *S. aureus*. Fonte: Adaptado de Lowy, 1998. O painel A mostra a superfície e as proteínas secretoras. A síntese de muitas destas proteínas depende da fase de crescimento, como mostra o gráfico, e é controlada por genes regulatórios. O painel B e C mostra segmento do envelope celular. TSST-1 simboliza a toxina do choque tóxico.

O gênero *Staphylococcus* é composto por cerca de 30 espécies, sendo algumas frequentemente associadas a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais. As principais espécies de estafilococos encontrados em seres humanos são os *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*. O *S. epidermidis* é encontrado primariamente como residente da pele, tendo um baixo potencial patogênico, assim como o *S. saprophyticus*, que faz parte da microbiota normal da região periuretral do homem e da mulher e da pele. Ao contrário destes, o *S. aureus* é um patógeno em potencial e pode ser encontrado na região da nasofaringe e também nas fossas nasais (MURRAY, 2004; TRABULSI, 2004; TORTORA, 2005; BROCK et al., 2006).

O *S. aureus* foi descoberto a partir de observações clínicas e estudos laboratoriais publicados em 1880 e 1882, em Ogston, descrito como doença estafilocócica, buscando compreender o seu papel na seps e formação de abscessos (OGSTON, 1882a e 1884b). Mais de 100 anos mais tarde, *Staphylococcus aureus* continua a ser um patógeno perigoso em seres humanos. As frequências de ambas as doenças adquiridas na comunidade e no hospital como infecções estafilocócicas têm aumentado de forma constante, com pouca mudança na

mortalidade geral. O tratamento destas infecções se tornou mais difícil devido ao surgimento de cepas multirresistentes. (LOWY, 1998).

As manifestações clínicas ocasionadas por estes agentes se revelam com maior ou menor gravidade de acordo com a localização primária ou secundária da infecção, no entanto o problema da estafilococia tem se tornado sério nos últimos anos. Em pacientes hospitalizados, recém-nascidos e crianças abaixo de um ano de idade, as manifestações clínicas tendem a ser de maior importância. As infecções estafilocócicas causadas pelo *S. aureus* estão como as de maior importância na clínica, tais como: infecções em pele como impetigo, contaminação de feridas cirúrgicas ou em queimados, que podem levar à sepse e complicações graves como osteomielite e outros focos metastáticos no coração, pulmão, sistema nervoso central, rins. Além desse comportamento, certas cepas secretam enterotoxinas que agem à distância, causando intoxicação alimentar (MURRAY, 2004; TRABULSI, 2005; BROCK et al., 2006).

#### 2.4.1.2 *Enterococcus faecalis*

##### *Breve história da nomenclatura*

O nome "enterocoque" foi usado pela primeira vez por Thiercelin em um artigo da França publicado em 1899 (THIERCELIN, 1899); o nome era proposto para enfatizar a origem intestinal deste novo diplococo gram-positivo. No mesmo ano, MacCallum e Hastings relataram um caso de endocardite provocada por um microrganismo que denominaram de *Micrococcus zymogenes*, sendo que artigos mais recentes já sugeriam que esse organismo era realmente um *Enterococcus* hemolítico (SHERMAN, 1937). O nome *Streptococcus faecalis* (faecalis, relativo à fezes) foi proposto em 1906 por Andrewes e Horder, que isolou este organismo a partir de um paciente com endocardite e considerou que esta bactéria era característica do intestino humano, a denominando então de "Streptococcus faecalis" (ANDREWES e HORDER, 1906). Durante a próxima década, vários autores estudaram e escreveram sobre isolados aos quais também se referiam como *S. faecalis*, mas em 1919, Orla-Jensen usou a uma terminologia diferente enquanto descrevia cepas de *S. glycerinaceus* e *S. faecium* (ORLA-JENSEN, 1919).

Por uma série de anos, esses nomes foram largamente ignorados e os organismos foram considerados como sendo o mesmo *S. faecalis* (SHERMAN, 1937). As diferenças de

nomenclatura e opinião sobre o assunto existiam, não só para *S. faecalis*, mas também para o nome comum, *Enterococcus*. Com isso, em uma revisão publicada em 1937 por Sherman (SHERMAN, 1937), o mesmo enfatizou que o termo 'enterococos' foi usado com significado diferente que vai desde a definição ampla de quaisquer estreptococos fecal para uma definição restrita de organismos que pareciam ser idênticos ao *S. faecalis* (MURRAY, 1990).

Desta forma, Sherman propôs um esquema de classificação que separava os estreptococos em quatro divisões: piogênicos, viridans, láctico e *Enterococcus*. O último termo foi utilizado para os organismos que (na sua maior parte) cresciam a 10° e 45°C, em NaCl 6,5%, e em pH 9,6 e que sobreviveram na situação de 60°C durante 30 min, a capacidade para quebrar esculina também foi observada (SHERMAN, 1937). Muitos destas características tornaram-se amplamente usadas para distinguir entre enterococos e estreptococos, como *S. bovis*, além de auxiliar a identificação dos enterococos (MURRAY, 1990).

O esquema de classificação de Sherman também se correlacionou com a classificação sorológica originada por Lancefield no início dos anos 30. Nesse sistema, o enterococos demonstraram reações positivas com o grupo D de anti-soros, enquanto que o estreptococos piogênico reagiram com o grupo A, B, C, E, F ou G e os estreptococos viridans foram não agrupáveis, embora o *S. bovis* tenha demonstrado mais tarde reação positiva para o anti-soro do grupo D. Dentro dos enterococos, Sherman descreveu o que foi reconhecido, naquela época, como espécies enterocócicas, *S. faecalis*, *S. zviogenes*, *S. liquefjais*, e *S. duirans*. No entanto, por causa das semelhanças entre as espécies, o pesquisador sugeriu que a terminologia mais apropriada seria a seguinte: *S. faeccalis* (hemólise negativa, proteólise negativa), *S. faeccalis* var. *liquefaciens* (Hemólise negativo, proteólise positiva), *S. faecalis* var. *hemoliticus* (hemólise positiva, proteólise, negativa), *S. faecalis* var. *zymogenes* (hemólise positiva, proteólise positiva), e *S. durans*. Nesse sentido, trabalhos mais recentes mostram que a hemólise é mediada por plasmídeo, que pode ser transferido para cepas não hemolíticas, confirmando a inadequação do uso desta característica para distinguir as espécies (IKE et al.,1987).

Alguns enterococos móveis também foram observadas na década de 50 por produzirem um pigmento amarelo, e em 1968 foi sugerido a esses microrganismos o nome *S. faecium* var. *casseliflavus* (GRAUDAL, 1957; MUNDT e GRAHAM, 1968). Além disso, em 1955, a partir de queijo Gouda, foi isolado um *Enterococcus* referido como "*malodoratus*" por causa do seu mau cheiro (COLLINS et al.,1984). Por outro lado, outras cepas de enterococos foram testadas quanto a sua reação com o anti-soros D e Q de Lancefield. No

qual, observou-se que estes organismos se assemelhavam aos enterococos de galinhas, que foram denominados de *Streptococcus "aviumn"* em 1967 (NOWLAN e DEIBEL, 1967), nome que foi reconhecido em 1974 no Manual Bergey (DEIBEL e SEELEY, 1974).

Na última década, o uso de ácido nucleico tem esclarecido de maneira indubitável o parentesco entre estas espécies e então, expandiu-se o esquema de classificação para os enterococos. Farrow et al. em 1983 apresentou estudo bioquímico e de DNA, onde dados de hibridização indicaram que *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. casseliflavus*, *S. aviumn*, *S. durans*, e *S. faecalis* var. *malodoratus* eram todos distintos; e que o *S. faecium* var. *niobilis* era a mesma espécie que *S. casseliflavus*. Além disso, determinou que o *S. faecalis* e a sua ex-subespécie *liquefaciens* e *zymogenes* eram de fato uma única espécie; e que alguns enterococos do grupo D de galinhas, designada *S. gallinarumn*, eram distintos do *S. aviumn* (BRIDGE e SNEATH, 1982; FARROW et al., 1983).

#### *Características físicas dos Enterococcus*

Os *Enterococcus* são células esféricas ou ovóides, com dimensões variando de 0,6 a 2,5 µm, ocorrendo geralmente em pares ou cadeias curtas em meio líquido. Algumas vezes podem se apresentar em formas cocobacilos, quando o crescimento ocorre em ágar, ou formas ovaladas e em cadeias quando o crescimento se dá em caldo tioglicolato. Esses organismos são gram-positivos e podem ser móveis, apresentando poucos flagelos e ausência de cápsula, anaeróbios facultativos, capazes de fermentar diversos carboidratos com produção principalmente de L(+)-ácido láctico. Essa fermentação ocorre sem produção de gás, com pH variando entre 4,2 e 4,6, e possui necessidades nutricionais complexas (LEME & FERREIRA, 2001).

Tal como os estreptococos, estes microrganismos não expressam enzimas como citocromo oxidase e catalase, embora algumas cepas produzam pseudocatalases (FACKLAM e CAREY, 1985; SCHLEIFER e KILPPER-BALZ, 1984). Crescem geralmente entre 10°C e 45°C, cuja melhor temperatura de crescimento é 37°C em pH 9,6, também podem crescer em solução de NaCl 6,5% e na presença de sais biliares a 40% (KONEMAN et al., 2001).

A habilidade de formação de biofilme pelo gênero *Enterococcus* permite a colonização de superfícies inertes e biológicas, protegendo-o contra agentes antimicrobianos e ação de fagócitos, assim como pode mediar adesão e invasão de células do hospedeiro (BALDASSARRI et al., 2005). Além da formação de biofilme, os principais fatores de virulência são a produção de substância de agregação, adesinas de superfície, ácido

lipopolitecólico, produção extracelular de superóxido, enzima lítica gelatinase e hialuronidase (KAYAOGLU e ORSTAVIK, 2004).

Esses microrganismos são resistentes a diversos antibióticos, como a tetraciclina e a gentamicina (SEDGLEY et al., 2005). No entanto, algumas cepas de *Enterococcus ssp.* são susceptíveis a ampicilina, benzilpenicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, rifampicina, estreptomicina e vancomicina (KAYAOGLU e ORSTAVIK, 2004; SEDGLEY et al., 2005).

O gênero *Enterococcus* inclui diversas espécies comensais que são residentes no trato gastrointestinal, vagina e cavidade bucal. Por outro lado, algumas espécies, como *E. faecalis* e *E. faecium* podem originar doenças, incluindo infecções urinárias e endocardite (KAYAOGLU e ORSTAVIK, 2004). Nesse sentido, mais de 90% das infecções humanas enterocócicas são causadas por *E. faecalis*, sendo as demais por *E. faecium*. Doenças relacionadas a outras espécies desse gênero são raras (KAYAOGLU e ORSTAVIK, 2004; JETT et al., 1994).

As infecções mais associadas com os enterococos são as infecções do trato urinário, intra-abdominais, pélvicas, bacteremia, endocardite, cutâneas, neonatais, do sistema nervoso central e do trato respiratório (LEME e FERREIRA, 2001; PALAVECINO et al., 2001; GOULD et al., 2004). A infecção do trato urinário é a infecção mais frequente no homem, sendo que a maioria dessas infecções é de origem hospitalar e está associada, principalmente a instrumentalização e cateterização prévia, anormalidades do trato urinário, uso extensivo de antimicrobianos e à debilidade do paciente. Os enterococos raramente causam infecções não complicadas do trato urinário em mulheres não hospitalizadas (GOULD et al., 2004; SANDRI, 2004). As infecções intra-abdominais são consideradas como o segundo tipo mais frequente de infecção relacionado ao enterococos. Além dessas infecções, também já foram descritos casos de prostatite e abscesso periférico atribuídos a enterococos (MOELLERING, 1992; SANDRI, 2004).

Bacteremia é o terceiro tipo de infecção mais comumente atribuída ao enterococos (HÖRNER et al., 2005; DESHPANDE et al., 2007). Segundo MOELLERING (1992) a relação de bacteremia com endocardite é variada, ou seja, se a origem da bacteremia for hospitalar, apenas em 1% dos casos há evolução para endocardite; se a origem for comunitária, no entanto, em aproximadamente um terço dos casos há evolução para endocardite. Apesar da bacteremia estar associada ao choque séptico ou à coagulação intravascular disseminada, tais complicações são raras e quando ocorrem, geralmente estão

relacionadas a bacilos Gram-negativos que acompanham os enterococos em bacteremias polimicrobianas (MURRAY, 1990).

Os enterococos são responsáveis por 5 a 15% dos casos de endocardite infecciosa, sendo o *E. faecalis* a espécie mais frequentemente relacionada a essa doença. A endocardite é comum entre idosos do sexo masculino e segue, em geral, um curso subagudo, acometendo mais frequentemente paciente com valvulopatias ou com válvulas prostéticas, embora também possa determinar infecção em válvulas previamente normais (LEME e FERREIRA, 2001; SHEPARD e GILMORE, 2002).

Infecções menos frequentes causadas pelos enterococos incluem infecções neonatais, do sistema nervoso central e do trato respiratório, normalmente envolvendo pacientes com múltiplas invasões ou muito debilitados (LEME e FERREIRA, 2001; BENDER, 2008; BENDER et al., 2010).

#### 2.4.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

As *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos, aeróbios e móveis que pertence à família Pseudomonadaceae, com tamanho que varia entre 0,5 a 0,8 µm de diâmetro por 1,5-3,0 µm de comprimento. Sua motilidade é realizada por um único flagelo polar, sendo que suas espécies são distinguidas através de testes bioquímicos e hibridação de DNA. Essas bactérias possuem necessidades nutricionais mínimas, sobrevivendo em uma grande variedade de ambientes, tais como o solo e na água, e podem também fazer parte da microbiota normal do trato intestinal e pele de 3 a 5 % da população (ALBRECHT et al., 1996). Mais da metade de todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* produzem o pigmento piocianina azul-esverdeada, que muitas vezes tem um odor característico doce em cultura (LESSNAU et al., 2012).

Estes patógenos são comuns na natureza, habitando o solo, água, plantas e animais, incluindo humanos (LESSNAU et al., 2012). A espécie *P. aeruginosa* é uma bactéria invasiva, toxigênica e o principal patógeno humano do grupo de bacilos não fermentadores de glicose, podendo causar infecções oportunistas especialmente em pacientes imunocomprometidos, como vítimas de queimaduras, pacientes com câncer ou fibrose cística. Essa bactéria cresce facilmente mesmo em condições desfavoráveis aos outros microrganismos e possuem resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos mais comuns, desta forma está associada frequentemente a infecções nosocomiais (ALBRECHT et al., 1996). Adicionando a sua patogenicidade, esta bactéria tem o mínimo de requisitos

nutricionais e pode tolerar uma ampla variedade de condições físicas (LESSNAU et al., 2012).

A *P. aeruginosa* como um patógeno oportunista, raramente causa doença em pessoas saudáveis. Na maioria dos casos de infecção, há perda da integridade da barreira física ou deficiência imunológica (por exemplo, imunossupressão, neutropenia) nos indivíduos acometidos pela bactéria (LESSNAU et al., 2012). Esta espécie pode causar infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade (PELLEGRINO et al., 2002; SAFDAR et al., 2004) e atualmente se posiciona entre as principais bactérias causadoras desse tipo de infecção, perdendo apenas para o *Staphylococcus* coagulase negativo e o *S. aureus* (SADER et al., 2001). Relatos de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos antimicrobianos foram publicadas no Brasil (ANDRADE et al., 2003; KIFFER et al., 2005) e em outros países (VAN ELDERE, 2003; RAJA e SINGH, 2007), destacando-se a resistência a antimicrobianos de amplo espectro como os carbapenêmicos e as cefalosporinas anti-pseudomonas (NICOLETTI et al., 2006; LANDMAN et al., 2007; LI et al., 2000).

A patogênese das infecções por *Pseudomonas* é complexa e multifatorial, visto que as espécies de *Pseudomonas* são invasivas e toxigênicas. De acordo com Pollack (2000), a patogênese envolve 3 fases: (1) fixação bacteriana e colonização, (2) infecção local, e (3) disseminação na corrente sanguínea e doença sistêmica. A colonização e aderência estão associadas a fatores de virulência das cepas, tais como a produção de proteases extracelulares que auxiliam a adesão e invasão bacteriana. Além disso, estes fatores podem levar a infecções no trato respiratório em pacientes com fibrose cística e/ou com complicações na ventilação mecânica (LESSNAU et al., 2012).

Como dito anteriormente, a *P. aeruginosa* é uma bactéria ubiqüitária e faz parte da microbiota humana, por isso raramente é causa de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis. No entanto, em ambientes hospitalares, esta bactéria tornou-se um dos mais importantes agentes infecciosos, principalmente em pacientes predispostos com quebra de barreiras físicas e imunossupressão. Além disso, o número de fatores de virulência é significativamente maior em cepas oriundas de isolados clínicos quando comparados às cepas ambientais (TADEU et al., 2000). Nesse sentido, quase todos os equipamentos e materiais hospitalares, principalmente com componentes líquidos, podem servir de reservatório para a bactéria, incluindo equipamentos de ventilação assistida, fluídos de administração intravenosa e desinfetantes (SWADDIWUDHIPONG et al., 1995).

No Brasil, dados do programa SENTRY mostraram que a *P. aeruginosa* foi o patógeno mais frequentemente isolado em pacientes com pneumonia hospitalar, a segunda

maior causa de infecção urinária e ferida cirúrgica e o sétimo patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea, nos hospitais avaliados pelo programa (SADER et al., 1999). Além disso, também foi o segundo agente mais frequente em indivíduos queimados (SANTUCCI et al., 2003). Desta forma, infecções causadas por *P. aeruginosa*, em pacientes imunocompetentes, são tratáveis e potencialmente curáveis. No entanto, infecções agudas fulminantes, como pneumonia bacteriana, sepse, infecções em feridas, queimaduras e meningite estão associadas com taxas de mortalidade extremamente elevadas (LESSNAU et al., 2012).

#### 2.4.1.4 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* foi inicialmente chamada de *Bacterium (Bacillus) coli commune* quando descoberta, tendo a sua denominação modificada para *Bacillus coli* por Castellani e Chalmers em 1919. Essa bactéria pertence à família Enterobacteriaceae, que é composta por microrganismos que podem crescer aerobicamente ou anaerobicamente e utilizam carbono simples e nitrogênio no seu metabolismo (EWING, 1986). Dessas fontes, fermentam principalmente a glicose, resultando na formação de ácido e gás (NEIDHARDT, 1987; ARTENCIO, 2007). As bactérias desta espécie são bastonetes Gram-negativos curtos, que medem de 1,1 a 1,5 µm de diâmetro por 2,0- 6,0 µm de comprimento e podem ser encontrados isolados ou aos pares e não formam esporos. Além disso, a *E. coli* apresenta motilidade devido à presença de flagelos peritríqueos (ORSKOV e ORSKOV, 1984).

Em placas de ágar incubadas por 24 horas a 37°C, as colônias de *E. coli* têm formato baixo, convexo, liso e incolor. No Ágar MacConkey, as colônias se apresentam cercadas por um precipitado de coloração rosa claro. No ágar EMB (Eosine-Methylene Blue) possuem coloração verde metálica escura. Já no Ágar Tergitol, as colônias desenvolvem coloração amarela, com diâmetro de aproximadamente 1-3 mm, de estrutura granular em toda a sua margem. Algumas colônias podem ser rugosas e maiores que o usual apresentando irregularidade em seus bordos. Em ágar sangue é frequente a ocorrência de hemólise por *E. coli* patogênica de mamíferos, sendo que em amostras isoladas de aves, a hemólise não é comum, outra característica é a rápida turbidez em caldos nutrientes (BARNES, et al. 2003).

A *Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa predominante do cólon humano. No organismo infantil, geralmente coloniza o trato gastrointestinal dentro de algumas horas de vida, e, posteriormente após adaptação, a *E. coli* atua como comensal no hospedeiro (DRASAR e HILL, 1974). Normalmente, essa bactéria permanece inofensiva no

lúmen intestinal, no entanto, em hospedeiros imunossuprimidos ou debilitados, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, as cepas normais de *E. coli* podem ser tornar patogênicas e assim causar infecção. Além disso, alguns grupos de *E. coli* expressam vários fatores de virulência, que podem causar um amplo espectro de doenças em humanos (NATARO e KAPER,1998).

Infecções causadas por *E. coli* patogênica pode estar limitada às superfícies de mucosas ou podem disseminar em todo o corpo. Três síndromes clínicas gerais podem resultar de infecções com cepas patogênicas de *E. coli*: (i) infecção do trato urinário, (ii) sepse/meningite, e (iii) diarreia/doença diarreica (NATARO e KAPER,1998). A *E. coli* também é a principal causa de infecções do trato urinário, incluindo pielonefrite e prostatite (ALBRECHT et al., 1996).

Segundo Albrecht (1996), os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* (chamados coletivamente de coliformes) e *Proteus*, são responsáveis por uma grande variedade de infecções. Sendo que destas, a *E. coli* é um patógeno entérico mais comumente isolado em laboratórios clínicos, principalmente nos países em desenvolvimento, como no Brasil.

Nesse sentido, os principais grupos de *E. coli* responsável pela doença entérica incluem os sorotipos clássicos enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), entero-hemorrágica (EHEC), e enteroagregativa (CEEA) (ALBRECHT et al., 1996). *E. coli* tem diversos mecanismos para a produção de patogênese em humanos, que incluem diferentes toxinas e fatores de colonização. Espécies de coliformes raramente causam doença extra-intestinal, a menos que as defesas do hospedeiro estejam comprometidas (ALBRECHT et al., 1996). De forma geral, os coliformes são bacilos Gram-negativos, flagelados. Algumas cepas produzem cápsulas. A virulência depende muitas vezes da presença de pili penhora (que podem ser caracterizadas por reações de hemaglutinação) e pili sexuais.

#### 2.4.1.5 *Proteus mirabilis*

O nome *Proteus* foi usado pela primeira vez por Hauser em 1885 para descrever uma bactéria isolada da carne putrefata. *Proteus mirabilis*, um gram-negativo, dimórfico, membro móvel da família Enterobacteriaceae, tem fascinado os cientistas por mais de 125 anos devido à sua capacidade de se diferenciar de hastes curtas em células alongadas multinucleadas que expressam milhares de flagelos (HOENIGER, 1965).

*Proteus mirabilis* são bacilos que se desenvolvem no solo, na água e no trato intestinal de mamíferos. Eles são capazes de colonizar forma coordenada superfícies sólidas. Estas bactérias são agentes causadores de uma variedade de infecções das vias respiratórias oportunistas incluindo nosocomiais, de olhos, ouvidos, nariz, pele, queimaduras, garganta e feridas (RÓZALSKI et al., 1997; JIM MANOS & BELAS, 2006). São mais comumente associados a infecções do trato urinário (ITU) em indivíduos com ou anormalidades funcionais e estruturais, e especialmente em infecções ascendentes de pacientes submetidos à cateterização urinária (WARREN et al., 1987; WARREN et al., 1982).

Esses organismos são capazes de colonizar e causar doenças devido ao seu arsenal de fatores de virulência como fímbrias, motilidade flagelar, fatores de variação antigênica, cápsulas, IgA-proteases, fatores prejudiciais aos hospedeiros (enzimas de degradação, tais como proteases, ureases, hemolisinas), formação de cristais de hidroxapatita, capacidade de formação de biofilmes, dentre outros.

#### 2.4.1.6 *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae*, também conhecida como bacilo de Friedländer, é uma das principais representantes deste grupo de agentes. Pertence à família Enterobacteriaceae. Dentre as espécies, destaca-se a *Klebsiella pneumoniae*, além disso, pode-se citar as seguintes: *Klebsiella oxytoca*; *Klebsiella ozaenae*; *Klebsiella rhinoscleromatis*; *Klebsiella ornithinolytica*; *Klebsiella planticola* e *Klebsiella terrigena*.

Essas bactérias são anaeróbias facultativas ou aeróbias, fermentam um grande número de carboidratos, possuem estrutura antigênica complexa e produzem uma variedade de toxinas e de outros fatores de virulência (FARMER e KELLY, 1991). Sendo bactérias entéricas, estabelecem-se no trato intestinal normal alguns dias após o nascimento e, a partir daí, constituem uma parte importante da flora microbiana aeróbia (anaeróbia facultativa normal). A *Klebsiella pneumoniae* também é encontrada no trato respiratório, em aproximadamente 5% dos indivíduos normais (ANA et. al., 1996). Além disso, a *Klebsiella pneumoniae* também representa importante problema na infecção hospitalar, principalmente em pacientes debilitados. É comumente transmitida pela equipe de saúde, pelos instrumentos ou pela medicação parenteral. Seu controle depende da lavagem de mãos, de rigorosa assepsia, de esterilização do equipamento, de desinfecção, de restrição do tratamento endovenoso e de precauções para se manter o trato urinário estéril. No entanto, as medidas de controle não são

possíveis no tocante à flora endógena normal, podendo a partir daí ocorrer a infecção sistêmica.

Esta bactéria é responsável por uma pequena fração (cerca de 3%) das pneumonias bacterianas, sendo um dos poucos bacilos Gram-negativos que causam pneumonia lobar (Johnson et al., 1993). Pode provocar extensa consolidação necrotizante hemorrágica dos pulmões e formação de cavidades. Causa pneumonia em pacientes debilitados ou imunossuprimidos, sendo os alcoólatras particularmente suscetíveis à infecção.

Estudo recente publicado pelo SENTRY Antimicrobial Surveillance Program mostrou que a *E. coli* e o gênero *Klebsiella* são os principais agentes etiológicos em infecções de corrente circulatória, infecções de pele e tecidos moles (Gales et al., 2012). O aumento da resistência entre os membros da família Enterobacteriaceae tem culminado com o aparecimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes, para as quais as opções terapêuticas são muito limitadas (Kallen et al., 2010; Patel et al., 2009). Embora os gêneros *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. constituam a principal ameaça, a presença de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), AmpC  $\beta$ -lactamases e carbapenemases também tem sido bastante freqüente em outras espécies como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp., entre outras (ANDRADE et al., 2011; JONES et al., 2009). A resistência aos carbapenêmicos já é considerada um problema de saúde pública em diversos países e a produção da enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) tem sido descrita como o principal mecanismo de resistência a esta classe de antibióticos na família Enterobacteriaceae (CHEN et al., 2012; GIAKKOUPHI et al., 2011).

## 2.5 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS A PARTIR DE PLANTAS

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é complexo, longo e de alto custo, tendo suas raízes profundamente ligadas às inovações científicas e tecnológicas (GUIDO et al., 2008). Os avanços expressivos da química e biologia e a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida da população mundial.

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos é dividido em duas grandes fases: (I) descoberta (também conhecida como pré-clínica ou pesquisa básica) e (II) desenvolvimento (ou clínica) (LOMBARDINO E LOWE, 2004). Nos estágios iniciais da fase de descoberta, as pesquisas se concentram geralmente na identificação e otimização de

moléculas capazes de representar novas entidades químicas com potencial de desenvolvimento clínico. A validação do alvo molecular selecionado é fundamental por uma série de razões que envolvem desde o estabelecimento de sua relevância no processo fisiopatológico em estudo até a caracterização do impacto de sua modulação seletiva no tratamento ou na cura de doenças ou disfunções em humanos.

O presente trabalho se propõe a avaliar as propriedades dos constituintes químicos isolados das folhas do vegetal, obtidos com diferentes extratos de polaridades crescentes de *Ayapana triplinervis* V. quanto as suas ações contra cepas de bactérias gram-positivas e principalmente gram- negativas. Com isso, este estudo faz parte do processo inicial de desenvolvimento de um novo fármaco, visando combater estes patógenos através da utilização da terapia medicamentosa derivada de produtos naturais.

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos e frações de folhas de *Ayapana triplinervis* V. sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos de folhas de *Ayapana triplinervis* V. a partir dos seguintes solventes: etanol (extrato hidroalcoólico), metanol, acetato de etila e hexano;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos frente às cepas ATCC de *S. aureus*; *E. faecalis*; *P. aeruginosa* e *E. coli* com determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Obter frações a partir do extrato metanólico de *Ayapana triplinervis*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana das frações frente a bactérias gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*) com determinação de CIM E CBM.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

---

### **4.1 TRATAMENTO PRELIMINAR DO MATERIAL VEGETAL**

#### **4.1.1 Coleta do material botânico**

A coleta do material vegetal foi realizada por especialista local (mateiro), no mês de março de 2011, no município de Acará, estado do Pará. A região se encontra a 01°32.684' de latitude e a 048°23.984' de longitude, coordenadas geográficas obtidas com a utilização de um equipamento do tipo GPS (*Global Positionig System*). A identificação botânica foi realizada por especialista do Museu Emilio Goeldi e uma exsicata foi depositada no herbário da instituição com o número MG 123913.

#### **4.1.2 Limpeza, secagem e preparo do material vegetal**

Após a coleta, o material foi separado em: folhas, talos, e raiz, de onde se aproveitou para esta pesquisa somente as folhas. Posteriormente, seguiu para a lavagem superficial com água, para a retirada de impurezas e em seguida, com álcool a 10%, para a retirada de microorganismos. Após a lavagem, o material foi seco à temperatura ambiente por 24 horas e após este período, seguiu para estufa de circulação de ar a 45° C por 5 dias. O material seco foi pulverizado em moinho de martelos e facas na Central de Extração da Faculdade de Química da Universidade Federal do Pará.

#### **4.1.3 Obtenção dos extratos hexânico, de acetato de etila, metanólico e hidroalcoólico**

Para a execução desta etapa, deve-se levar em consideração uma série de fatores que interferem nesta operação, tais como as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e a metodologia (SIMÕES et al., 2001).

O grau de divisão do material vegetal irá influenciar diretamente na eficiência da extração, já que o poder de penetração dos solventes depende, entre outros fatores, da consistência dos tecidos que formam o material a extrair. O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível, pois é graças à seletividade que se pode extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade. Já quanto à escolha do método extrativo, deve-se avaliar a

eficiência e a estabilidade das substâncias extraídas, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar, pois como a composição química das plantas é extremamente complexa, frequentemente ocorre a extração de substâncias farmacologicamente ativas, ou não, desejadas, ou não, por isso deve-se definir com a maior precisão possível o que se deseja obter (ALVES e PAVANI, 1991).

Para a execução desta etapa, o material pulverizado foi submetido à extração a frio pelo processo de maceração por polaridade crescente. Primeiramente 100 gramas do material vegetal foram colocados em contato com 500 mL de hexano P.A. por sete dias em erlenmeyer fechado e estéril, protegido de luz, calor e umidade, com agitações regulares de 3 minutos por dia. Após este período, realizou-se a filtração sob vácuo. A solução resultante foi separada para seguir para evaporador rotativo para a obtenção do extrato seco hexânico, e o resíduo foi submetido a uma nova extração com 500 mL de solvente acetato de etila P.A. por um novo período de sete dias, com agitações regulares de 3 minutos. Ao término deste período realizou-se a filtração deste material. A solução resultante seguiu para evaporador rotativo e obteve-se o extrato de acetato de etila e com o resíduo filtrado seguiu-se nova maceração com solvente metanol, pelo mesmo processo. Após os sete dias, obteve-se o extrato metanólico e então, com o resíduo, realizou-se a última etapa do processo com solução hidroalcoólica a 70%, de água destilada estéril e etanol P.A. obtendo-se assim os quatro extratos, em um período de tempo de 28 dias. A técnica de maceração por solventes de polaridade crescente está padronizada na Farmacopéia Brasileira de 4 de novembro de 1926.

#### **4.1.4 Obtenção das frações do extrato metanólico**

##### *Cromatografia em coluna*

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes. Cromatografia em coluna consiste em uma técnica clássica, feita em coluna de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo da fase móvel devido a força da gravidade (COLLINS et. al., 2006).

A cromatografia em coluna, utilizada nos ensaios, enquadra-se na classificação de Collins em dois critérios: físico-químico (por adsorção) e passagem da amostra (eluição). Segundo a autora, quando se trata de um sólido, como a sílica ou alumina, como fase estacionária, a adsorção do soluto ocorre na interface entre o sólido e a fase móvel, devido a presença de grupos ativos em sua superfície (principalmente em atrações dipolares – forças de Van Der Waals- ou coulômbicas, incluindo a formação de ligações de pontes de hidrogênio).

Esta técnica é muito utilizada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas. As fases estacionárias mais utilizadas são sílica e alumina, entretanto estes adsorventes podem servir simplesmente como suporte para uma fase estacionária líquida. Fases estacionárias sólidas levam à separação por adsorção e fases estacionárias líquidas por partição. Esses suportes são acondicionados em tubos cilíndricos geralmente de vidro, colunas, de diâmetros variados, os quais possuem uma torneira em sua extremidade inferior. A Fig. 6 é uma ilustração de uma coluna cromatográfica empacotada com sílica, sendo mostrados seus demais constituintes.

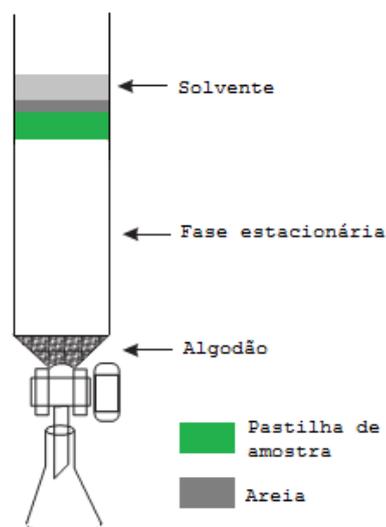


Figura 6: Esquema de empacotamento da cromatografia em coluna. Adaptado de Química Nova na Escola - Cromatografia N° 7, maio 1998.

A coluna de vidro utilizada na técnica tem 4 mm de diâmetro por 30 cm de altura. O método usado para a introdução do suporte na coluna foi com sílica gel úmida, previamente homogeneizada (sílica gel para coluna 0,063 – 0,2 mm/ 70-230 mesh ASTM) com solvente hexano P.A. Colocou-se uma pequena bucha de algodão na base inferior da coluna para evitar a passagem do suporte sólido pela torneira e a mesma foi preenchida até cerca de 20 cm, lentamente, durante 2 horas.

Após período de repouso deixou-se escoar o solvente até que restou pouca quantidade de solvente na superfície, evitando-se sua secagem completa. Posteriormente, foi introduzida a “pastilha” de amostra (impregnação da amostra - 5 gramas de extrato metanólico- em pequena quantidade do adsorvente, sílica gel) no solvente, diretamente na coluna com o auxílio de uma pipeta Pasteur, tendo cuidado para não perturbar a superfície do adsorvente, e então se iniciou a eluição.

A coluna foi preenchida com o solvente (até o topo), e iniciada a eluição propriamente dita. À medida que as frações foram sendo recolhidas na base da coluna tornou-se necessário adicionar mais solvente, cuja polaridade foi modificada mediante mistura graduada com outros solventes mais polares – Hexano P.A. 100%; Hexano P. A./ Diclorometano P. A. 50:50; Diclorometano P.A 100%; Diclorometano P.A/ Acetato de Etila P. A. 50:50; Acetato de Etila P. A. 100%; Acetato de Etila P. A./ Metanol P. A. 50:50; Metanol P. A. 100%; Metanol P. A./ Água 50:50; e Água 100% - Respectivamente, todos na quantidade de 500 mL.

Após o recolhimento das frações, realizou-se um monitoramento por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para investigar se todos os componentes da amostra foram eluídos e quais frações poderiam ser combinadas. Algumas frações continham mais de um componente, e essas frações, que não demonstraram o mesmo perfil na CCD, não foram reunidas com as que apresentavam apenas um componente.

### *Cromatografia em Camada Delgada*

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. Seu processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno de adsorção, mas pode ser após tratamento das fases estacionárias, utilizada também para partições ou trocas iônicas, o que permite seu emprego tanto na separação de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas (COLLINS et. al., 2006).

As amostras foram aplicadas nas cromatoplasas em forma de soluções a cerca de 1 cm da base inferior, através do uso de um tubo capilar. Soluções diluídas da amostra foram aplicadas repetidamente, a fim de obter uma maior concentração no ponto de partida. Mais de uma amostra foi aplicada por cromatoplasca, mantendo-se, sempre, uma distância de 1 cm entre cada, para evitar o contato entre as amostras. A placa, com a extremidade “aplicada” para baixo, foi então mergulhada na mistura de solventes (fase móvel), e mantida em câmara

fechada. Importante ressaltar que o nível do solvente sempre ficou abaixo dos pontos de aplicação e que durante a corrida, a câmara permaneceu fechada, para garantir a saturação pelo vapor do solvente. Um pedaço de papel de filtro foi colocado na parede interna da câmara, acelerando assim a saturação da mesma. A cromatoplaca foi retirada da cuba somente quando a superfície do solvente atingiu o limite pré-determinado de 1 cm abaixo da parte superior da placa (figura 7).

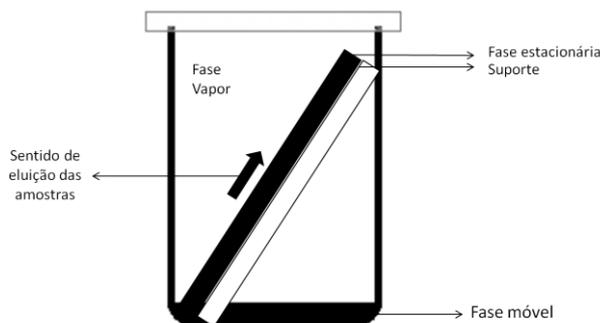


Figura 7: Esquema de eluição da cromatografia camada delgada. Adaptado de COLLINS et. al., 2006.

Após o processo, as cromatoplasmas foram secas e as posições dos componentes da amostra visualizadas por revelação, que foi feita por métodos físicos e químicos. A revelação foi documentada por luz visível, lâmpada de luz ultravioleta (365 e 245 nm) e por revelação com Acido Sulfúrico e Metanol 5% e posterior aquecimento em placa quente.

#### *Diluição dos extratos e frações para avaliação da atividade antimicrobiana*

Para a realização dos testes antimicrobianos, os extratos e frações de *Ayapana triplinervis* V. foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO): água destilada, na proporção de 1:9 (10%) e homogeneizados em agitador de tubo por 2 minutos. Para a realização dos testes microbiológicos padronizou-se as concentrações de 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 mg/ml por poço, para isso foram preparadas soluções estoques de 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/mL. Além disso, cada extrato e fração foi protegido da umidade, luz e do calor, abrindo-se os mesmos somente no momento do ensaio de microdiluição em ambiente estéril.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 4.2.1 Obtenção e manutenção das cepas testadas

Para a realização da pesquisa de atividade antibacteriana com os extratos foram utilizadas cepas de referência ATCC (*American Type Culture Collection*) de bactérias Gram-

positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) e *Escherichia coli* (ATCC 8739), obtidas a partir da coleção do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro) que foram mantidas em ágar nutriente, à temperatura ambiente, no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará.

Para os ensaios, todas as bactérias foram previamente semeadas em placas de Petri contendo meio específico para cada bactéria, para certeza de identificação de espécie. *S. aureus* foi semeado em meio ágar manitol (Figura 8 -A); *E. faecalis* ágar sangue (Figura 8 -B); *E. coli* em ágar Mac-Conkey (Figura 8 -C) e *P. aeruginosa* o ágar cetrimide (Figura 8 -D). Em seguida, todas as placas foram incubadas a 37,5°C por 24 em estufa para verificação do crescimento.

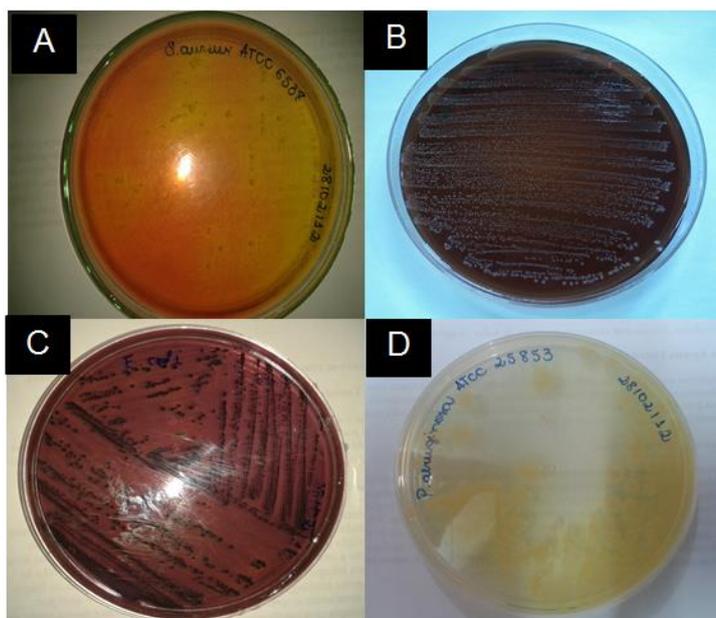


Figura 8: Bactérias em meio específico. **A.** *S. aureus* semeado em ágar manitol; **B.** *E. faecalis* em ágar sangue; **C.** *E. coli* em ágar Mac-Conkey e **D.** *P. aeruginosa* em ágar cetrimide.

O ensaio com as frações seguiu o mesmo protocolo dos ensaios com os extratos, porém as bactérias testadas foram cepas ATCC de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e um isolado clínico de *E. coli*, cedido pelo Laboratório Central do Pará (LACEN-PA), previamente confirmada por testes bioquímicos. Foi realizada a partir dos inóculos  $1 \times 10^3$  UFC/mL de nos quais foram feitas diluições conforme descrito anteriormente para os extratos.

#### 4.2.2 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram caldo Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar Mueller-Hinton (MERCK, Alemanha), ágar cetrimide (HIMEDIA, Índia), ágar nutriente (HIMEDIA, Índia), ágar manitol (HIMEDIA, Índia) e ágar Mac-Conkey (MERCK, Alemanha). Estes meios foram preparados a partir de uma base desidratada disponível comercialmente e conforme as instruções do fabricante.

#### 4.2.3 Preparo dos inóculos bacterianos

Para o preparo dos inóculos bacterianos foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Escherichia coli* (Isolado clínico), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) e *Proteus mirabilis* (ATCC 15290). Após o período de incubação, 3 a 4 colônias dessas bactérias foram selecionadas e transferidas para tubo estéril contendo 1 mL de meio caldo Mueller-Hinton. Quando necessário, realizou-se ajustes para o alcance da concentração desejada de aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL, sendo compatível com a escala 0,5 de Mc Farland. Em seguida, realizou-se a incubação dos tubos, cada um contendo a concentração do inóculo  $1 \times 10^8$  UFC/mL por 2 horas para alcançar o crescimento exponencial das bactérias. Após esse tempo, diluições seriadas foram realizadas até a obtenção do inóculo  $1 \times 10^3$  UFC/mL (CLSI, 2003).

#### 4.2.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de *A. triplinervis* V. frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas pela técnica de microdiluição

A microdiluição foi realizada a partir dos inóculos  $1 \times 10^3$  UFC/mL de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* nos quais foram feitas diluições conforme descrito acima. Os inóculos e os procedimentos adotados para as bactérias testadas seguiram a norma M7-A6 vol. 23 nº 2 da “Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico”- Norma Aprovada-Sexta edição do NCCLS (National Committee for Laboratory Standards) de janeiro de 2012. A microdiluição em placas de 96 poços foi realizada para os grupos de bactérias, conforme esquematizado na Figura 9.

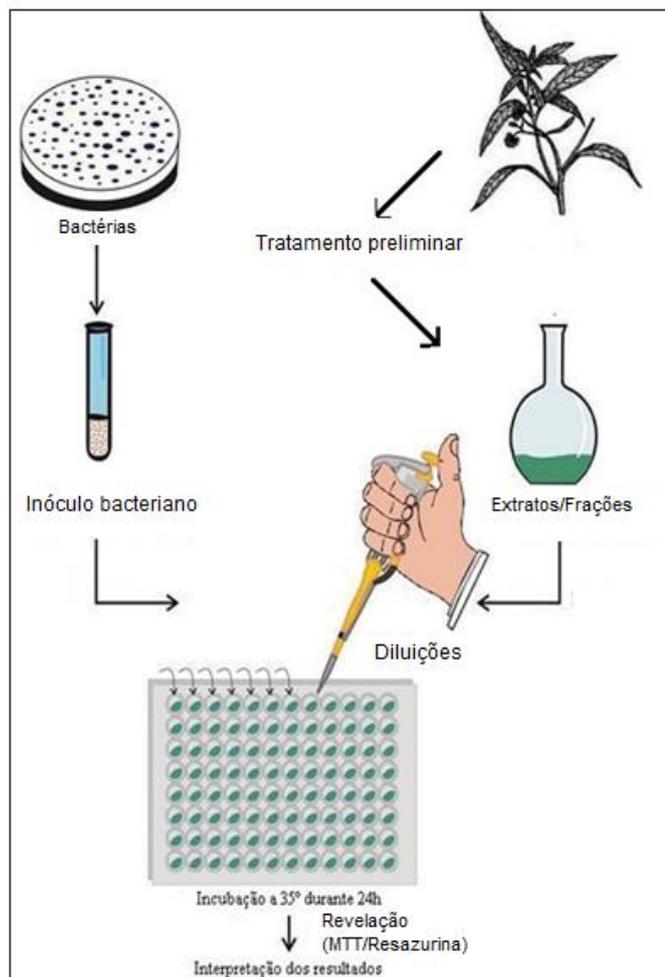


Figura 9: Representação esquemática simplificada da microdiluição em placas de 96 poços para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Fonte: Adaptado de Oliveira, 2005.

Para os testes antimicrobianos, os extratos e frações foram padronizados com solvente DMSO 10% nas seguintes concentrações: 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/mL e colocados em tubos de plásticos (Figura 10), em seguida 100µL de cada concentração foi adicionada em poços da microplaca juntamente com 100µL de inóculo bacteriano ( $1 \times 10^3$  UFC/mL), obtendo as seguintes concentrações por poço: 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 mg/ml. Cada ensaio foi realizado em triplicada para cada concentração de extrato/fração acima descrita e cada bactéria testada. Como controle negativo foi utilizado o DMSO 10% (solvente) e para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol foi utilizado contra bactérias gram-positivas (250 µg/mL) e a penicilina-estreptolisina para bactérias gram-negativas (10000unit/10mg) (Figura 11 e 12).

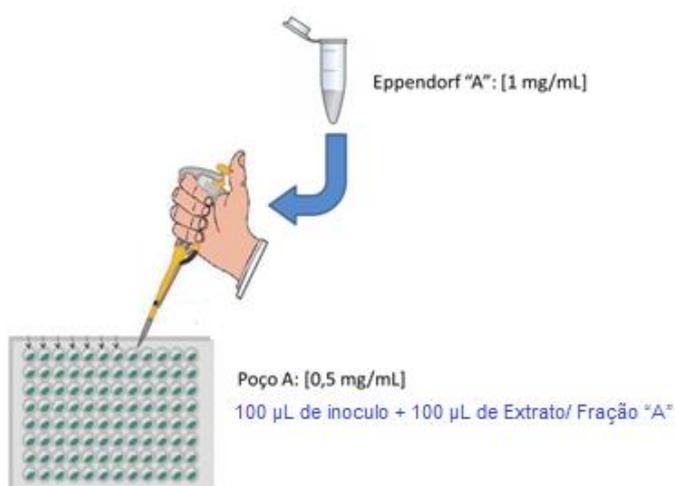


Figura 10: Esquema representativo da Diluição de extratos e frações – de eppendorfs aos poços.

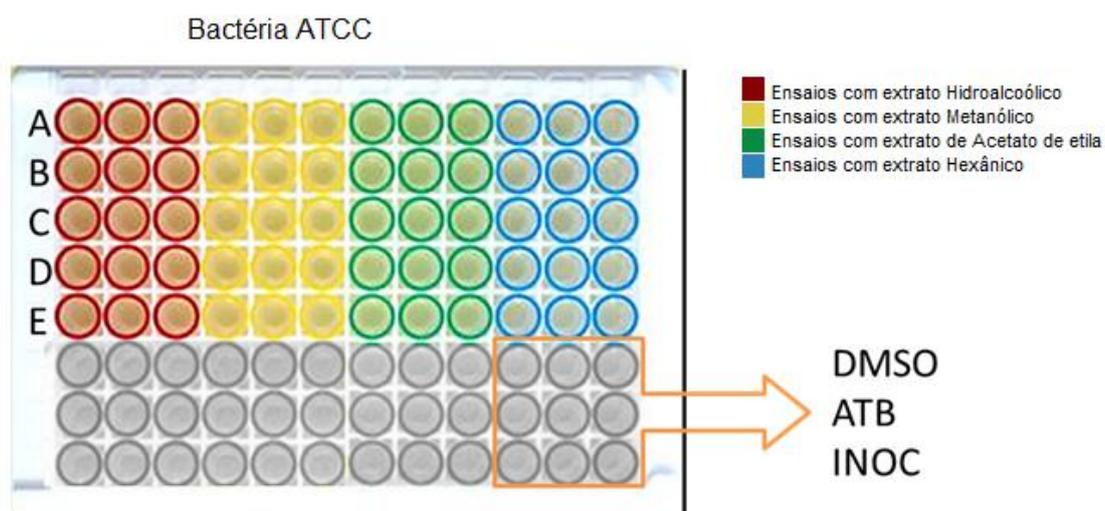


Figura 11: Representação esquemática simplificada da microplacas de 96 poços na microdiluição dos diferentes extratos – 1ª etapa de experimentos. A. 500 µg/mL; B. 250 µg/mL; C. 125 µg/mL; D. 62,5 µg/mL; E. 31,3 µg/mL.

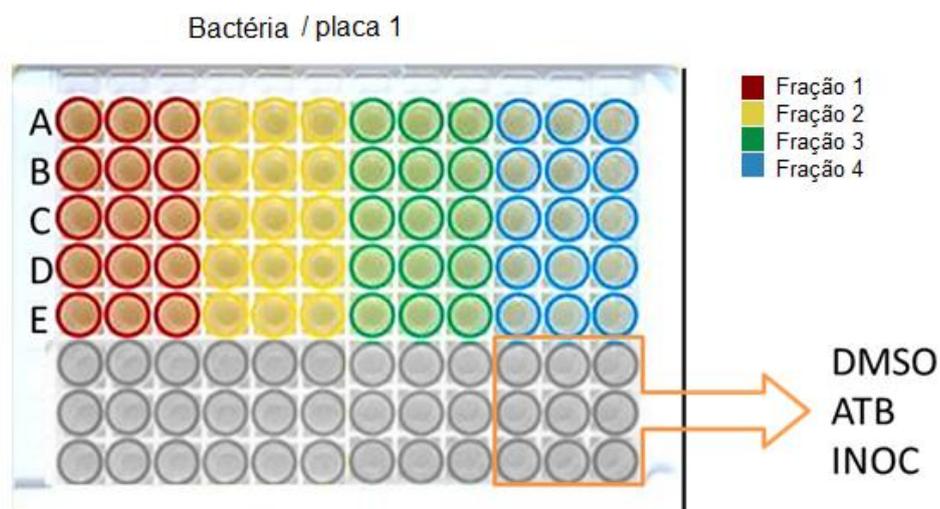


Figura 12: Representação esquemática simplificada da microplacas de 96 poços na microdiluição das frações do extrato metanólico. 2ª etapa de experimentos. A. 500  $\mu\text{g/mL}$ ; B. 250  $\mu\text{g/mL}$ ; C. 125  $\mu\text{g/mL}$ ; D. 62,5  $\mu\text{g/mL}$ ; E. 31,3  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 4.2.5 Detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi considerada como a menor concentração dos extratos e frações de *Ayapana triplinervis* V. que foram capazes de impedir o crescimento do microrganismo detectado por ensaio colorimétrico. Esse efeito foi observado pela pelo ensaio de microdiluição em caldo usando o método colorimétrico de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazolium (MTT) para os extratos. Para isso, adicionou-se em cada cavidade, 20  $\mu\text{L}$  da solução aquosa de MTT como indicador colorimétrico de oxi-redução para caracterizar a viabilidade celular no tratamento da bactéria com as frações do extrato metanólico, conforme a Norma M27-A2 do CLSI (NCCLS, 2012), Quadros et al. (2011) e (KONEMAN et al., 2001).

Após a adição do inoculo bacteriano com as diferentes concentrações dos extratos e frações em microplacas, as mesmas foram incubadas a 37°C por 22 horas, e após esse tempo, 20 $\mu\text{L}$  de MTT foram acrescentados em cada poço, para identificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Um período de 2 horas foi necessário para a reação com MTT– no caso das frações - e então realizou-se a interpretação dos resultados. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas. Além disso, 10 $\mu\text{L}$  de cada poço contendo o inóculo bacteriano e extratos da *Ayapana* foram semeados em placas de petri contendo Ágar Miller Hinton, incubados por mais 24 horas a 37°C para posterior leitura das UFCs. A partir das placas semeadas o número de UFC foi estipulado, dando assim o valor de CIM para os diferentes extratos e frações.

#### 4.2.6 Contagem da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Concentração Bactericida Mínima (CBM) é a menor concentração de um agente microbiano capaz de matar 99 a 100% dos microrganismos testados. A CBM foi obtida a partir da técnica de contagem das UFC, sendo considerada a menor concentração do extrato que resultou em nenhum crescimento ou no crescimento de no máximo três colônias placas (99,9% de morte), conforme descrito por Quadros et al. (2011).

Esta metodologia foi realizada após o semeio em placas de petri contendo Ágar Miller Hinton, de 10µL de cada amostra contendo inóculo bacteriano e extratos ou inóculo bacteriano e frações de *Ayapana triplinervis* V. Em seguida, as placas foram incubadas por mais 24 horas a 37°C para posterior leitura das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e obtenção da concentração capaz de matar pelo menos 99 a 100% dos microrganismos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Para controle positivo, o antimicrobiano comercial cloranfenicol foi utilizado em bactérias gram-positivas na concentração de 250 µg/mL, já para bactérias gram-negativas, penicilina-estreptolisina foi o antibiótico de escolha para controle de positivo, na concentração 10000unit/10mg.

## 5 RESULTADOS

*Ensaio Fitoquímico com os extratos de Ayapana triplinervis.*

### 5.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

O resultado do *screening* fitoquímico evidenciou na constituição dos extratos Hidroalcoólico; Metanólico; de Acetato de etila e Hexânico de folhas de *Ayapana triplinervis* V. a presença de saponina espumídica; açúcares redutores; alcalóides; fenóis; taninos; depsídeos; depsidonas; derivados da cumarina e sesquiterpenolactonas, entretanto foi negativo para polissacarídeos e flavonóides.

Tais resultados demonstraram que o extrato metanólico apresentou positividade para a maioria dos constituintes químicos testados e também por este motivo, além de sua maior atividade antibacteriana quando comparado aos outros extratos, foi escolhido para o fracionamento, partição sólido- líquido.

Os resultados da prospecção fitoquímica realizada encontram-se descritos abaixo no Quadro 3.

Testes	Extrato Hexânico	Extrato de Acetato de Etila	Extrato metanólico	Extrato Hidroalcoólico
Saponina espumídica	-	-	+	+
Açúcares redutores	-	-	+	-
Polissacarídeos	-	-	-	-
Alcalóides	-	-	+	-
Fenóis e taninos *	-	-	+	+
Flavonóides	-	-	-	-
Depsídeos e depsidonas	+	-	-	-
Derivados da cumarina *	+	+	+	+
Sesquiterpenolactonas	+	+	+	-

Quadro 3: Análise fitoquímica dos extratos hidroalcoólico; Metanólico; de Acetato de etila e Hexânico de folhas de *Ayapana triplinervis* V. (+)Resultado Positivo (-) Resultado negativo.

## 5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FRENTE À *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Os resultados mostram que somente o extrato metanólico apresentou uma excelente ação antimicrobiana nas concentrações testadas, com determinação de CIM em 75  $\mu\text{g/mL}$  e CBM em 150  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 13). Nos demais extratos, verificou-se pouca ou nenhuma inibição do crescimento de *S. aureus*. O inóculo bacteriano com DMSO 10% (solvente) não interferiu no crescimento bacteriano.

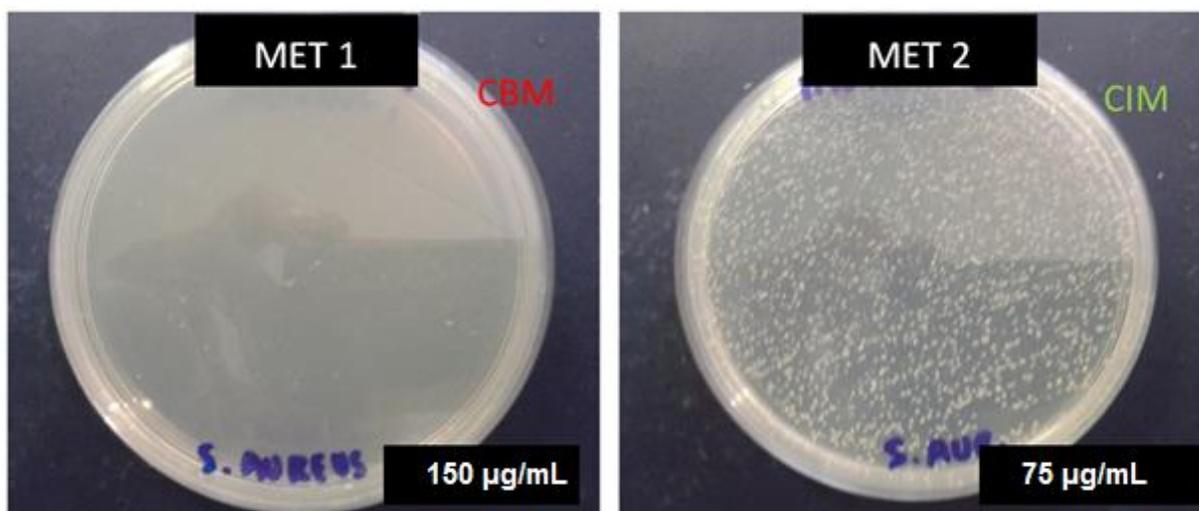


Figura 13: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Extrato Metanólico de *A. triplinervis* V. frente a *S. aureus* (ATCC 6538).



Figura 14: Controle de crescimento positivo *S. aureus* (ATCC 6538).

### 5.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FRENTE AO *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, obtendo a CIM em 125 µg/mL para o extrato hidroalcoólico; 62,5 µg/mL para o extrato metanólico; 250 µg/mL para os extratos de acetato de etila e hexânico (Figuras 15, 16, 17 e 18). No entanto, o extrato metanólico foi o que mostrou maior eficácia contra *E. faecalis* quando comparado aos demais extratos, embora não apresente ação bactericida nas concentrações testadas, visto que não foi possível obter os valores de CBM. O inóculo bacteriano com DMSO 10% não interferiu no crescimento bacteriano (Figura 19).

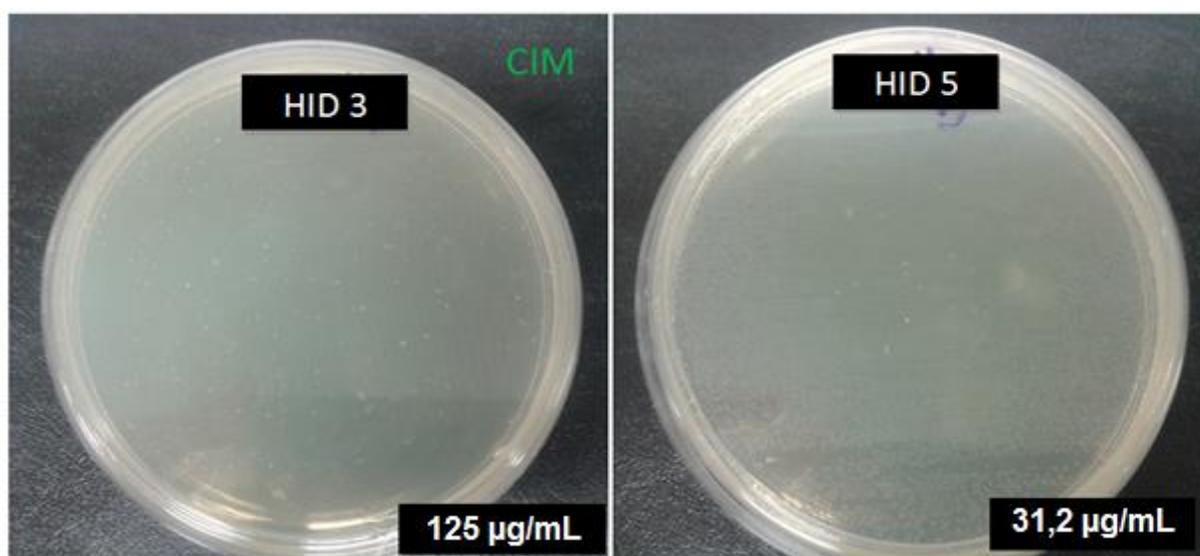


Figura 15: Concentração inibitória mínima (CIM) e menor concentração testada do **Extrato Hidroalcoólico** de *A. triplinervis* V. frente a *E. faecalis* (ATCC 29212).

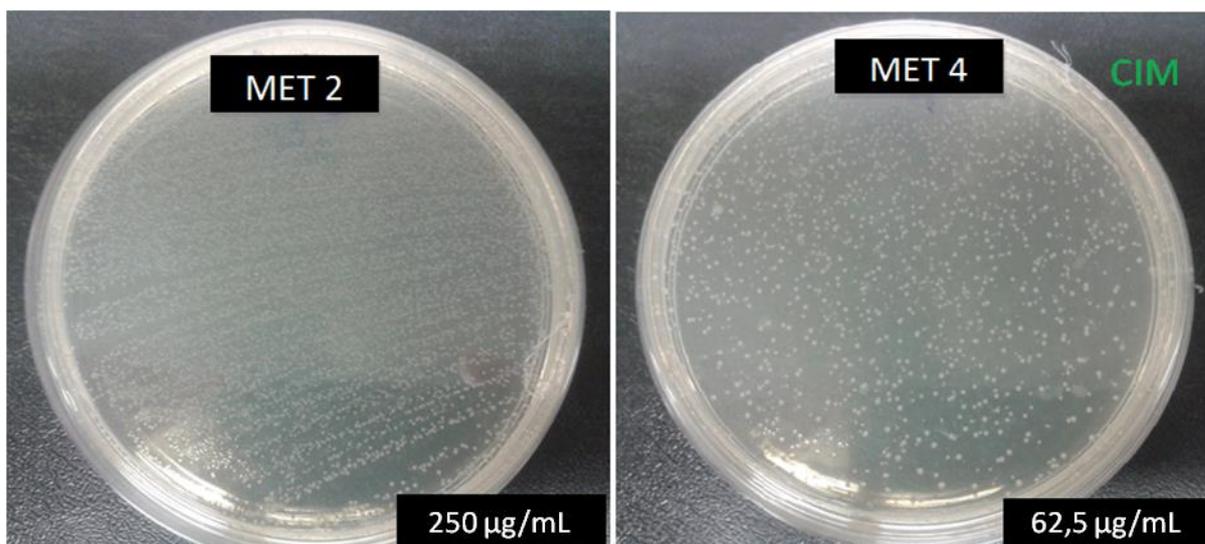


Figura 16: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e maior concentração testada do **Extrato Metanólico** de *A. triplinervis* V. frente a *E. faecalis* (ATCC 29212).

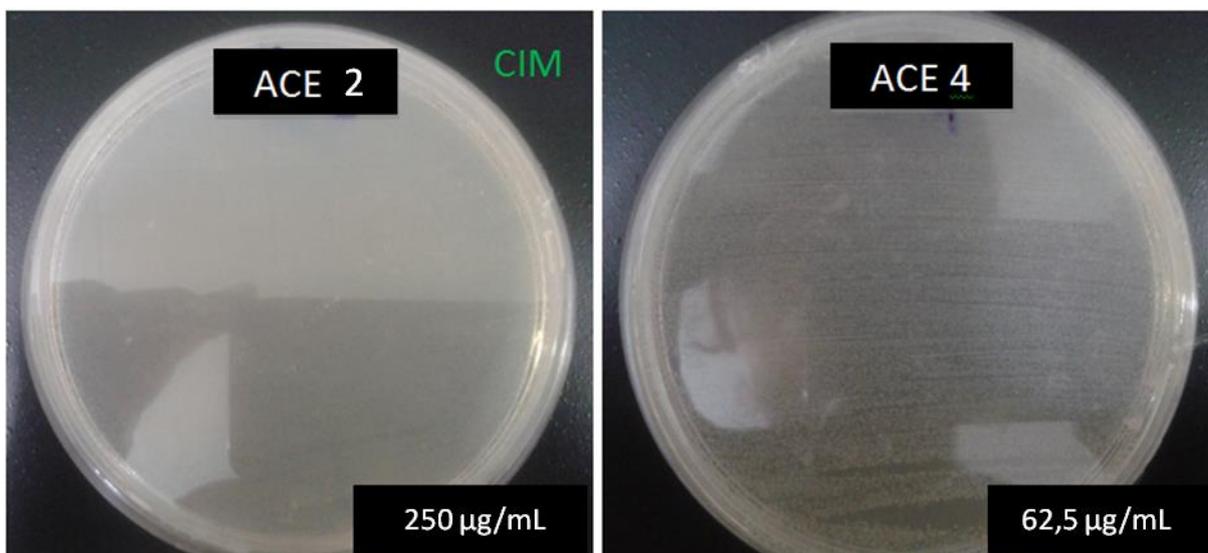


Figura 17: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e menor concentração testada do **Extrato Acético** de *A. triplinervis* V. frente a *E. faecalis* (ATCC 29212).

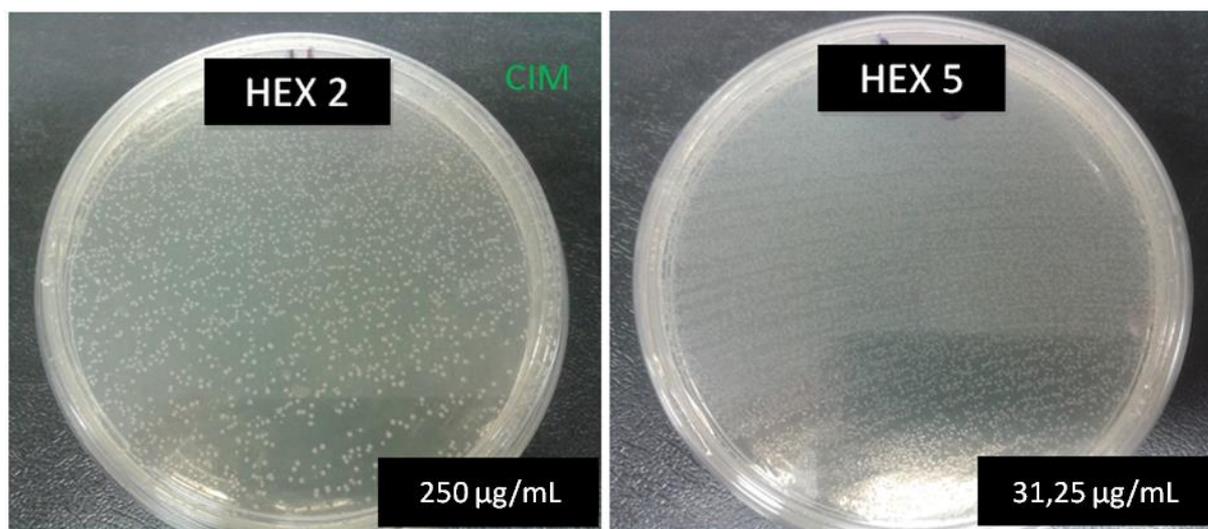


Figura 18: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e menor concentração testada do **Extrato Hexânico** de *A. triplinervis* V. frente a *E. faecalis* (ATCC 29212).

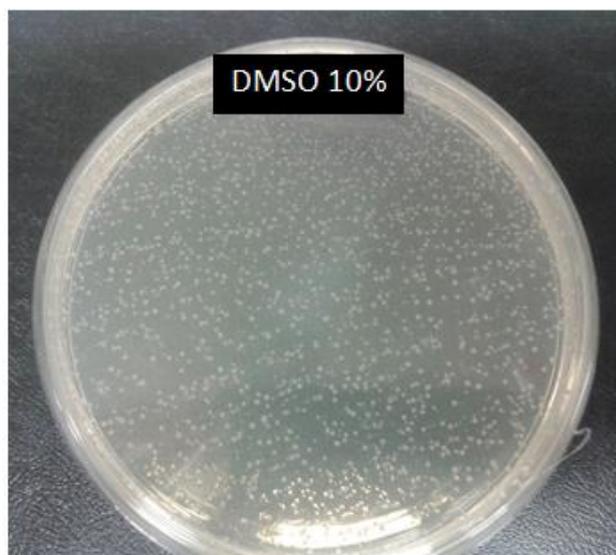


Figura 19: Inóculo e DMSO 10%. frente a *E. faecalis* (ATCC 29212).

#### 5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FRENTE A *ESCHERICHIA COLI* ATCC 8739

Os dados mostraram que a maioria dos extratos (hidroalcoólico, metanólico e hexânico) apresentam a CIM em 125  $\mu\text{g/mL}$  e CBMs em 500  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto; o extrato de acetato de etila mostrou excelente ação bactericida *in vitro*, não sendo possível obter a CIM nas concentrações testadas, visto que as mesmas foram capazes de matar 100% da bactéria com valor de 125  $\mu\text{g/mL}$  para a CBM (Figuras 20, 21, 22 e 23). O inóculo bacteriano e o DMSO 10% não demonstrou interferir no crescimento bacteriano (Figura 24). Como controle positivo foi utilizado antibiótico penicilina-estreptolisina.

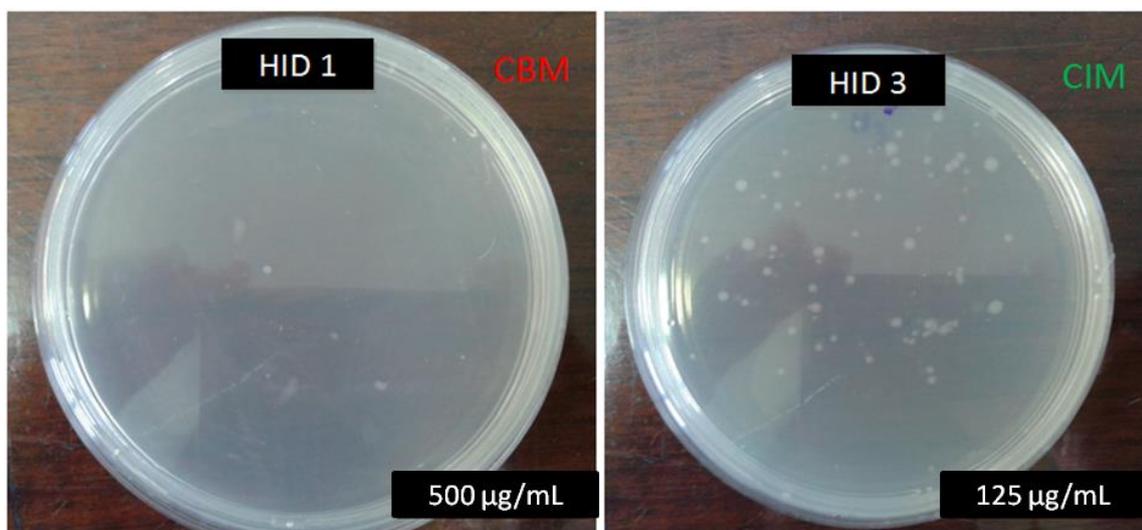


Figura 20: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do **Extrato Hidroalcoólico** de *A. triplinervis* V. frente a *E. coli* (ATCC 8739).

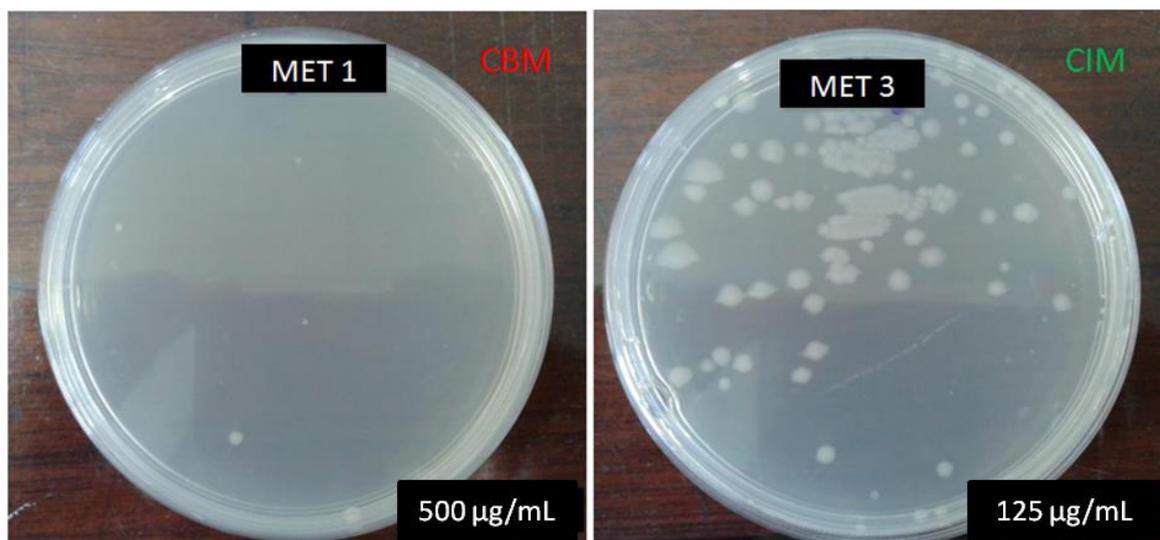


Figura 21: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do **Extrato Metanólico** de *A. triplinervis* V. frente a *E. coli* (ATCC 8739).

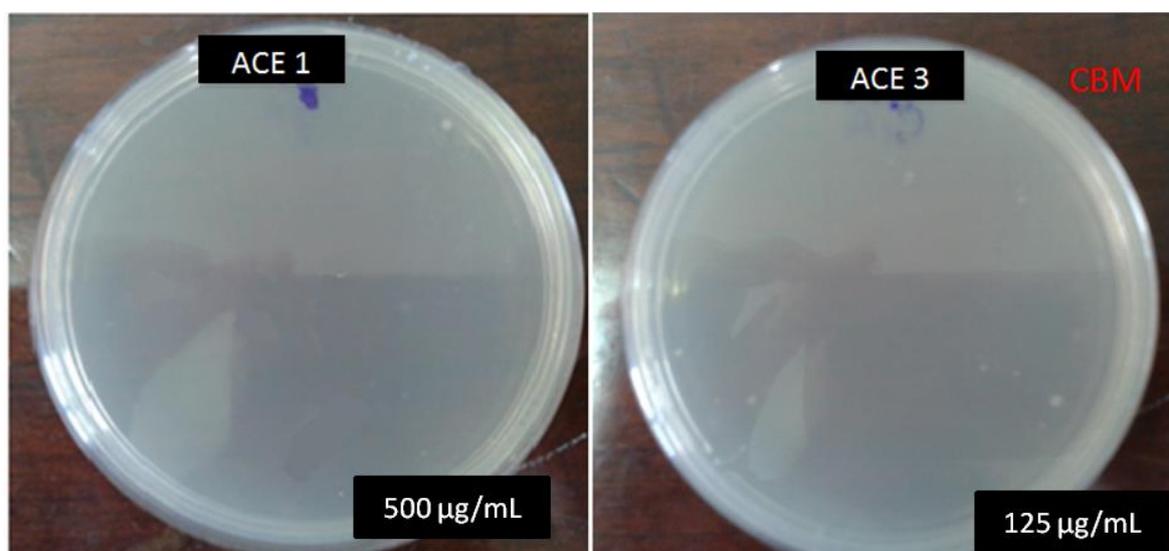


Figura 22: Concentração Bactericida Mínima (CBM) e maior concentração testada do **Extrato de Acetato de Etila** de *A. triplinervis* V. frente a *E. coli* (ATCC 8739).

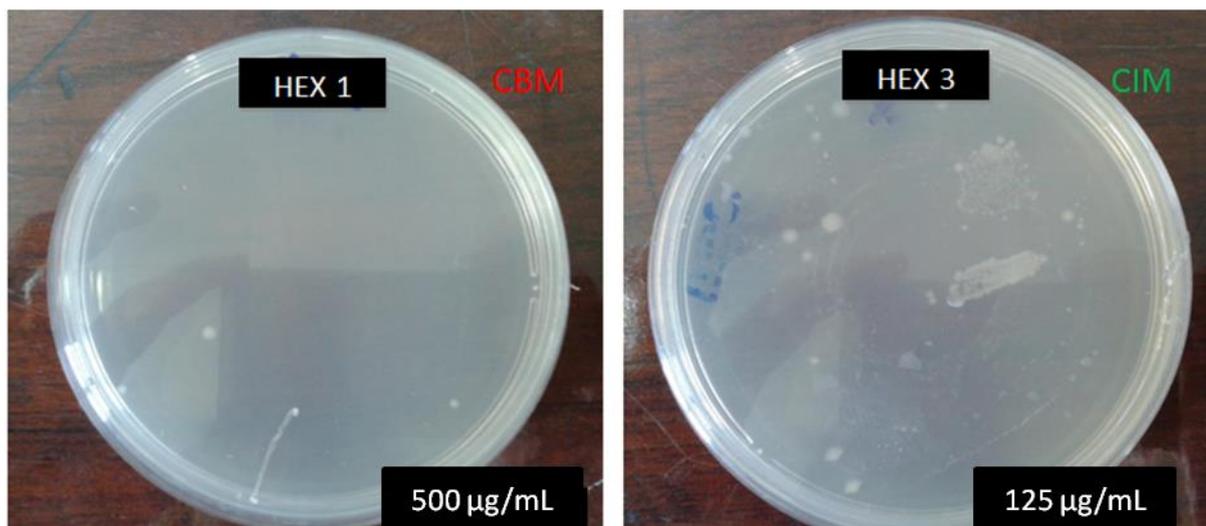


Figura 23: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do Extrato Hexânico de *A. triplinervis* V. frente a *E. coli* (ATCC 8739).

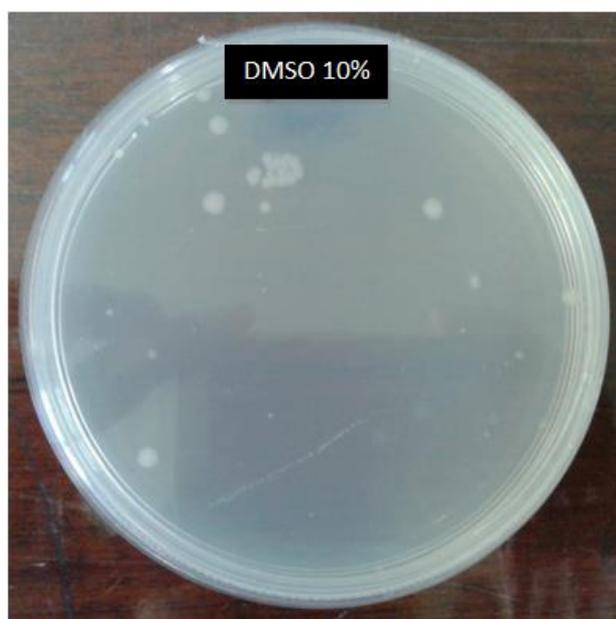


Figura 24: Inóculo e DMSO 10%. frente a *E. coli* (ATCC 8739).

### 5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FRENTE A *P. AERUGINOSA* ATCC 25853

Os extratos hidroalcoólico e metanólico foram os únicos que apresentaram atividade antimicrobiana frente a essa espécie, obtendo a CIM em 31,5 µg/mL, mas somente o extrato hidroalcoólico mostrou ação bactericida com CBM na concentração de 125 µg/mL. Os extratos hexânico e acetato de etila não demonstraram atividade antimicrobiana frente a *P. Aeruginosa* (Figuras

25 e 26). O inóculo bacteriano e o DMSO 10% não interferiram no crescimento bacteriano (Figura 27).

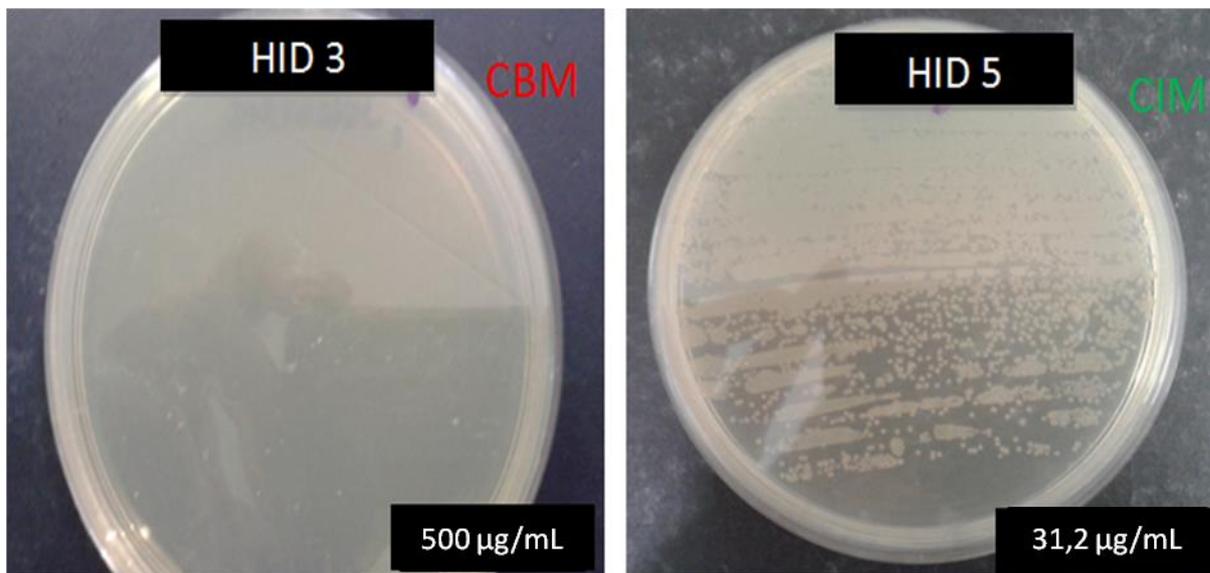


Figura 25: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do **Extrato Hidroalcoólico** de *A. triplinervis* V. frente a *P. aeruginosa* (ATCC 25853).

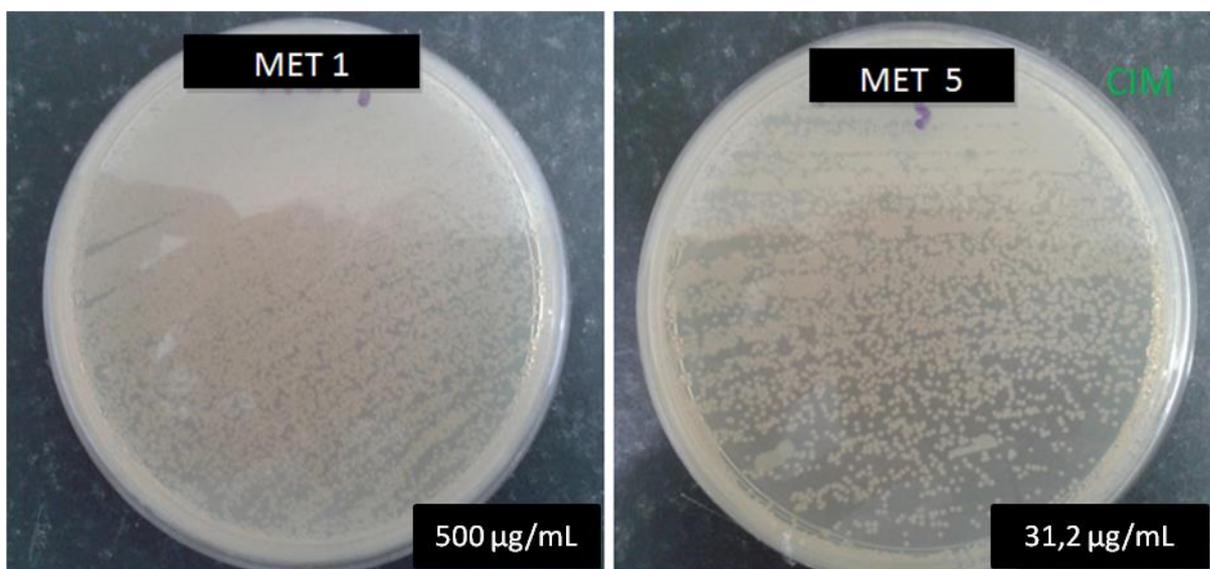


Figura 26: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e maior concentração testada do **Extrato Metanólico** de *A. triplinervis* V. frente a *P. aeruginosa* (ATCC 25853).

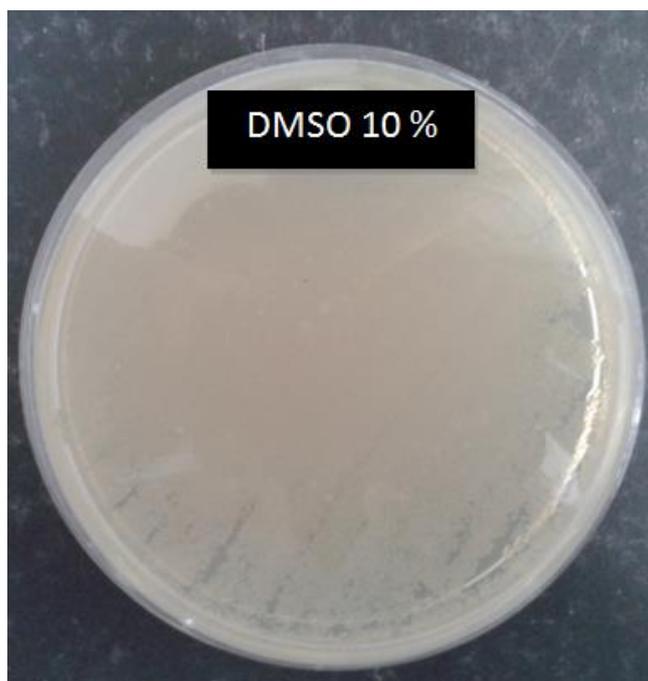


Figura 27: Inóculo e DMSO 10%. frente a *P. aeruginosa* (ATCC 25853).

Tabela 3: Resumo da atividade antibacteriana dos extratos frente às diferentes bactérias testadas (dados em  $\mu\text{g/mL}$ ).

Bacteria/Extratos	Hexânico		Acetato de etila		Metanólico		Hidroalcoólico	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853	>500	>500	>500	>500	31	>500	31	125
<i>E. coli</i> ATCC 8739	125	500	>500	125	125	500	125	500
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	>500	>500	>500	>500	75	150	>500	>500
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	250	>500	250	>500	62	>500	125	>500

## 5.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO METANÓLICO FRENTE A BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

### 5.6.1 *Escherichia coli* - ATCC 8739

A atividade antibacteriana das frações do extrato metanólico frente a bactéria *E. coli* (ATCC 8739) foi significativa nas frações extraídas com Hexano, Diclorometano, e

Diclorometano/ Acetato de etila (1:1) expostas a seguir. Para as demais frações não houveram resultados significativos frente a *E. coli* ATCC. A figura 28 mostra que fração Hexânica apresentou excelente ação antibacteriana com o valor de CIM de 15,6  $\mu\text{g/mL}$  e CBM acima de 31,3  $\mu\text{g/mL}$ .

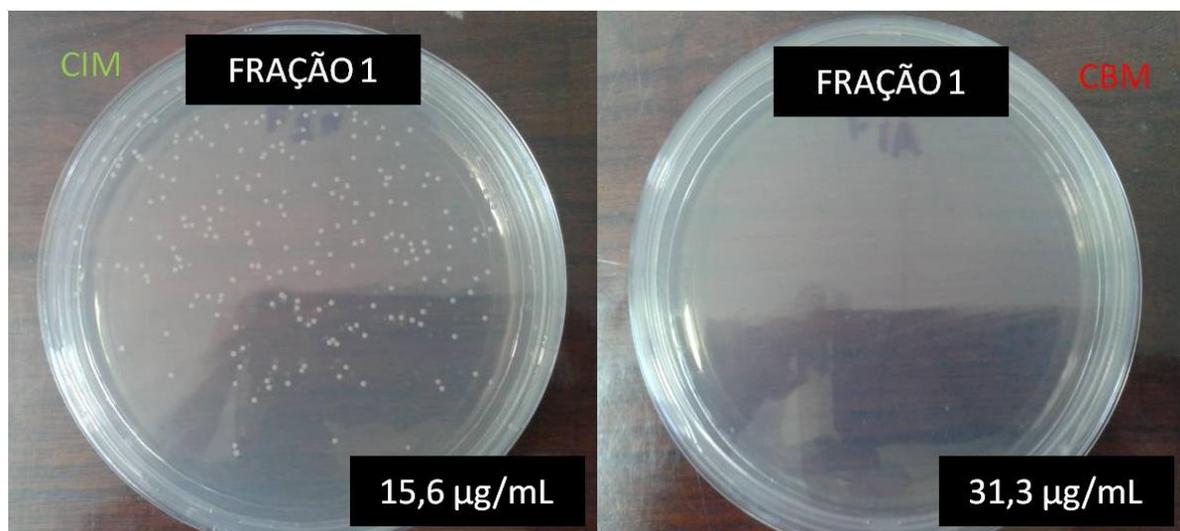


Figura 28: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Fração 1 do Extrato Metanólico de *A. triplinervis* V. frente a *E. coli* (ATCC 8739).

A fração Diclorometânica apresentou uma ação antibacteriana moderada com CIM obtido na concentração 125  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 29).

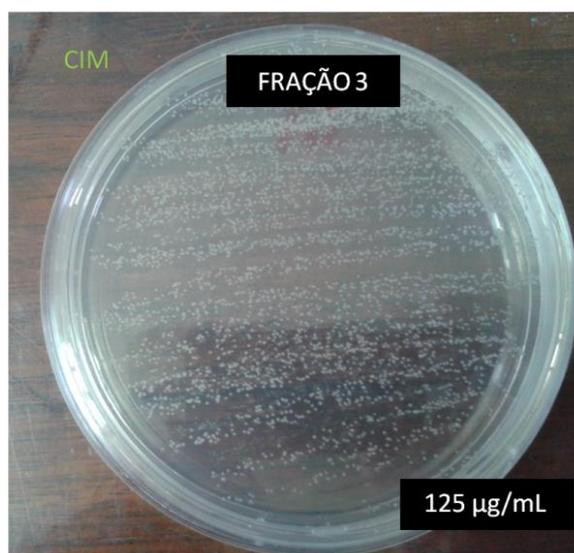


Figura 29: Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Fração 3 do Extrato Metanólico de *A. triplinervis* V. frente a *E. coli* (ATCC 8739).

Outra fração com excelente atividade antibacteriana foi a diclorometano e acetato de etila (1:1), com CIM obtido em 15,6  $\mu\text{g/mL}$ , e CBM de 31,3  $\mu\text{g/mL}$ , similar a fração 1 (Figura 30).

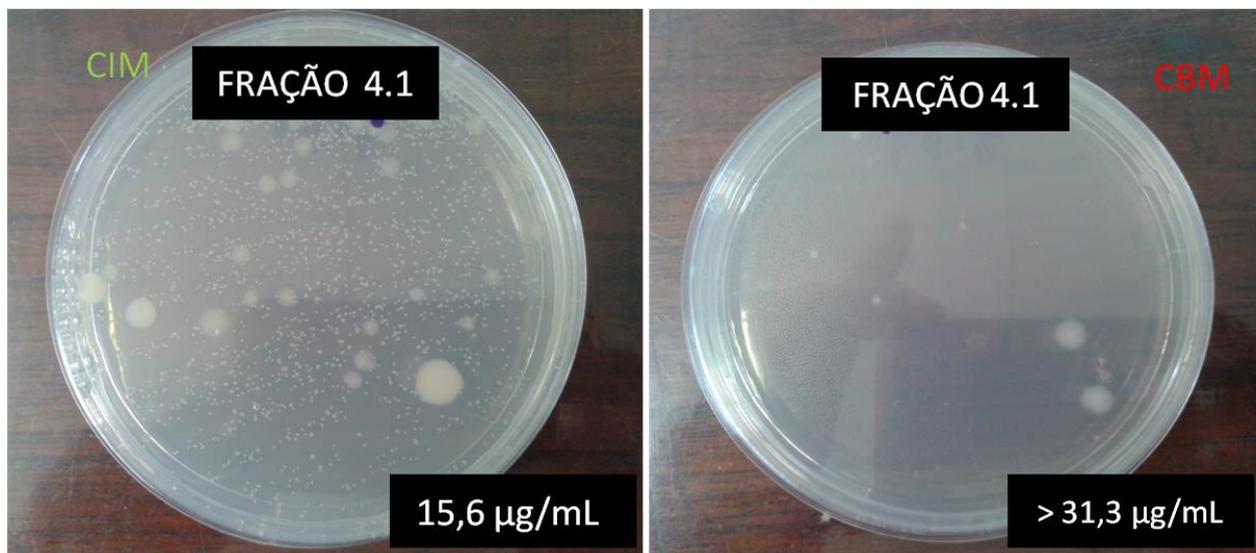


Figura 30: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Fração 4.1 do Extrato Metanólico de *A. triplinervis* V. frente a *E. coli* (ATCC 8739).

A figura 31 mostra que o DMSO 10% não interferiu no crescimento bacteriano e os antibióticos penicilina/ estreptolisina inibiram completamente o crescimento bacteriano.

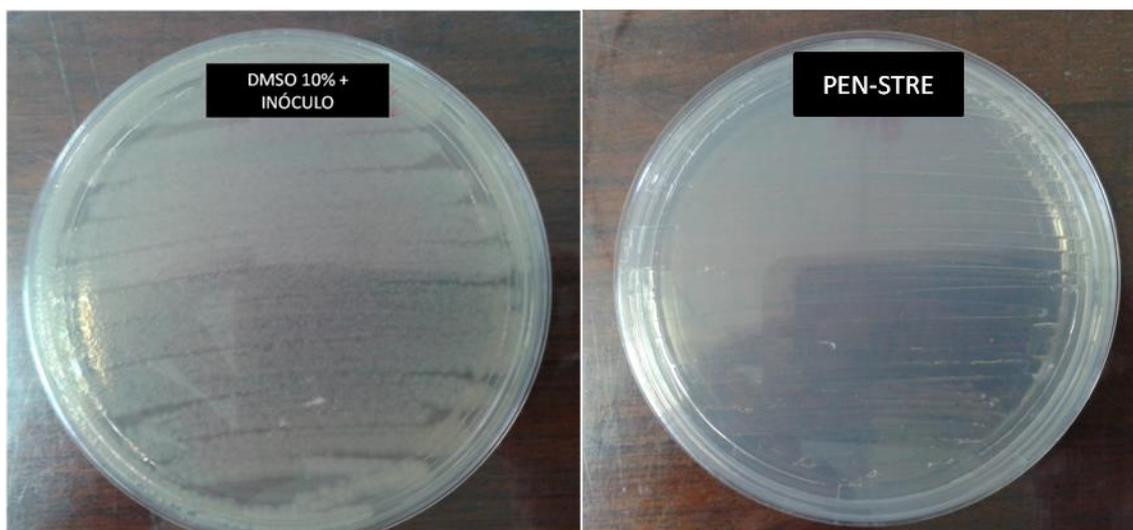


Figura 31: DMSO 10% e penicilina-streptolisina mostrando 100% de morte bacteriana.

### 5.6.2 - *Escherichia coli* – Isolado Clínico

A atividade antibacteriana das frações do extrato metanólico frente a cepa de *E. coli* com maior potencial virulento apresentou resultados relevantes com a fração Diclorometânica cujo CIM foi obtido em 31,3 µg/mL, e CBM acima 125 µg/mL (Figura 32).

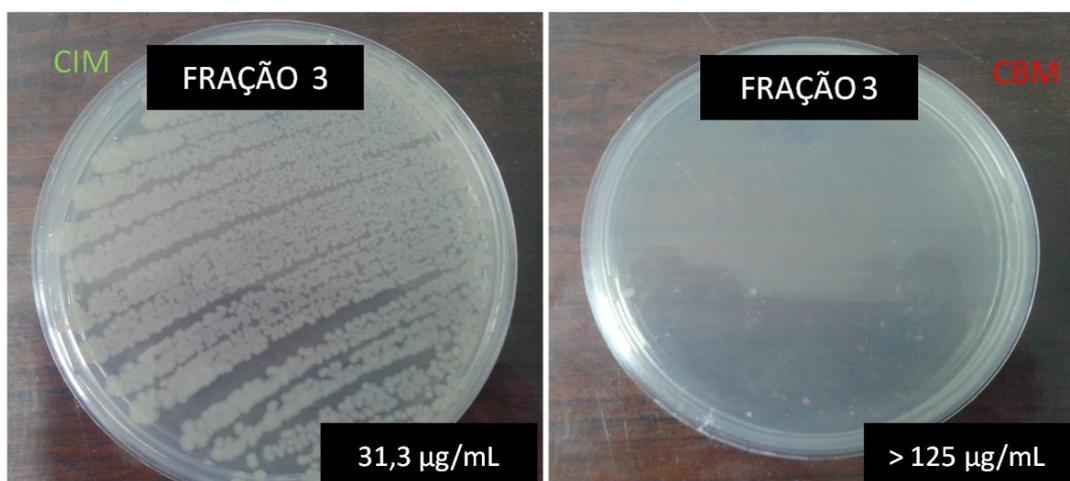


Figura 32: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da Fração 3 do Extrato Metanólico de *A. triplinervis* V. frente a *E. coli* (ISOLADO CLÍNICO).

O DMSO 10% não interferiu no crescimento bacteriano os antibióticos penicilina/estreptolisina inibiram completamente o crescimento bacteriano conforme a Figura 33 a seguir.

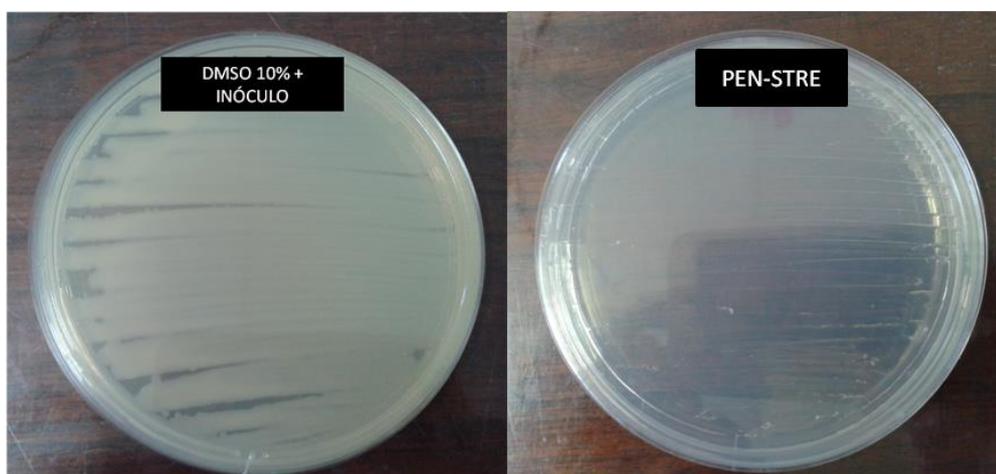


Figura 33: Controle de crescimento positivo de *E. coli* (ISOLADO CLÍNICO) com DMSO 10% e penicilina-estreptolisina com morte de 100% das bactérias.

### 5.6.3 – *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 25853

Os dados obtidos com os ensaios microbiológicos das frações do extrato metanólico frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, mostram que houve excelente atividade antibacteriana na fração diclorometânica cujo CIM foi encontrado em 62,5 µg/mL (Figura 34).

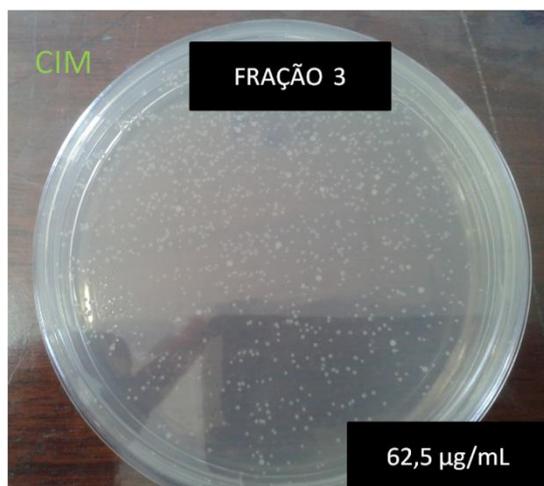


Figura 34: Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Fração 3 do Extrato Metanólico de *A. triplinervis* V. frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853.

Em nenhuma das outras frações testadas houve atividade antibacteriana relevante contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853). A figura 35 mostra os controles realizados nos ensaios (a. DMSO 10% e b. Estreptolisina-penicilina).

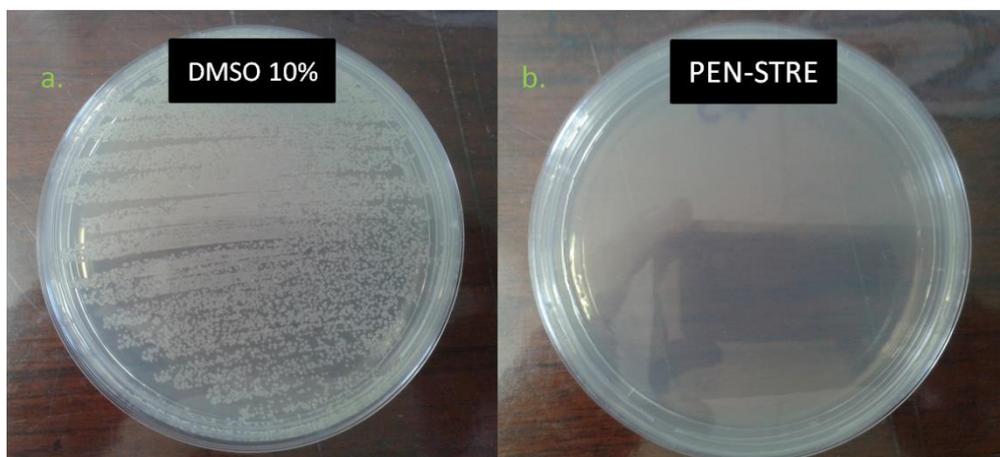


Figura 35: Controles do ensaio com *Pseudomonas aeruginosa*. (a.) DMSO 10 e (b.) Antibiótico.

#### 5.6.4 – *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae*– ATCC 15290 e 10031

Os dados obtidos com *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* ATCCS 15290 e 10031, respectivamente, mostram que nenhuma das frações do extrato metanólico apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas (0,5 a 0,03125 mg/mL). As figuras 36 e 37 mostram os controles realizados nos ensaios (a. DMSO 10%; B. antibióticos Estreptomicina-penicilina).

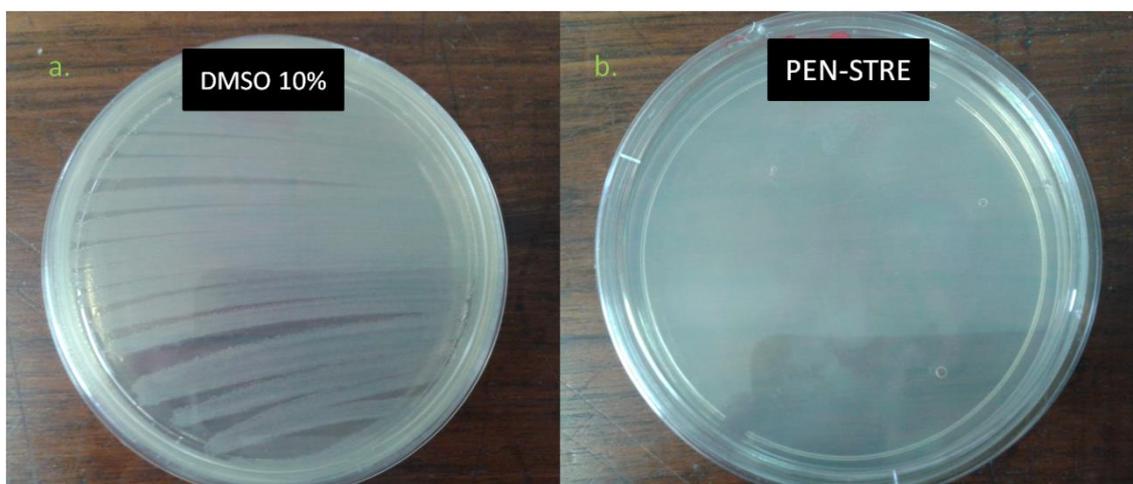


Figura 36: Controles do ensaio com *Proteus mirabilis*. (a.) DMSO 10% e (b.) Antibiótico.

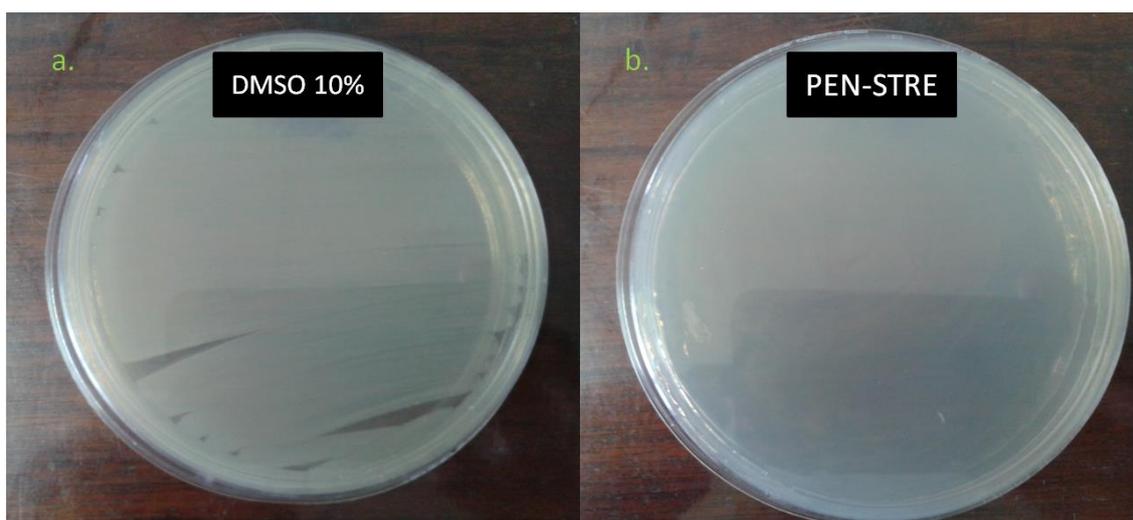


Figura 37: Controles do ensaio com *Klebsiella pneumoniae* ATCC 0000. (a.) DMSO 10% e (b.) Antibiótico.

A tabela a seguir (TABELA 4) resume os dados obtidos com as frações do extrato metanólico frente as diferente bactérias gram-negativas testadas.



## 6 DISCUSSÃO

A abordagem fitoquímica preliminar dos extratos de *Ayapana triplinervis* e frações (dados não publicados) revelou que há presença de cumarinas, alcalóides, flavonóides, compostos fenólicos, taninos condensados e esteróides. Estudos anteriores conseguiram isolar na espécie, constituintes pertencentes às classes: cumarinas, esteróides, carotenóides, óleos essenciais e vitaminas, com presença relatada no extrato de folhas (BOSE e ROY, 1936; 1937; CHATURVEDI e MULCHANDANI, 1989; NATARAJAN e NATARAJAN, 1979; SPÄTH et al., 1937; TRANG et al., 1992, 1993a,b). De acordo com estes, os metabólitos secundários mais característicos da espécie são as cumarinas. Há um total de sete cumarinas relacionadas ao nome *Ayapana triplinervis* V.: (1) aiapanina (ou herniarina), (2) aiapina, (3) dafnetina, (4) dimetil éter dafnetina, (5) metil-7- éter dafnetina, (6) hidrangetina e (7) umbeliferona, caracterizadas da planta e exemplificadas abaixo na Figura 38, adjacente a outros compostos isolados.

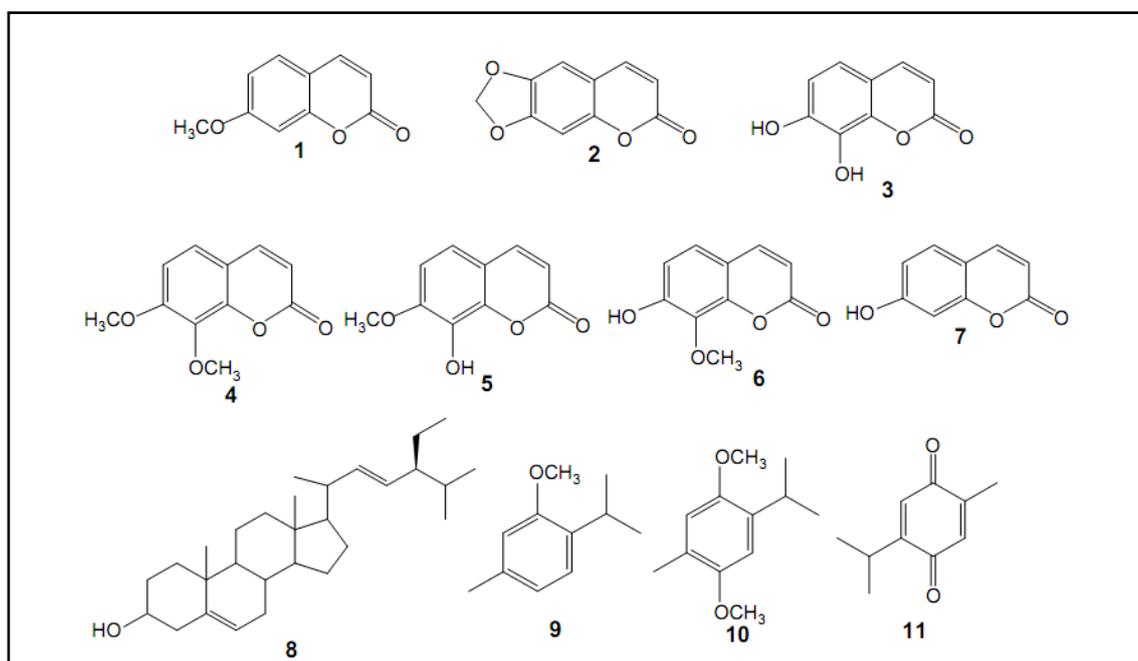


Figura 38: Metabólitos secundários isolados de *Ayapana triplinervis* V.: aiapanina (1), aiapina (2), dafnetina (3), dimetil éter dafnetina (4), metil-7-éter dafnetina (5), hidrangetina (6), umbeliferona (7), estigmasterol (8), éter metil timol (9), éter dimetil timoquinol (10), e timoquinona (11). Fonte: Gauvin-Bialecki e Marodon, 2009.

Cumarinas são consideradas componentes da resposta de defesa geral das plantas e provou-se que várias cumarinas substituídas apresentam atividade antiinflamatória ou

antimicrobiana e agem como inibidores de numerosos sistemas enzimáticos (MURRAY et al., 1982). Isto pode explicar porque *Ayapana triplinervis* V., é usada como planta medicinal. Especificamente sobre os compostos voláteis de *Ayapana triplinervis* V., há poucas investigações, dedicadas exclusivamente às amostras de óleo essencial de origem brasileira, indígena e vietnamita (GAUVIN-BIALECKI e MARODON, 2009).

Ficou evidente também, a partir da triagem fitoquímica executada nesse estudo, a presença de sete grupos: Saponina espumídica, açúcares redutores, alcaloides, fenóis e taninos, depsídeos e depsidonas, sesquiterpenolactonas e, os já citados, derivados da cumarina. Apesar da reação de cloreto férrico no teste para flavonóides ter sido fracamente positiva, as demais reações não apresentaram positividade, descaracterizando assim a presença deste grupo de substâncias na amostra em estudo.

Dentre os metabólitos positivos no extrato metanólico estavam os fenóis e polifenóis. Segundo Cowan (1999), os compostos fenólicos, fenóis e polifenóis pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, que tem no mínimo, um anel aromático e tais compostos apresentam ação sobre microrganismos, provocando a privação do seu substrato e a ruptura da membrana plasmática. De acordo com o mesmo autor, taninos são substâncias quimicamente complexas, que por não se cristalizarem, ocorrem como misturas de polifenóis difíceis de separar e são responsáveis pela ação antimicrobiana por vários mecanismos, como: ligando-se a proteínas e adesinas, inibindo enzimas, provocando a privação do substrato microbiano ou ruptura da membrana plasmática, formando complexos com a parede celular ou com íons metálicos (COWAN, 1999). São substâncias apolares, logo se suspeita que a atividade antimicrobiana dos extratos apolares possa estar associada a presença deste composto, nestas frações mais apolares do extrato metanólico.

Além de Cowan, Simões et al. (1999) relataram que os flavonóides são polifenóis de baixo peso molecular, encontrados em diversas plantas e que desde que foram descobertos, foram reconhecidos por serem sintetizadas por vegetais em resposta as infecções microbianas. Logo, não é surpreendente que tenha sido demonstrada em diversos estudos a ação antimicrobiana destas substâncias in vitro contra uma grande variedade de microrganismos. Flavonas, por exemplo, formam complexos com a parede das células dos microrganismos e outros constituintes da classe, como a crisina, e se ligam a adesinas bacterianas, residindo aí a sua atividade antimicrobiana. Vale ressaltar que diversos autores atribuem a flavonóides isolados de extratos de plantas do gênero *Ayapana*, principalmente de extratos das folhas, importantes propriedades farmacológicas, como: potente efeito inibitório sobre o crescimento

de células cancerosas, atividades citotóxica, antioxidante, antihepatotóxica, antiedema, antibacteriana, antihepatotóxica, antimalárica, além de inibição das atividades de germinação e crescimento das plantas. Neste ensaio, não foram encontrados traços de flavonoides em nenhum dos extratos produzidos. Em estudo anterior realizado por nosso grupo, a prospecção fitoquímica de *Ayapana triplinervis* V. também apresentou resultados negativos para flavonóides em extrato hidroalcoólico, sugerindo que a atividade antimicrobiana demonstrada pela planta neste extrato e em extratos polares sucede de outros metabólitos presentes, embora não descarte a possibilidade de presença desta classe de metabólitos em outras partes da planta (MALHEIROS E LOPES, 2010).

A saponina é outra classe de metabólitos secundários de vegetais, já relatadas como fortemente presentes na espécie *Ayapana triplinervis* V. (MALHEIROS E LOPES, 2010), possuindo atividade antiprotozoária através da formação de complexos com a membrana celular do parasita, conforme observado por Cheeke e Otero. No entanto, não há relatos na literatura descrevendo a ação antimicrobiana da saponinas, e também não se sabe se esses metabólitos podem atuar em sinergismo com outros componentes do vegetal. Sua presença foi observada nos extratos mais polares do vegetal. Extrato metanólico e extrato Hidroalcoólico. Vários estudos relatam que essas classes de metabólitos secundários apresentam elevada ação antimicrobiana (Rauha et al., 2000; Simões et al., 2000; Sartori, 2005; Pretto, 2005).

Para avaliarmos um metabólito secundário de um vegetal é necessária a realização de ensaios microbiológicos com os extratos produzidos a partir deste vegetal. Um extrato etanólico da espécie *Ayapana triplinervis* (planta inteira), colhida em Suriname, foi testado e reportado como ativo contra *Bacillus subtilis* na concentração de 50 mg/mL porém inativo contra outras bactérias e fungos testados (Verpoorter et al., 1987).

Um dos ensaios realizados com a espécie em 2002, utilizou os extratos metanólico e éter de petróleo das folhas de *Ayapana triplinervis* V. Estes foram testados para atividades antimicrobianas e antifúngicas. O extrato éter de petróleo apresentou maior atividade antibacteriana, mostrando amplo espectro de atividade contra cepas bacterianas, além de eficiente atividade antifúngica, contra espécies de *Aspergillus*, *Alternaria* e *Fusarium solani*, quando comparado com o extrato metanólico, que apresentou menor atividade contra ambas as cepas, bacteriana e fúngica (GUPTA et al., 2002).

Em 2006 um grupo de Carson city, estado de Nevada, EUA, publicou um relatório de dados com os principais estudos realizados com a espécie ao redor do mundo. Este relatório técnico de *Ayapana triplinervis* V. realizado por Taylor (2006) resumiu as principais pesquisas e as classificou quanto às suas ações biológicas comprovadas em estudos e relatadas

popularmente, relacionando ambas aos metabólitos já isolados e responsáveis por essas atividades. Estes dados (adaptados) seguem representados no quadro 4.

Quadro 4: Atividade biológica dos extratos da japana. Fonte: Taylor, 2006 (Próxima página).

Parte da planta/ País onde a pesquisa foi realizada	Atividade	Tipo do extrato	Notas/organismos testados	Resultados
Óleo essencial-Índia	Antidepressiva, Analgésica e Antibacteriana	Óleo essencial	_____	Ativo
Óleo essencial-Índia	Antipirética	Óleo essencial	_____	Inativo
Óleo essencial-Índia	Antifúngica	Óleo essencial	Fungos patogênicos severos	Ativo
Óleo essencial-Índia	Antifúngica	Óleo essencial	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Microsporum gymseum</i> <i>Rhizopus nigricans</i> <i>Alternaria species</i> <i>Helminthosporium saccharii</i> <i>Cladosporium herbarum</i> <i>Trichothecium roseum</i> <i>Cunninghamella echinulata</i>	Ativo
Óleo essencial-Índia	Antifúngica	Óleo essencial	<i>Aspergillus candidus</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Mucor mucedo</i> <i>Penicillium digitatum</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Inativo
Óleo essencial de flores-Índia	Antiparasitária	Óleo essencial	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ativo
Óleo essencial de flores-Índia	Antihelmíntica	Óleo essencial	<i>Taenia solium</i>	Ativo
Óleo essencial de flores-Índia	Antibacteriana	Óleo essencial	<i>Vibrio cholera ogawa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Diplococcus pneumoniae</i> <i>Shigella flexneri</i>	Ativo
Folhas-Índia	Antibacteriana	Éter petróleo	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Salmonella typhi</i> <i>Vibrio cholera</i>	Ambíguo
Folhas-Índia	Antibacteriana	Éter	<i>Shigella dysenteriae</i>	Inativo

Um estudo realizado em 2008 por Rahman e colaboradores com a espécie *Ayapana triplinervis* investigou a ação antibacteriana de extratos de folhas obtidos a partir dos solventes éter de petróleo; tetracloreto de carbono; clorofórmio e acetato de etila contra 11 bactérias patogênicas humanas, e seis fungos patogênicos (*Shigella dysenteriae* AE 14396; *S. sonnei* CRL. (ICDDR, B); *Salmonella typhi* AE 14612; *S. paratyphi* AE 14613; *Bacillus subtilis* BTCC 17; *B. megaterium* BTCC 18; *B. cereus* BTCC 19; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Pseudomonas aeruginosa* CRL (ICDDR'B); *Escherichia coli* ATCC 25922; INABA ET (Vibrio) AE 14748 e os fungos *Alternaria alternata*; *Curvularia lunata*; *Colletotrichum corchori*; *Fusarium equiseti*; *Macrophomina phaseolina*; *Botryodiplodia theobromae*). No entanto um estudo realizado por Jelager e colaboradores em 1998 com o extrato seco de folhas de *Ayapana triplinervis* reportou quase nenhuma atividade antibactericida e uma atividade fungicida fraca. Outros pesquisadores trabalharam com o extrato de folhas e reportaram resultados positivos contra varias cepas de bactérias e fungos.

A espécie já foi investigada por pesquisadores das ilhas Maurícias (África), EUA e Índia, porém nenhum dos estudos realizados e publicados mostrou o grande potencial antimicrobiano contra gram-negativas como o observado nos experimentos realizados. Este fato pode estar relacionado a composição diferenciada do vegetal brasileiro, ao momento de coleta e composição fitoquímica do mesmo, ou até mesmo pela diferenciação dos extratos utilizados na pesquisa, visto que a polaridade dos solventes e o processo extrativo empregado (esgotamento), facilita uma composição fitoquímica de polaridade intermediária, o que poderia facilitar também a entrada dos compostos antimicrobianos nas bactérias. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos na ação antimicrobiana da *Ayapana*, especialmente de sua ação mais evidenciada em bactérias gram-negativas, além da citação de Murray e colaboradores (1982) que diz que as cumarinas apresentam atividade antimicrobiana agindo através da inibição de numerosos sistemas enzimáticos das bactérias e fungos, muito pouco é citado na literatura sobre estes mecanismos.

Nesta pesquisa, todos os extratos apresentaram ação antimicrobiana, sendo que o extrato metanólico apresentou uma potente ação bactericida contra bactérias gram-positivas. Por outro lado, todos os extratos foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas, tendo essa ação variando conforme a polaridade de cada extrato. Nesse sentido, os valores de CIM obtidos para *P. aeruginosa* com os extratos hidroalcoólico e metanólico mostraram uma excelente ação bacteriostática frente a essa espécie, visto que a concentração de 0,031 mg/mL já foi capaz de inibir 50% do crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* e

0,125 mg/mL de *E. coli*. Para as bactérias gram-positivas, o melhor extrato testado também foi o metanólico, que apresentou CIM em 0,075 mg/mL para *S. aureus* e 0,062 mg/mL para *E. faecalis*, além de CBM em 0,125 para *E. faecalis*. Desta forma, fica evidente o potencial antimicrobiano do uso desta espécie. Vale ressaltar que há diferenças nos dados observados entre os extratos testados, em função provavelmente dos solventes escolhidos para o processo extrativo, com grande variação de polaridade.

A variabilidade de ação antimicrobiana dos diversos extratos testados pode também ser explicada pela imensa diversidade de metabólitos secundários responsáveis por esta propriedade antimicrobiana, que foram separados de maneira diferente, em quantidades diferentes ou até exclusivamente por cada solvente visto que a polaridade é fator decisivo para arraste destes metabólitos nos processos de extração destes vegetais.

O preparo dos extratos, a escolha dos solventes para extração deve se basear, principalmente, na seletividade que o mesmo apresenta pelos compostos a serem extraídos. No entanto, outras características não podem ser ignoradas, como a facilidade de manuseio, proteção ao ambiente e toxicidade (LIST e SCHMIDT, 2000). De acordo com a literatura, a extração que mais se adequa, em termos de rendimento, custo e tempo de processo ao experimento executado é a maceração pois a mesma enquadra-se no grupo de processos extrativos exaustivos, possibilitando o esgotamento da matéria-prima, e máxima extração de princípios ativos, inclusive os voláteis.

A polaridade do solvente influencia diretamente a eficiência de extração. O solvente utilizado deve ser o mais seletivo possível, pois é devido à seletividade do mesmo que se podem extrair as substâncias desejadas, ou separar os grupos de substâncias os quais se espera obter as atividades farmacológicas testadas. Como a seletividade depende da polaridade, o grau de polaridade do grupo que se pretende extrair determina o solvente ou a mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração (PRISTA et al., 1996; SIMÕES et al., 2003).

A extração de determinadas substâncias ainda pode ser influenciada também pela acidez/basicidade do meio extrator. Considerando que os processos extrativos dependem, predominantemente, de reações de difusão e que a renovação do solvente em contato com as substâncias a extrair desempenha um papel de grande influência na velocidade do processo de dissolução, entende-se que a agitação, seja ela constante ou em determinados intervalos, pode diminuir a duração do processo extrativo (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000; SIMÕES et al., 2003). No caso do experimento

realizado, foram estabelecidas agitações em intervalos regulares de 8 horas, e o pH da sílica é 7, o que caracteriza a reação como neutra, variando somente com o pH dos solventes.

O aumento da temperatura provoca um aumento da solubilidade de qualquer substância, motivo pelo qual os métodos de extração a quente são sempre mais rápidos do que os realizados à temperatura ambiente. Entretanto, sabemos que o calor nem sempre pode ser empregado, pois muitas substâncias são instáveis em altas temperaturas ou até mesmo voláteis (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA et al., 1996; ANSEL et al., 2000; SIMÕES et al., 2003). Por este motivo, escolheu-se o processo de extração por maceração a temperatura ambiente.

Por fim, para a escolha do método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a seletividade, a estabilidade das substâncias extraídas além do custo do processo escolhido, considerando principalmente a finalidade do extrato que se quer preparar (COSTA, 1994; SIMÕES et al., 2003). Desta forma, a maceração foi o processo ideal para a realização do experimento. Apresentou alto rendimento e estabilidade de componentes químicos, observados através dos testes fitoquímicos realizados.

Os ensaios da atividade antimicrobiana são influenciados por um grande número de variáveis técnicas ou fatores que podem interferir significativamente na pesquisa de atividade de agente antimicrobiano, incluindo a preparação e o tamanho do inóculo, a formulação do meio e seu pH, duração e temperatura de incubação e o critério usado para a verificação do resultado do ensaio. Para se obter êxito e uniformidade nos testes de atividade, estes fatores devem ser muito bem controlados (ESPINEL-INGROFF e PFALLER, 1995). No que diz respeito aos microrganismos testados, a atividade antimicrobiana pode depender dos tipos, gêneros, espécies e cepas. Os meios de cultura e as soluções diluentes foram selecionadas de modo que não causassem danos celulares. O meio de cultura inadequado pode produzir resultados onde os microrganismos aparentemente apresentam alta susceptibilidade ao agente que se está pesquisando (BARRY, 1991). A uniformidade de preparação do agente antimicrobiano, proporções do solvente utilizado, solubilidade e sua estabilidade, também podem influenciar no ensaio. Por este motivo as condições de trabalho foram sempre repetidas de modo a se estabelecer condições necessárias a uma boa reprodutibilidade dos ensaios. Todas as bactérias testadas seguiram o mesmo protocolo e as mesmas condições de manuseio, incubação e testes. O tempo de exposição foi cuidadosamente controlado, assim como o número inicial de bactérias utilizadas no ensaio.

O efeito da temperatura também é importante, seja durante a exposição ou durante a etapa de incubação. A temperatura de exposição deve ser ótima para o organismo testado,

para se recuperar o número máximo de células viáveis e prevenir a impressão do aumento de atividade do agente. Condições de anaerobiose ou microaerofilia deve ser considerada na composição da atmosfera. Níveis de pH também podem afetar a atividade de antimicrobianos. (WOODS e WASHINGTON, 1995). Finalmente as propriedades básicas próprias dos agentes antimicrobianos como sua solubilidade, estabilidade química, ação e tendência de produzir inibição parcial do crescimento sob diferentes concentrações, devem ser levadas em consideração (ESPINELINGROFF e PFALLER, 1995).

O esquema realizado nesse estudo extraiu metabólitos muito polares e sucessivamente metabólitos de menores polaridades nos extratos, Esses extratos passaram por método de maceração seqüencial (extração líquido-sólido) com os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, obedecendo à ordem crescente de polaridade. Como o extrato obtido a partir do solvente metanol foi um dos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana frente as cepas de bactérias gram negativas, principalmente de *Escherichia coli* nas concentrações testadas, o mesmo foi submetido a fracionamento cromatográfico.

Através da Cromatografia de Coluna por Via Úmida filtrante, utilizando os sistemas de solventes hexano, hexano/diclorometano 50%, diclorometano, diclorometano/acetato de etila 50%, acetato de etila, acetato de etila/ metanol 50% e metanol, foram obtidas dezesseis frações. Após confirmação com Cromatografia em Camada Delgada com leitura em três comprimentos de onda diferentes e revelação com ácido sulfúrico/ metanol 5%, as frações de padrões cromatográficos semelhantes foram reunidas e restaram então nove frações.

Muitas plantas com atividade antimicrobiana que já foram estudadas por diversos pesquisadores e, a maioria, são ativas apenas contra cepas de bactérias Gram-positivas. Em geral, todos os extratos foram eficazes contra as bactérias testadas, porém apresentaram particularidades entre si. Nesse estudo, mostrou-se também que somente o extrato metanólico apresentou ação bactericida contra a bactéria gram-positiva, *S. aureus*. No entanto, neste estudo também foi mostrado que todos os extratos foram eficazes contra uma bactéria Gram-negativa fermentadora *E. coli* e os extratos hidroalcoólico e metanólico foram potentes contra uma bactéria Gram-negativa não fermentadora (*P. aeruginosa*). Por outro lado, os extratos de acetato de etila e hexânico apresentaram pouca eficácia ou não foram eficazes contra bactérias gram-positivas e *P. aeruginosa*, mas mostraram excelente ação bactericida contra *E. coli*.

Os experimentos com as frações do extrato metanólico mostraram que, dentro deste extrato, que é um dois mais polares do vegetal, as frações mais ativas frente as bactérias gram-negativas foram as menos polares. A partir dos ensaios com quatro espécies diferentes de bactérias gram-negativas notou-se que *Ayapana triplinervis* é ativa principalmente contra

*E. coli*, tanto em cepa ATCC quanto em isolados clínicos. Além disso, a fração diclorometânica obtida a partir do extrato metanólico foi ativa contra *P. aeruginosa* (ATCC 25853), porém, não houve atividade das frações do vegetal contra *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Ainda assim, os dados mostram as frações de japana apresentaram excelente atividade antimicrobiana frente as bactérias gram-negativas. As frações de Hexano, Diclorometano e Diclorometano: Acetato de etila (1:1) apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana. A fração obtida com hexano mostrou-se ativa contra *E. coli* ATCC com CIM em 5,6 µg/mL e CBM em 1,3 µg/mL. A fração diclorometano mostrou atividade de CIM em 25 µg/mL e CBM em 125 µg/mL para *E. coli* ATCC e CIM de 1,35 µg/mL e CBM de 25 µg/mL para *E. coli* Isolado Clínico. Esta fração ainda foi ativa contra *P. aeruginosa* ATCC 25853 com CIM em 2,5 µg/mL e CBM em 125 µg/mL. Outro resultado positivo foi obtido com a fração Diclorometano: Acetato de etila (1:1) que apresentou CIM em 5,6 µg/mL e CBM em 1,3 µg/mL para *E. coli* Isolado Clínico. As outras frações não mostraram atividade significativa contra as bactérias testadas.

A maior sensibilidade das bactérias Gram- negativas pode ser justificada pelas diferenças estruturais destas bactérias em relação às Gram positivas, principalmente na parede celular bacteriana, que pode ter alterado a ação dos produtos antimicrobianos testados. Nesse sentido, Urzua e colaboradores (1998) sugerem que a membrana externa das bactérias Gram-negativas poderia agir como uma barreira contra as substancias ativas presente nos extratos de plantas. Desta forma, embora a ampla quantidade de estudos que mostram a ação antibacteriana da Japana, pouco se sabe realmente sobre os possíveis metabólitos secundários que possuem mecanismos de ação antimicrobiana envolvidos na morte de bactérias e fungos.

Esta diferença pode ser explicada pela polaridade intermediária dos compostos extraídos nestas frações. Sabe-se que compostos extraídos por solventes muito apolares, ou muito polares, não possuem uma grande possibilidade de tornarem-se um fitoterápico, visto que os mesmos solventes apolares que os retiram são tóxicos e dificultam uma possível viabilização farmacológica além de um grande custo para os processos extrativos, e os solventes muito polares, correm um grande risco de contaminação por fungos e bactérias, dificultando assim a estabilidade do fármaco, logo, o experimento extraiu substâncias de polaridades intermediárias, o que além de facilitar a estabilidade das moléculas, dificulta a contaminação por fungos e bactérias e facilita o processo extrativo.

Em vista da resistência que muitos patógenos humanos apresentam devido à seleção a que passaram pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, da emergência de infecções incomuns e efeitos adversos apresentados por alguns medicamentos, as pesquisas tornaram-se

mais direcionadas às plantas medicinais, sendo que muitas espécies já se mostraram eficazes como agentes antimicrobianos (ZAMPINI et al., 2005). Além disso, Para Holetz et al. (2002), extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações acima de 0,5 mg/mL possuem fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas. Partindo desse princípio, supõe-se que os extratos de *Ayapana triplinervis* V. possuem grande potencial farmacológico e grandes perspectivas de aproveitamento farmacêutico, já que todos os extratos e frações demonstraram atividades bacteriostáticas e bactericidas em concentrações muito inferiores, inferiores ou iguais a 0,5 mg/mL.

A espécie *Ayapana triplinervis* mostrou-se muito promissora como alternativa antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, inclusive cepas de isolados clínicos de *E. coli*. Novos ensaios e pesquisas de mecanismos de ação podem elucidar ainda mais essa atividade da planta, e então novas discussões sobre o potencial farmacológico da espécie poderão ser levantadas. Desta forma, conclui-se que, é válida a iniciativa de purificar ainda mais estas frações e isolar-se deste vegetal os componentes bactericidas na busca de elucidar seus componentes ativos frente a bactérias gram-negativas, tanto pela baixa eficácia de produtos vegetais nocivos a estes microrganismos quanto pela pouca compreensão de seus mecanismos de ação antimicrobiana. Compreender estes mecanismos tornou-se um grande desafio a comunidade científica atualmente, visto que este grupo de bactérias atualmente corresponde um desafio aos microbiologistas clínicos por seu alto potencial de resistência e mutação.

## 7 CONCLUSÕES

---

- O *screening* fitoquímico evidenciou na constituição dos extratos Hidroalcoólico; Metanólico; de Acetato de etila e Hexânico de folhas de *Ayapana triplinervis* V. a presença de saponina espumídica; açúcares redutores; alcalóides; fenóis; taninos; depsídeos; depsidonas; derivados da cumarina e sesquiterpenolactonas, entretando foi negativo para polissacarídeos e flavonóides.
- Todos os extratos obtidos da espécie *Ayapana triplinervis* V. apresentaram ação antimicrobiana, com potenciais variáveis, sendo que o extrato metanólico apresentou uma potente ação bactericida contra bactérias gram-negativas.
- Os extratos Acetato de etila e Hexânico apresentaram pouca eficácia ou não foram eficazes contra bactérias gram-positivas e *P. aeruginosa*, mas mostraram excelente ação bactericida contra *E. coli*;
- Foram obtidas nove frações diferentes do extrato metanólico de *Ayapana triplinervis* os quais 3 foram fortemente ativas frente a ensaios de CIM e CBM com *P. aeruginosa* e *E. coli*;
- As frações Hexânica, Diclorometânica e diclorometano/ Acetato de etila se mostraram muito eficazes frente a *E. coli* ATCC e isolado clínico;
- Todos os extratos foram eficazes contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* e os extratos hidroalcoólico e metanólico foram potentes contra a bactéria Gram-negativa não fermentadora (*P. aeruginosa*)

A partir dos dados obtidos, observa-se a necessidade de isolamento dos compostos presentes nas frações dos extratos que foram eficazes contra as bactérias Gram-negativas para posterior elucidação de seus mecanismos de ação bactericidas. No entanto, esse estudo evidenciou a possibilidade de utilização da espécie *Ayapana triplinervis* V. como alternativa terapêutica no tratamento das infecções bacterianas por Gram-negativas, ou mais especificamente por *E. coli*.

## REFERENCIAS

---

ABBOTT, S. L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: VERSALOVIC, J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: 10th edition, ASM Press, 639-57, 2011.

ADAME, A.; JACCOUD, C; COBRA, E. Biodiversidade, Biopirataria e Aspectos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. In: **Direito, sociobiodiversidade e soberania na Amazônia**. Conselho Nacional de Pesquisa e Pós-Graduação em Direito. Florianópolis: Fundação Boiteux, v.15, p.29-648, 2006.

ALBRECHT, T. et al. *Medical Microbiology*. Universidade Do Texas. 4° Ed. 1996. Em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A1503>>. Acesso em: out. 2010.

ALMEIDA, M. T. G.; SILVA, R. M.; DONAIRE, L. M.; MOREIRA, L. E.; MARTINEZ, M. B. Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. **J Pediatr (RJ)**. v. 74, p. 291-8, 1998.

ALSTON, W. K.; ELLIOTT, D. A.; EPSTEIN, M. E.; HATCHER, V. B.; TANG, M.; LOWY, F. D. Extracellular matrix heparan sulfate modulates endothelial cell susceptibility to *Staphylococcus aureus*. **J Cell Physiol**. v. 173, p. 102-9, 1997.

ALVES, P. L.; PAVANI, M. C. Instruções básicas para a coleta e preparo de material botânico a ser herborizado. Jaboticabal: FUNEP, 1991.

ANDRADE, L. N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J. C. et al.. Dissemination of blaKPC-2 by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. V. 55,p. 3579-583, 2011.

ANDRADE, S. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C. et al. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). **J Antimicrob Chemother.** v. 52, p. 140-141, 2003.

ANDREWES, F. W.; HORDER, T. J. A study of the *streptococci* pathogenic for man. **The Lancet.** v. 168(4334), p. 775 - 783, 1906.

ARAÚJO, K. C. dos S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Rev. Pesq. Inov. Farm.** v. 3(1), p. 9-14, 2011.

ARCHER, G. L.; NIEMEYER, D. M. Origin and evolution of DNA associated with resistance to methicillin in *staphylococci*. **Trends Microbiol.** v. 2, p. 343-7, 1994.

ARREDONDO, G. J. L.; DIAZ, R. R.; SOLORZANO, S. F. et al. Neonatal septicemia due to *Klebsiella pneumoniae*. Septicemia due *Klebsiella pneumoniae* in newborn infants. Nosocomial outbreak in an intensive care unit. **Rev Latinoam Micr.** Vol 34, p: 11-6, 1992.

ASLANGUL, E.; RUIMY, R.; CHAU, F.; GARRY, L.; ANDREMONT, A.; FANTIN, B. Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 49(10), p. 4144–4148, 2005.

BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L. C. (org.) **Plantas medicinais: arte e ciência.** São Paulo: Universidade Estadual Paulista. p.169-197, 1996.

BALDASSARRI, L.; CRETÍ, R.; MONTANARO, L.; OREFICI, G.; ARCIOLA, C. R. Pathogenesis of implant infections by *enterococci*. **Int J Artif Organs.** v. 28, p. 1101-9, 2005.

BAPTISTA, E. R. Conhecimentos e práticas de cura em comunidades rurais amazônicas: recursos terapêuticos vegetais. Belém, 2007. Dissertação (Doutorado em ciências: Desenvolvimento Sócio Ambiental) - Núcleo de Altos Estudos Amazônicos (NAEA). Universidade Federal do Pará. Belém, 2007.

BARATA, L. E. S.; QUEIROZ, S. R. R. Contribuição efetiva ou potencial do PADCT para o aproveitamento econômico sustentável da biodiversidade. **Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT)**. Campinas. 1995.

BARBUIYA, A. R. et al. Diversity and conservation of medicinal plants in Barak valley, Northeast Índia. **Índian Journal of Tradictional Knowledge**. v. 8(2), p.169-175, 2009.

BARNES, E. M. Tetrazolium reduction as a means of differentiating *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus faecium*. **J. Gen. Microbiol.** v. 14, p. 57-68, 1956.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B.; Colibacillosis In: SAIF, W. M. **Diseases of Poultry**. Iowa State University Press, Ames Iowa. v. 11, p. 138-144, 2003.

BEACHEY, E. H.; CHIANG, T. M.; OFEK, I.; KANG, A. H. Interaction of lipoteichoic acid of grupo A *Streptococci* with human platelets. **Infect Immun.** v. 16, p. 49-54, 1977.

BEACHEY, E. H.; DALE, J. B.; GREBE, S.; AHMED, A.; SIMPSON, W. A.; OFEK, I. Lymphocyte binding and T-cell mitogenic properties of group A *streptococcal* lipoteichoic acid. **J Immunol.** v. 122, p. 189-95, 1979.

BECKSTROM-STERMBERG; STEPHEN, M.; DUKE, J. A. The phytochemical database. **National Germplasm Resources Laboratory (NGRL), Agricultural Research Service (ARS)**, U.S. department of agriculture. 1994.

BENDER, E. A. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Enterococcus* spp. isoladas em dois hospitais de Porto Alegre. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) - PPGCF- UFRGS, Porto Alegre, 2008.

BENDER, E. A.; FREITAS, A. L. P. de; BARTH, A. L. Avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus spp.* isolados em dois hospitais de Porto Alegre – RS, Brasil. **RBAC.** v. 42(1), p. 15-19, 2010.

BETTELHEIM, K. A. Biochemical characteristics of *Escherichia coli*. In: GYLES C. L. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. **CAB**. Wallingford, UK. p. 3-30, 1994.

BHUTTA, Z. A.; NAQUISH; MUZAFFART. et al. Neonatal sepsis in Pakistan, Presentation and pathogens. **Acta Paed Scand**. Vol 80, p: 596-601, 1991.

BLACKE, P. A.; RAMOS, S.; MACDONALD, K. L.; RASSI, V.; GOMES, T. A. T.; IVEY, C.; et al. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal disease in urban Brazilian Infants. **J Infect Dis**. v. 167, p. 627-32, 1993.

BOLETIM Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede RM. Ano III – Ed. 1, de 10 de julho de 2009.

BONDURANT C. S. Analysis of hydrangea arborescens. Botanical Medicine Monographs and Sundry. **American Journal of Pharmacy**. v. 59, p. 3, 1887.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**. v. 101(6), p. 1644-55, 1992.

BOSE, P. K.; ROY. **J. Indian Chem. Soc**. v.13, p.586, 1936.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21<sup>st</sup> century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance treat. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 14(4), p. 933-951, 2001.

BRASIL. **Resolução RDC** nº. 14, de 31 de março de 2010. Registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/103507-14.html>>. Acesso em: jun. 2010.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; SMITH, N. R. **Bergey's manual of determinative bacteriology**: manual. [Baltimore]: The Williams & Wilkins Co. v. 7, 1957.

BRIDGE, P. D.; SNEATH P. H. A. *Streptococcus gallinarum* sp. and *Streptococcus oralis* sp. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 32, p. 410-415, 1982.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant. Physiol.**, v. 124, p. 507-514, 2000.

BROCK et al. **Biologia dos Microorganismos**. 11<sup>a</sup> ed. Madri: Pearson Education, 2006.

BRUN-BUISSON, C.; LEGRAND, P.; PHILLIPPON, A.; MONTRAVERS, F.; ANSQUER, M.; DUVAL, J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **The Lancet**. v. 2, p. 302-6, 1987.

BUCHANAN, R. E.; HOLT, J. G.; LESSEL JR, E. F. **Index Bergeyana**. The Williams & Wilkins Co, Baltimore. p. 1071-1092, 1966.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94(3), p. 223-253, 2004.

BURWEN, D. R.; BANERJEE, S. N.; GAYNES, R. P. The National Nosocomial Infections Surveillance System. Ceftazidime resistance among selected nosocomial gram-negative bacilli in the United States. **J Infect Dis**. v. 170, p. 1622-5, 1994.

BUU-HOI, A.; GOLDSTEIN, F. W.; ACAR, J. F. R-factors in gram- positive and gram-negative aerobic bacteria selected by antimicrobial therapy. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v. 49, p. 46-55, 1986.

CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261-279, 2001.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência hoje**. v. 21(1), p.26-30, 1997.

CASEWELL, M. W.; HILL, R. L. R. The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother**. v. 18(A), p. 1-12, 1986.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais, conceitos sobre modificação estrutural para a otimização da atividade. **Quim. Nova**. v. 21, p. 99-105, 1998.

CEFAR, *Pseudomonas aeruginosa*. Informativo de Microbiologia. Ano V, 31<sup>a</sup> ed. 2009. Disponível em: <<http://www.cefar.com.br/download/jornal%2031ed%20%283%29.pdf>>. Acessado em: 24/03/2011.

CETINKAYA, Y.; FALK, P.; MAYHALL, C. G. Vancomycin-Resistant Enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 13, p. 686–707, 2000.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in *staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clin Microbiol Rev**. v. 10, p. 781-91, 1997.

CHANG, P. C.; LI, H. Y.; TANG, H. J.; LIU, J. W.; WANG, J. J.; CHUANG, Y. C. *In vitro* synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*, **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 40, p. 56-61, 2007.

CHATURVEDI, R.; MULCHANDANI, N. B. Coumarins from Eupatorium ayapana. **J. Ind. Chem. Soc.** v. 66, p. 286-287, 1989.

CHAURASIA, S. C.; KHER, A. Activity of essential oils of three medicinal plants against various pathogenic and nonpathogenic fungi. **Índian Journal of Hospital Pharmacy**. v. 15, p. 139-141, 1978.

CHEN, L.; CHAVDA, K. D.; FRAIMOW, H. S. et al. Complete nucleotide sequence of blaKPC-4 and blaKPC-5 harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. **Antimicrob Agents Chemother**, 2012.

CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. **CLSI document M7-A6. CLSI, 940.** USA, 2003.

COKER, C.; POORE, C. A.; LI, X.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes Infect.**; Vol. 2, p:1497–1505, 2000.

COLLINS, M. D.; FARROW, J. A. E.; JONES, D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 36, p. 8-12, 1986.

COLLINS, M. D.; JONES, D.; FARROW, J. A. E.; KILPPER-BALZ, R.; SCHLEIFER, K. H. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 34, p. 220-223, 1984.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 12(4), p. 564-582, 1999.

CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. et al. **The staphylococci in human disease.** New York: Churchill Livingstone. 2<sup>a</sup> ed. 1997.

CUNHA, B. A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today.** v. 34, p. 691-698, 1998.

DATASUS. Ministério da Saúde, Secretaria Executiva. **Indicadores Básicos de Saúde.** Brasil, IBD-97, 1997. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br/>>. Acessado em 07/12/2009.

DAVIES, J.; WRIGHT, G. D. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. **Trends Microbiol.** v. 5(6), p. 234-40, 1997.

DAVIES, M. G.; HAGEN, P. Systemic inflammatory response syndrome. **Br J Surg.** v. 84, p. 920-35, 1997.

DEIBEL R. H.; SEELEY H. W. Jr. *Streptococcaceae* (p.490-516). In: BUCHANAN, R. E.; GIBBONS, N. E.: manual. [Baltimore]. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. The Williams & Wilkins Co. v. 8, 1974.

DEIBEL, R. H. The group D *streptococci*. **Bacteriol. Rev.** v. 28, p. 330-336, 1964.

DESHPANDE, L. M.; FRITSCH, T. R.; MOET, G. J.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant *enterococci* from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 58, p. 163-170, 2007.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. Methods in plant biochemistry. San Diego: **Academic Press**. v. 6, 1991.

DRAKE, T. A.; PANG, M. *Staphylococcus aureus* induces tissue factor expression in cultured human cardiac valve endothelium. **J Infect Dis**. v. 157, p. 749-56, 1988.

DRASAR, B. S.; HILL, M. J. Human intestinal flora. **Academic Press Ltd**. London, United Kingdom. 1974.

DWORKIN, R. J.; LEE, B. L.; SANDE, M. A.; CHAMBERS, H. F. Treatment of rightsided *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug abusers with ciprofloxacin and rifampicin. **The Lancet**. v. 2, p. 1071-3, 1989.

EL SOLH, A. A.; ALHAJHUSAIN, A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **J Antimicrob Chemother**. v. 64, p. 229-238, 2009.

EROAN, L. J.; PASSOS, S. Early discharge of infected patients through appropriate antibiotic use. **Arch Intern Med**. v. 161, p. 61-65, 2001.

ESCOBAR, A. M. U. et al. Sepsis por *Klebsiella pneumoniae* - Revisão de 28 casos. **J pediatr (Rio J)**. Vol. 72(4), p:230-234, 1996.

EVANS, W. C. **Trease and Evan's Pharmacognosy**. 14<sup>a</sup> ed. London: WB Saunders, 1996.

EWING, W. H. Identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier, Amsterdam. v. 4, p. 536, 1986.

FARMER, I.; KELLY, M. T. Enterobacteriaceae. In: BALOWS, A. et al, **Manual of Clinical Microbiology**. 5<sup>a</sup> ed. Washington. ASM, p:360-66;377-79, 1991.

FACKLAM, R. R.; CAREY R. B. *Streptococci and aerococci*. (p. 154-175) In Lennette, E. H.; Balows, A.; Hausler, W. J. Jr.; Shadomy, H. J. Manual of clinical microbiology. **American Society for Microbiology**. Washington, D.C. 4<sup>a</sup> ed, 1985.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. Enterococcus. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.: manual. [Washington]. **Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology**. 9<sup>a</sup> ed. v. 1, p. 430-442, 2007.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **J. Clin. Microbiol.** v. 27, p. 731-734, 1989.

FACKNATH, S. Control of *Plutella xylostella* and *Crociodolomia binotalis* Through the Combined Effects of *Bacillus thuringiensis* and Botanical Pesticides. AMAS. **Food and Agriculture Research Council**, Réduit, Mauritius. p. 97-92, 1999.

FARROW, J. A. E.; COLLINS, M. D. *Enterococcus hirac*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 35, p. 73-75, 1985.

FARROW, J. A. E.; JONES, D.; PHILLIPS, B. A.; COLLINS, M. D. Taxonomic studies on some group D streptococci. **J. Gen. Microbiol.** v. 129, p. 1423-1432, 1983.

FEINMAN, S. E. Antibiotics in animal feed – Drug resistance revisited. **ASM News**. v.64, p.24-30, 1998.

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.743, 2000.

FONSECA, M. de S. J. G. A. N. da. Estudo ultraestrutural e fisiológico de *C. difficile* efeitos da vancomicina e do metronidazol na morfologia, ultraestrutura e crescimento. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Porto, 1995.

FOSTER, T. J.; HARTFORD, O.; O'DONNELL, D. Host-pathogen protein-protein interactions in *Staphylococcus*. In: MCCRAE, M. A.; SAUNDERS, J. R.; SMYTH, C.J.; STOW, N. D. Molecular aspects of host-pathogen interaction. Cambridge, England: **Cambridge University Press**. p. 67-94, 1997.

FOSTER, T. J.; MCDEVITT, D. Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence. **FEMS Microbiol Lett**. v. 118, p. 199-205, 1994.

FRACASSO, J. F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. v. 29(2), p. 119-127, 2008.

FURTADO, G. H. C. et al. Intravenous polymyxin B for the treatment of nosocomial pneumonia caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Int J Antimicrob Agents**. v. 30(4), p. 315-9, 2007.

FURTADO, G. H. C.; MARTINS S. T.; COUTINHO A. P.; SOARES G. M. M.; WEY S. B.; MEDEIROS E. A. S. Incidência de *Enterococcus* resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil. **Rev. Saúde Pública**. v. 39(1), 2005.

GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. **J Antimicrob Chemother**. v. 52(4), p. 699-702, 2003.

GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. V. 73, p.354-60, 2012.

GARG, S. C.; NAKHARE, S. Studies on the essential oil from the flowers of *Eupatorium triplinerve*. **Índian Perfumer**. v. 37, p. 318-323, 1993.

GAUVIN-BIALECKI, A.; MARODON, C. Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 36, p. 853–858, 2009.

GEISSMAN, T. A. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: FLORKIN, M. e STOTZ, E. H. **Pyrrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents**. Elsevier. New York, N.Y. v. 9, 1963.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores De Influência No Conteúdo De Metabólitos Secundários. **Quim. Nova**. v. 30(2), p. 374-381, 2007.

GOMES, T. A.; RASSI, V.; MAC DONALD, K. L.; RAMOS, S. R.; TRABULSI, L. R.; VIEIRA, M. A. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J Infect Dis**. v. 148, p. 986-97, 1983.

GOMEZ, G. J.; ALEMAN, L. A.; HERNANDEZ, C. J. L. et al. Sepsis at an Internal Medicine Department. **An Med Interna**. Vol 7, p: 28-33, 1990.

GOULD, C. V.; FISHMAN, N. O.; NACHAMKIN, I.; LAUTENBACH, E. Chloramphenicol resistance in vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: impact of prior fluoroquinolona used Infection Control and Hospital Epidemiology. v. 25, p. 138-145, 2004.

GOVERNO DO ESTADO DE MATO GROSSO. O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no Estado de Mato Grosso. 2005. Disponível em: <[http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/diagnostico\\_situacional.pdf](http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/diagnostico_situacional.pdf)>. Acesso em: jun. 2010.

GRAUDAL, H. The classification of motile streptococci within the enterococcus group. **Acta Pathol. Microbiol. Scand**. v. 41, p. 403-410, 1957.

GRIFFITH, D. P.; MUSHER, D. M.; ITIN, C. Urease. The primary cause of infection-induced urinary stones. **Invest Urol.** Vol. 13, p:346–350, 1976.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3. ed. Porto Alegre: FRGS; Florianópolis: UFSC, p.15, 2004.

GUERRANT R. L.; HUGHES, J. M.; LIMA, N. L.; CRANE, J. Diarrhea in developed and developing countries: magnitude, special setting, and etiologies. **Rev Infect Dis.** v. 12, p. 41-50, 1990.

GUPTA, M. et al. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana*. **Fitoterapia.** v. 73, p. 168-170, 2002.

HARBORNE, J. B. Flavonoid profiles in the Compositae. In: HEYWOOD, HARBORNE & TURNER. The Biology and Chemistry of the Compositae. v London, **Academic Press.** v.1, p. 359-84, 1977.

HARTMAN, P. A.; REINBOLD G. W.; SARASWAT D. S. Indicator organisms-a review. I. Taxonomy of the fecal streptococci. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 16, p. 197-221, 1966.

HERNANDEZ, R. N. Susceptibilidad *in vitro* a vancomicina de cepas enterococcus aisladas. **Revista Cubana de Medicina Militar.** 2005. Disponível em: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0138-65572005000400012&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572005000400012&lng=es&nrm=iso&tlng=es)> - Acesso em 05/mar/2010.

HERVAS, J. A. et al. Neonatal sepsis and meningitis in Mallorca. Spain, 1977-1991. **Clin Infect Dis.** Vol 16, p: 719-24, 1996.

HOENIGER, J. F. M. Development of flagella by *Proteus mirabilis*. **J Gen Microbiol.;** v. 40, p.29–42, 1965.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97(7), p.1027-1031, 2002.

HOOPER, D. C. Mechanisms of resistance to fluoroquinolones. **Drug Resistance Updates**. v. 2, p. 38-55, 1999.

HÖRNER, R.; LISCANO, M. G. H.; MARASCHIN, M. M.; SALLA, A.; MENEGHETTI, B.; FORNO, N. F. D.; RIGHI, R. A. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 41(6), p. 391-395, 2005.

IKE, Y.; HASHIMOTO H.; CLEWELL D. B. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. **J. Clin. Microbiol.** v. 25, p. 1524-1528, 1987.

ING, M. B.; BADDOUR, L. M.; BAYER, A. S. Bacteremia and infective endocarditis: pathogenesis, diagnosis, and complications. In: CROSSLEY, K. B.; ARCHER, G. L. *The staphylococci in human disease*. New York: Churchill Livingstone. p. 331-54, 1997.

ITOKAZU, G. S.; QUINN, J. P.; BELL-DIXON, C.; KAHAN, F. M.; WEINSTEIN, R. A. Antimicrobial resistance rates among aerobic gram-negative bacilli recovered from patients in intensive care units: evaluation of a national postmarketing surveillance program. **Clin Infect Dis**. v. 23, p. 779-84, 1996.

JACOBY, G. A.; ARCHER G. L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **New England Journal of Medicine**. v. 324, p. 601-612, 1991.

JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A.; O'BRIEN, T. F.; PINTO, M. E.; JIANG, J. Broad-spectrum transmissible b-lactamases. **N Engl J Med**. v. 319, p. 723-4, 1989.

JELAGER, L.; GURIB-FAKIM, A.; ANDERSEN, A. Antibacterial and antifungal activity of medicinal plants of Mauritius. **Pharmaceutical Biology**. v. 36, p. 153-161, 1998.

JERNIGAN, J. A.; FARR, B. M. Short-course therapy of catheter-related *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Ann Intern Med.** v. 119, p. 304-11, 1993.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of *enterococci*. **Clin Microbiol Rev.** v. 7, p. 62-78, 1994.

JIM, M.; BELAS, R. The genera *Proteus*, *Providencia* and *Morganella*. **Prokaryotes.** V. 6, p.245–269, 2006.

JOHNSON, A. W. B. R. et al. Bacterial etiology of acute lower respiratory infections in pre-school nigerian children and comparative predictive features of bacteraemic and non-bacteraemic illnesses. **J Trop Pediatr.** Vol. 39, p: 97-1067, 1993.

JOHNSON, R. H. *Yersinia* infections. **Curr Sci.** v. 5, p. 654-8, 1992.

JONES, C. H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D. et al. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrob Agents Chemother.** V. 53, p.465-75, 2009.

KANG, H. Y.; JEONG, Y. S.; OH, J. Y.; TAE, S. H.; CHOI, C. H.; MOON, D. C.; LEE, W. K.; LEE, Y. C.; SEOLI, S. Y.; CHO, D. T.; LEE, J. C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. **J.Antimicrob.Chemother.** v. 55, p. 639-644, 2005.

KARCHMER, A. W. *Staphylococcus aureus* and vancomycin: the sequel. **Ann Intern Med.** v. 115, p. 739-41, 1991.

KALLEN, A. J.; HIDRON, A. I.; PATEL, J.; SRINIVASAN, A. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 31, p.528-31, 2010.

KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med.** v. 15, p. 308-20, 2004.

KESSLER, C. M.; NUSSBAUM, E.; TUAZON, C. U. Disseminated intravascular coagulation associated with *Staphylococcus aureus* septicemia is mediated by peptidoglycan-induced platelet aggregation. **J Infect Dis.** v. 164, p. 101-7, 1991.

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C. et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTYC Program Brazil. **Braz J Infect Dis.** v. 9, p. 216-224, 2005.

KITAGAWA, S. M. S.; TOLEDO, M. R. F.; TRABULSI, L. R.; RAMOS, S. R. T. S.; MURAHOVISCH, J.; FAGUNDES-NETO, U. et al. Etiologia da diarréia infecciosa endêmica da criança de baixo nível socioeconômico em São Paulo. **Am J Trop Med Hyg.** v. 35, p. 1013-22, 1986.

KNIGHT, R. G.; SHLAES, D. M. Desoxyribonucleic acid relatedness of *Enterococcus hirae* and "*Streptococcus durans*" homology group II. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 36, p. 111-113, 1986.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KREMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection.** v. 11, p. 315-7, 1983.

KOKATE, C. K.; RAO, R. E.; VARMA, K. C. Pharmacological studies on the essential oil of *Eupatorium triplinerve* Vahl. I. The effects on the central nervous system and antimicrobial activity. **Flavour Industry.** v. 2, p. 177-180, 1971.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR. W.C. Diagnóstico Microbiológico—Texto e atlas colorido. **MEDSI.**, 5 ed. p. 30-31, 2001:  
KOSTER, T. H. The Compositae of the Archipelago in Blumea. v.1(3), p. 351-536, 1935.

KROHN, M. A.; HILLIER, S. L.; BELL, T. A. et al. The eye prophylaxis study group. The bacterial etiology of conjunctivitis in early infancy. **Am J Epidemiology**. Vol 138, p: 326-32, 1993.

KOUTOUBY, A.; HABIBULLA, H. J. Neonatal sepsis in Dubai, United Arab Emirates. **J Trop Pediatr**. Vol 41, p: 177-80, 1995.

LACEY, R. W. Genetic basis, epidemiology and future significance of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. A review. **Journal of Clinical Pathology**. v. 26, p. 899-913, 1973.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; KOCHAR, S. et al - Evolution and antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **J Antimicrob Chemother**. v. 60, p. 78-82, 2007.

LANGSTON, C. W.; GUTIERREZ, J.; BOUMA, C. Motile *enterococci* (*Streptococcus faecium* var. *mobilis* var. *N.*) isolated from grass silage. **J. Bacteriol**. v. 80, p. 714-718, 1960.

LAUTENBACH, E.; BALDUS, J. P.; BILKER, W. B.; EDELSTEIN, P. H.; FISHMAN, N. O. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors for Infection and Impact of Resistance on Outcomes. **Clinical Infectious Diseases**. v. 32(8), p. 1162-1171, 2001.

LECLERCQ, R.; DUTKA, M. S.; BRISSON, N. A. Resistance of *enterococci* aminoglycosides and glycopeptides. **Clinical Infectious Diseases**. v. 15, p. 495-501, 1992.

LEME, I. L.; FERREIRA, A. J. P. *Enterococcias* In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-Imunes**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.132-146, 2001.

LEPPER, P. M.; GRUSA, E.; REICHL, H. et al - Consumption of imipenem correlates with  $\beta$ -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 46, p. 2920-2925, 2002.

LESSNAU, Klaus-Dieter.; BRONZE, M. S. *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Jan 11, 2012 Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/226748-overview#showall>> . Acessado em: 23/03/2012.

LEVIN, A. S. et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Clin Infect Dis.** v. 28(5), p. 1008-11, 1999.

LEVINE, D. P.; FROMM, B. S.; REDDY, B. R. Slow response to vancomycin or vancomycin plus rifampin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. **Ann Intern Med.** v. 115, p. 674-80, 1991.

LEVINE, M. M.; EDELMAN, R. Enteropathogenic *Escherichia coli* of serotypes associated with infant diarrhea. Epidemiology and Pathogenesis. **Epidemiol Rev.** v. 8, p. 31-61, 1984.

LEVY, S. B. Microbial resistance to antibiotics. **The Lancet.** v. 2, p. 83-88, 1982.

LI, Xz.; ZHANG, L.; POOLE.; K. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother.** v. 45, p. 433-436, 2000.

LINCOPAN, N. et al. First isolation of metallo- $\beta$ -lactamase producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J Clin Microbiol.** v. 43(1), p. 516-9, 2005.

LIVERMORE, D. M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. **Clin Infect Dis.** v. 36(1), p. S11-23, 2003.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clin Infect Dis.** v. 34(5), p. 634-640, 2002.

LLOP, J. M.; LORENTEL, L.; AVERANY, C. et al. The bacteriological control of TPN mixtures at the Hospital de Bellvitge. **Nutr Hosp.** Vol 4, p: 267-71, 1989.

LOPEZ, H. V. O tratamento das infecções graves por *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev Panam Infectol.** v. 11(3), p. 74-76, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odesa - SP: Instituto Plantarum, 2002.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. Review Articles. **The New England Journal of Medicine.** v. 20, 1998.

MAGALHAES, V.; LINS, A. K.; MAGALHAES, M. Mettalo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Braz J Microbiol.** v. 36, p. 123-125, 2005.

MALHEIROS, F. F.; LOPES, T. R. M. **Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antimicrobiana da Espécie *Eupatorium ayapana* Vent.** Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal do Pará, 2010.

MARIN, M. E.; MERA, J. R.; ARDUINO, R. C.; CORREA, A. P.; COQUE, T. M.; STAMBOULIAN, D. First report of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* isolated in Argentina. **Clinical Infectious Diseases.** v. 26(1), p. 235-236, 1998.

MARQUES, F. C. Boletim da Associação Catarinense de Plantas Mediciniais. **Fito 2000.** Lima/ Peru. n.2, 2001.

MARRACK, P.; KAPPLER, J. The *staphylococcal* enterotoxins and their relatives. **Science.** v. 248, p. 1066, 1990.

MARTIN, K. P. Rapid axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting of *Eupatorium triplinerve*. **Biologia Plantarum.** v. 47(4), p. 589-591, 2004.

MCDONALD, S. Transduction of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Lancet.** v. 2, p. 1107, 1966.

MCGOWAN, J. E. Jr. - Resistance in non-fermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Am J Infect Control**. v. 34, p. 29-S37, 2006.

MCNAMARA, E. B.; KING, E. M.; SMYTH, E. G. A survey of antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterococcus* spp. from Irish hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 35(1), p. 185-189, 1995.

MEYER, K. S.; URBAN, C.; EAGEN, J. A.; BERGER, B. J.; RAHAL, J. J. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. **Ann Intern Med**. v. 119, p. 353-8, 1993.

MICHEL, M.; GUTMANN, L. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *enterococci*: therapeutic realities and possibilities. **The Lancet**. v. 349, p. 1901-6, 1997.

MILLER, M. H.; WEXLER, M. A.; STEIGBIGEL, N. H. Single and combination antibiotic therapy of *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: emergence of gentamicin-resistant mutants. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 14, p. 336-43, 1978.

MINISTÉRIO do meio ambiente. **Riqueza de espécies**. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/chm/biodv/brasil.html>>. Acesso em jun. 2010.

MOELLERING, R. C. J. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. **Clinical Infectious Disease**. v. 14, p. 1173-1178, 1992.

MONTGOMERY. H. B. The Madras Quarterly Journal of Medical Science. v. 4, p. 7, 1862.

MORENO, M. T.; VARGAS, S.; POVEDA, R. et al. Neonatal sepsis and meningitis in a developing latin american country. **Pediatr Infect Dis J**. Vol 13, p: 516-20, 1994.

MORRIS, N. S.; STICKLER, D. J. Encrustation of indwelling urethral catheters by *Proteus mirabilis* biofilms growing in human urine. **J Hosp Infect**. Vol. 39, p:227-234, 1998.

MOURA, L. B. de; FERNANDES, M. G. A Incidência de Infecções Urinárias Causadas por *E. coli*. **Revista Olhar Científico**. Faculdades Associadas de Ariquemes. v. 1(2), 2010.

MUNDT, J. O.; GRAHAM, W. F. *Streptococcus faecium* var. *casseliflavus* nov. var. **J. Bacteriol.** v. 95, p. 2005-2009, 1968.

MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 3(1), p. 46, 1990.

MURRAY, P. R. **Microbiologia Médica**. 4ª ed. Elsevier, 2004.

NATARAJAN, R. K.; NATARAJAN, M. Phytochemical investigation of *Eupatorium ayapana*. **Journal of Research in Indian Medicine, Yoga and Homeopathy**. v. 14, p. 155–156, 1979.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Ver.** v. 11, p. 142-201, 1998.

NAUMOVSKI, L.; QUINN, J. P.; MIYASHIRO, D. et al. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended spectrum  $\beta$ -lactamase in isolates from cancer patients. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 36, p. 1991–6, 1992.

NCCLS- National Committee for Laboratory Standards. **Norma M27-A2**. v. 22, nº 15. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição.

NCCLS- National Committee for Laboratory Standards. **Norma M7-A6**. v. 23. nº 2. Metodologia dos testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de crescimento Aeróbico. 2003.

NEIDHARDT, F. C. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. 1987 In: ARTENCIO, J. O. **Perfil de Resistência a antimicrobianos de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária isoladas no Estado do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) -UFRGS. Porto Alegre, 2007.

NEU, H. The crisis in antibiotic resistance. **Science**. v. 257, p. 1064-1073, 1992.

NEVES, P. R. et al. Multirresistência mediada por metalo- $\beta$ -lactamases, porinas, bombas de efluxo e metilases, em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz J Infec Dis**. v. 12, p. 30, 2008.

NEVES, P. R. Alterações da permeabilidade e expressão de bombas de efluxo em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2010.

NEVES, P. R.; MAMIZUKA, E. M.; LEVY, C. E.; LINCOPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**. v. 47(4), p. 409-420, 2011.

NICOLETTI, G.; SCHITO, G.; FADDA, G. et al - Bacterial isolates from severe infections and their antibiotic susceptibility patterns in Italy: a nationwide study in the hospital setting. **J Chemother**. v. 18, p. 589-602, 2006.

NICHOLSON, E. B.; CONCAUGH, E. A.; MOBLEY, H. L. *Proteus mirabilis* urease: use of a ureA-lacZ fusion demonstrates that induction is highly specific for urea. **Infect Immun**. Vol. 59, p:3360–3365, 1991.

NOBLE, W. C.; VALKENBURG, H. A.; WOLTERS, C. H. L. Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. **J Hyg (Lond)**. v. 65, p. 567-73, 1967.

NOVICK R. Plasmids. **Scientific American**. v. 24, p. 77-90, 1980.

NOWLAN, S. S.; DEIBEL, R. H. Group Q streptococci. I. Ecology, serology, physiology, and relationship to established enterococci. **J. Bacteriol**. v. 94, p. 291-296, 1967.

OGSTON, A. Classics in infectious diseases: “On abscesses”. **J Infect Dis**. v. 6, p. 22-8, 1984.

OGSTON, A. Micrococcus poisoning. **J Anat**. v. 17, p. 24-58, 1882.

OLIVEIRA, M. S. et al. Polymyxin B and colistimethate are comparable as to efficacy and renal toxicity. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 65(4), p. 431-4, 2009.

ORLA-JENSEN, S. The lactic acid bacteria. **Mem. Acad. R. Soc. Danemark Sect. Sci. Ser.** v. 85, p. 81-197, 1919.

ORSKOV, K.; ORSKOV, I. Serotyping of *Escherichia coli*: Methods in Microbiology. **Academic Press.** v. 14, p. 43–122, 1984.

PALAVECINO, R.; E. Puesta al día en *enterococos*: Identificação de especies y estudio de susceptibilidad antimicrobiana. **Revista Chilena de Infectología.** v. 18(2), p. 95-100, 2001.

PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, S. H.; GÓRNIAC, S. L. Farmacologia Aplicada à Avicultura. São Paulo, 2005.

PATEL, J. B.; RASHEED, J. K.; BRANDON, K. M. S. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology and laboratory detection. **Clin Microb News.** V. 31, p. 55-62, 2009.

PATERSON, L. D. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine.** v. 119, p. 520-528, 2006.

PATTI, J. M.; ALLEN, B. L.; MCGAVIN, M. J.; HÖÖK, M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Ann Rev Microbiol.** v. 48, p. 585-617, 1994.

PELLEGRINO, F. L.; TEIXEIRA, L. M.; CARVALHO, et al - Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol.** v. 40, p. 2420-2424, 2002.

PENA, C.; PUJOL, M.; ARDANUY, C. et al. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 42, p. 53–8, 1998.

PIROTH, L.; AUBE, H.; DOISE, J. M.; VINCENT-MARTIN, M. Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: are  $\beta$ -lactamase inhibitors of therapeutic value? **Clin Infect Dis.** v. 27, p. 76–80, 1998.

POIREL, L. et al. Carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. **Emerg Infect Dis.** v. 6(1), p. 84-5, 2000.

POLLACK, M. *Pseudomonas Aeruginosa*. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases.** 5<sup>a</sup> ed. New York, NY: Churchill Livingstone. p. 2310-27, 2000.

QUADROS, A. U. de; PEREIRA, P. A. T.; BINI, D.; MORONI, E. G.; MONTEIRO, M. C. Antifungal activity of some cyclooxygenase inhibitors on *Candida albicans*: PGE2-dependent mechanism. **Folia Microbiol.** v. 56, p. 349–352, 2011.

QUINN, J. P.; MIYASHIRO, D.; SAHM, D.; FLAMM, R.; BUSH, K. Novel plasmid mediated  $\beta$ -lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 33, p. 1451–6, 1989.

QUIÑONES, D.; GOÑI, P.; RUBIO, M.C.; DURAN, E.; GÓMEZ-LUZ, R. *Enterococci* spp. isolated from Cuba: species frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 51, p. 63-67, 2005.

RAHMAN M.D. S.; JUNAID, M. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Eupatorium triplinerve* Vahl. Against some human pathogenic bacteria and phytopathogenic fungi. **Bangladesh J. Bot.** v. 37(1), p.89-92, 2008.

RAJA, N. S.; SINGH, N. N. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. **J Microbiol Immunol Infect.** v. 40, p. 45-49, 2007.

RICE, L. B.; ECKSTEIN, E. C.; DEVENTE, J.; SHLAES, D. M. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center. **Clin Infect Dis.** v. 23, p. 118–24, 1996.

RICE, L. B.; WILLEY, S. H.; PAPANICOLAOU, G. A. et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 34, p. 2200–9, 1990.

RÓZALSKI, A.; SIDORCZYK, Z.; KOTELKO, K. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. **Microbiol Mol Biol Rev.** v. 61, p.65-89, 1997.

RUPP, M. E.; FEY, P. D. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs.** v. 63(4), p. 353-65, 2003.

RUSHFORTH, J. A.; HOY, C. M.; KITE, P. et al. Rapid diagnosis of control venous catheter sepsis. **LancetI.** Vol 342, p: 402-3, 1993.

SACRAMENTO, H. T. Legislação para produção, comercialização e uso de plantas medicinais. In: **Jornada Paulista De Plantas Mediciniais.** UNESP: Botucatu. v. 5, p. 33, 2001.

SADER, H. S. et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- $\beta$ -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbiol Infect.** v. 11(1), p. 73-6, 2005.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis.** v. 5, p. 200-214, 2001.

SADER, H. S.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V.; GALES, A. C.; WINOKUR, P. L.; KUGLER, K. C. Bacterial Pathogens Isolated from Patients with Bloodstream Infections in Latin America, 1997: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Infarma, v.15, nº 11-12, Susceptibility Patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis.** v. 3(3), p. 97-110, 1999.

SAFDAR, N.; HANDELSMAN, J.; MAKI, D. G. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteremia? A meta-analysis. **Lancet Infect Dis.** v. 4, p. 519-527, 2004.

SANDRI, A. M. *Enterococcus* spp. resistente à vancomicina: tipagem molecular, caracterização clínica e associação com mortalidade. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Programa de Pós-Graduação em Medicina, Porto Alegre: UFRGS, 2004.

SANTUCCI, S. G.; GOBARA, S.; SANTOS, C. R.; FONTANA, C.; LEVIN, A. S. Infections in a burn intensive care unit: experience of seven years. **Journal of Hospital Infection.** v. 53, p. 6-13, 2003.

SAUNDERS, J. R. Genetics and evolution of antibiotic resistance. **British Medical Bulletin.** v. 40, p. 54-60, 1984.

SCALETSKY, I. C. A.; PEDROSO, M. Z.; OLIVA, C.A. G.; CARVALHO, R. L. B.; MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect Immun.** v. 67, p. 3410-5, 1999.

SCHIAPPA, D. A.; HAYDEN, M. K.; MATUSHEK, M. G. et al. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: a case-control and molecular epidemiologic investigation. **J Infect Dis.** v. 174, p. 529–36, 1996.

SCHLEIFER, K. H. Gram-positive cocci (p. 999-1103). In SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. manual: [Baltimore]. **Bergey's manual of systematic bacteriology.** TheWilliams & Wilkins Co. v. 2, 1984.

SCHLEIFER, K. H., KILPPER-BALZ R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 34, p. 31-34, 1984.

SCHULTES, R. E. The Kingdom of plants (p. 208). In THOMSON, W. A. R. Medicines from the Earth. **McGraw-Hill Book Co.** New York, N.Y, 1978.

SCHWALBE, R. S.; STAPLETON, J. T.; GILLIGAN, P. H. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative *staphylococci*. **N Engl J Med**. v. 316, p.927-31, 1987.

SEDGLEY, C. M.; NAGEL, A. C.; SHELBURNE, C. E.; CLEWELL, D. B.; APPELBE, O.; MOLANDER, A. Quantative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. **Arch Oral Biol**. v. 50, p. 575-83, 2005.

SHARMA, R. K.; DESAI, R.; WAISMAN, D. M.; WANG, J. H. Purification and subunit structure of bovine brain modulator protein. **J. Biol. Chem**. v. 254, p. 4276-4282, 1979.

SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S. Antibiotic-resistant *enterococci*: mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes and Infection**. v. 4, p. 215-224, 2002.

SHERMAN, J. M. The *streptococci*. **Bacteriol. Rev**. v. 1, p. 3-97, 1937.

SILVA, D. S.; AZEVEDO, D. M. de. Opinion of physicians and nurses about the use of phytotherapy and medicinal plants in Primary Care. *Journal of Nursing UFPE on line*. Vol. 6, No 5, 2012.

SILVA, M. T. The use of transmission electron microscopy of ultrathin sections for the characterization of the ultrastructure of normal and damage bacterial membranes. In: GUERRA, F. C. & BURTON, R. M. *Biomembranes: Dynamics and Biology*. **Plenum Press**. New York. p. 1-36, 1984.

SILVA, N. C. C. Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências - Campus de Botucatu, UNESP, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2001.

\_\_\_\_\_. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 1999.

SIROT, D.; SIROT, J.; LABIA, R.; et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel  $\beta$ -lactamase. **J Antimicrob Chemothe.** v. 20, p. 323–34, 1987.

SOLER, O. **Biodiversidade, bioeconomia & fitoterapia.** Tese (Doutorado em Ciências Socioambientais no Programa de Desenvolvimento do Trópico Úmido – PDTU. Núcleo de Altos Estudos da Amazônia – NAEA) – Faculdade de Economia, Universidade Federal do Pará. p. 32, 2000.

SPÄTH, E.; BOSE, P. K.; SCHLÄGER, J. Konstitution und synthese von Ayapin (XXVI. Mitteil. über naturliche Cumarine). **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft Abteilung A Vereins-Nachrichten.** v. 70, p. 702, 1937.

STICKLER, et al. Observations on the adherence of *Proteus mirabilis* onto polymer surfaces. **J Appl Microbiol.** Vol. 100, p:1028–1033, 2006.

SUASSUNA, I. Noções gerais e incidência da resistência bacteriana. In: GOMES, A. J. **Simpósio Internacional sobre Resistência Bacteriana e Infecções Mistas.** São Paulo, 1982. Anais. São Paulo, Unipress, 1983.

SÜLSEN, V. et al. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. **Parasitol. Res.** v. 98, p. 370-374, 2006.

SWADDIWUDHIPONG, W.; TANGKITCHOT, T.; SILARUG, N. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* postoperative endophthalmitis caused by contaminated intraocular irrigating solution. **Transr Soc Trop Med Hyg.** v. 89(3), p. 288-89,1995.

SWARTZ, M. N. Use of antimicrobial agents and drug resistance. **New England Journal of Medicine.** v. 337, p. 491- 492, 1997.

TADEU, A. F.; FERNANDES, M. L. V.; RIBEIRO, N. F. **Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde.** São Paulo: Atheneu. v. 2, 2000.

TAYLOR, L. **Technical Data Report for Ayapana** (*Ayapana triplinervis*). 2006.

TESS, B. H.; GLENISTER, H. M.; RODRIGUES, L. C.; et al. Incidence of hospital-acquired infection and length of hospital stay. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 12(12), p.81-96, 1993.

THIERCELIN, M. E. Sur un diplocoque saprophyte del'intestin susceptible de devenir pathogen. **C. R. Soc. Biol.** v. 5, p. 269-271, 1899.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia.** 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R. Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. **Revista de Microbiologia.** São Paulo. (supl. espec.) p.1-30, 1973.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

\_\_\_\_\_. **Microbiologia.** 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRANG, N. T. D. et al. Thymoquinone from Eupatorium ayapana. *Planta Medica.* v. 59, p.99, 1993a.

\_\_\_\_\_. Constituents of Eupatorium ayapana Vent. in Vietnam. *Proceedings of the National Centre for Scientific Research of Vietnam.* v. 5, p.43–47, 1993b.

\_\_\_\_\_. J. The 13 C-NMR spectroscopy of ayapin isolated from Eupatorium ayapana Vent. from Vietnam. **Tap Chi Hó a Hoc, Journal of Chemistry.** v. 30, p. 62-63, 1992.

TRUCKSIS, M.; HOOPER, D. C.; WOLFSON, J. S. Emerging resistance to fluoroquinolones in *staphylococci*: an alert. **Ann Intern Med.** v. 114, p. 424-6, 1991.

VAN ELDERE, J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. **J Antimicrob Chemother.** v.51, p. 347-352, 2003.

VERPOORTER, R.; DIHAL, P. P. Medicinal plants of Surinam IV. Antimicrobial activity of some medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 21, p. 315-318, 1987.

VICTORA, C. G.; FUCHS, S. C. Breast-feeding, nutritional status, and other prognostic factors for dehydration among young children with diarrhoea in Brazil. **Bull Wld Hlth Organ.** v.70, p. 467-75, 1992.

WALDVOGEL, F. A. *Staphylococcus aureus* (including toxic shock syndrome). In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases.** 4<sup>a</sup> ed. New York: Churchill Livingstone. v. 2, p.1754-77, 1995.

WARREN, J. W.; DAMRON, D.; TENNEY, J. H. et al. Fever, bacteremia and death as complications of bacteriuria in women with long-term urethral catheters. **J Infect Dis.** V. 155, p.1151-8, 1987.

WARREN, J. W.; TENNEY, J. H.; HOOPES, J. M. et al. A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. **J Infect Dis;** v. 146, p.719-23, 1982.

WILLIAMS, G. J.; STICKLER, D. J. Some observations on the migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over foley catheters. **Infect Control Hosp Epidemiol.** Vol. 29, p:443–445, 2008.

WILSON, W. R.; KARCHMER, A. W.; DAJANI, A. S.; et al. Antibiotic treatment of adults with infective endocarditis due to *streptococci*, *enterococci*, *staphylococci*, and HACEK microorganisms. **JAMA.** v. 274, p. 1706-13, 1995.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science.** v. 279, p. 996-997, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance.** Bulletin of World Health Organization. v.61, p. 383-394, 1983.

\_\_\_\_\_. **Traditional medicine strategy.** Geneve. p. 65, 2002.

ZARRILI, R.; TRIPODI, M. F.; PODOLO, A. D.; FORTUNATO, R.; BAGATTINI, M.; CRISPINO, M.; FLORIO, A.; TRIASSI, M.; UTILI, R. Molecular epidemiology of high-level aminoglycoside-resistant *enterococci* isolated from patients in a university hospital in southern Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 827-835, 2005.

ZULIANI, M. E.; TRABULSI, L. R. Resistência microbiana a drogas. **Ars Curandi**. v. 5, p. 50-72, 1972.