



Universidade de Brasília

**FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
DE IPÊ ROXO (*HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS*) EM
Staphylococcus aureus e *Pseudomonas aeruginosa*.**

JÉSSICA ALVES DE SOUSA

**BRASÍLIA
2017**

JÉSSICA ALVES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
DE IPÊ ROXO (*HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS*) EM
Staphylococcus aureus e *Pseudomonas aeruginosa*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues
da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Oliveira Freire

**BRASÍLIA
2017**

JÉSSICA ALVES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE IPÊ
ROXO (*HANDROANTHUS IMPETIGINOSUS*) EM *Staphylococcus aureus* e
Pseudomonas aeruginosa.**

Este trabalho foi julgado e aprovado para obtenção do grau de Bacharel, no
Curso de Farmácia, da Faculdade de Ceilândia.

Brasília, 03 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Calliandra Maria de
Sousa Silva

Prof^a. Dra. Vivian Taís Fernandes
Cipriano

Profa. Dra. Izabel Cristina da Silva
Universidade de Brasília
Orientadora

Prof. Dr. Daniel Oliveira Freire
Faculdade LS
Co-orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me conduzido até aqui, por ter cuidado de mim em cada momento da minha graduação até a realização deste trabalho e por ter me sustentado em seus braços em cada momento de medo e dificuldade.

Aos meus pais Roseno e Socorro por todo amor, carinho e compreensão dispensados e principalmente por sempre acreditarem em mim. Eu os amo muito.

Aos meus familiares, principalmente meu irmão Alex, pela parceria de idas e vindas às aulas diariamente e por toda as vezes que me ajudou dentro e fora da Universidade quando eu mais precisei.

Ao meu namorado Sergio, por todo amor, compreensão nos momentos de ausência e principalmente paciência e companheirismo diário. Obrigada por sempre me acalmar e me ajudar nos momentos de dificuldade.

As minhas amigas companheiras, Amanda, Julyanna e Verônica que caminharam comigo durante toda a graduação. Obrigada pelas vivências partilhadas e amizade sincera ao longo destes anos. A caminhada certamente teria sido mais difícil sem vocês por perto.

A minha orientadora, professora Izabel Cristina por toda paciência, cuidado, compreensão, amizade, incentivo e valiosas contribuições.

Ao meu co-orientador, professor Daniel pela paciência e disponibilidade em me ajudar.

Sou grata a Universidade de Brasília, campus Fce e a todos os mestres da graduação que contribuíram para a minha formação como profissional.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis." (José de Alencar)

RESUMO

Introdução: A importância de se pesquisar por novos agentes antimicrobianos se dá devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, logo, o estudo de novos agentes é de grande importância no setor farmacêutico. A partir do extrato de certos vegetais, é possível obter compostos capazes de atuar de maneira a reduzir o crescimento de certos microrganismos. A entrecasca do ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*) é utilizada em preparações medicinais de uso popular. **Objetivo:** Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato de Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Métodos:** A verificação da ação antimicrobiana do extrato de *Handroanthus impetiginosus* contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foi realizada com a técnica de microdiluição das amostras em placas de 96 poços, submetendo o microrganismo a ação do extrato em estudo, em diferentes concentrações e por diferentes métodos extrativos (hidroalcolico, ultrassom e maceração), determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os cálculos de IC₅₀ foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. **Resultados:** Notou-se que concentrações muito altas de extrato, acabam resultando em um CIM muito maior, quando comparado com uma concentração menor de extrato. Os resultados de CIM das atividades antibacterianas mostram que o extrato é capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados, sendo que o extrato na concentração de 4 mg/mL pelo método de maceração, apresentou o melhor resultado para *Staphylococcus aureus*, com CIM de 0,13 mg/mL, **enquanto que para *Pseudomonas aeruginosa* o valor de CIM de 0,23 mg/mL.** **Conclusão:** O extrato de Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) possui ação microbiana distinta frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, sob diferentes métodos extrativos e sob diferentes concentrações.

Palavras Chaves: Ipê roxo. *Staphylococcus aureus*. *Pseudomonas aeruginosa*. Microdiluição. CIM.

ABSTRACT

Introduction: The study of new antimicrobial agents is of great importance in the pharmaceutical sector; this is due to the emergency of resistant microorganisms and the increase of fatal opportunist infection. From the extract of certain plants, it is possible to obtain compounds capable of acting in a manner to reduce the growth of certain microorganisms. The bundle of purple ipe (*Handroanthus impetiginosus*) is used in medicinal preparations of popular use. **Objective:** To evaluate the in vitro antibacterial activity of the Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) extract against the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. **Methods:** The antimicrobial activity of *Handroanthus impetiginosus* extract against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was performed With the technique of microdilution of the samples in 96-well plates, subjecting the microorganism to the action of the extract obtain under different extractive methods, and different concentrations, to determinine the Minimum Inhibitory Concentration (CIM). IC50 calculations were performed by setting method for sigmoidal dose-response curve. **Results:** It was noticed that very high concentrations of extract, result in a much larger CIM when compared to a lower concentration of extract. The CIM results of the antibacterial activities show that the extract is able to inhibit the growth of the microorganisms tested, and the extract at the concentration of 4 mg / mL by the maceration method presented the best result for *Staphylococcus aureus*, CIM of 0, 13 mg/mL, whereas for *Pseudomonas aeruginosa* the CIM value of 0,23 mg/mL. **Conclusion:** The extract of Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) has different microbial action against the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, under different extraction methods and under different concentrations.

Key Words: Bacteria. Purple IPE. Microdilution. Extract. Concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferentes métodos extrativos e diferentes concentrações do extrato de ipê roxo resultam em diferentes CIMs. Em: A) Concentração de 4mg/mL, método hidroalcoólico; B) Concentração de 4mg/mL, método ultrassom; C) Concentração de 4mg/mL, método maceração ; D) Concentração de 32mg/mL, método ultrassom; E) Concentração de 120 mg/mL, método maceração.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima a partir de 4 mg-ml de extrato.	26
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima a partir 4 e 32 mg/mL de extrato pelo método de ultrassom.	27
Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima a partir de 4 e 120 mg/mL de extrato pelo método de maceração.	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a P&D de novos antibióticos..... 14

Quadro 2 - Técnicas utilizadas para o preparo dos extratos de ipê-roxo.....23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CIM – Concentração Inibitória Mínima

MBC – Concentração Bactericida Mínima

MSP – Metabólito Secundário de Planta

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

P & D – Pesquisa e Desenvolvimento

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivos gerais.....	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Obtenção do material vegetal.....	21
4.2	Caracterização do material vegetal	21
4.3	Técnicas extrativas e preparo dos extratos	22
4.4	Avaliação da atividade antimicrobiana	23
5	RESULTADOS.....	26
6	DISCUSSÃO	30
7	CONCLUSÃO	34
8	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Os antimicrobianos são fármacos que podem inibir o crescimento ou podem causar a morte de microrganismos. É considerada uma das classes de fármacos mais utilizadas em ambiente hospitalar, sendo também os mais prescritos em nível ambulatorial. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Diretriz Nacional para o Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. 2016. 8p.).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) “o uso racional de antimicrobianos consiste na administração em doses adequadas do fármaco, pelo período adequado e com um menor custo para o usuário. ” Sendo assim, o uso inadequado desses fármacos como, posologia incorreta, abandono da terapia e uso por período contrário ao determinado, são fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento da resistência bacteriana, aumento dos custos nos serviços de saúde e riscos de reações adversas à medicamentos. (MENDONÇA, A. et al., 2009).

Os antibacterianos são amplamente utilizados na clínica e o uso indiscriminado destes fármacos contribui com o aumento progressivo da resistência bacteriana. A resistência aos antibacterianos é um sério problema do ponto de vista clínico e de saúde pública (MOTA, R. et al., 2005).

Em fevereiro de 2017 a OMS divulgou uma lista de bactérias para as quais se necessitam de novos antibióticos. Essa lista consiste de famílias de bactérias que representam ameaça à saúde humana. Em especial, destaca-se as bactérias gram negativas resistentes à múltiplos antibióticos. A lista da OMS é dividida em três categorias de acordo com a urgência em que se necessitam de novos antibióticos: prioridade crítica, alta ou média.

Segundo a Organização Pan Americana de Saúde (2017), o grupo mais crítico de todos inclui bactérias multirresistentes, que são particularmente perigosas em hospitais, casas de repouso e entre os pacientes cujos cuidados exigem dispositivos como respiradores em ventilação mecânica e cateteres intravenosos. Entre elas, estão *Acinetobacter*, *Pseudomonas aeruginosa* e várias *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella Pneumoniae*, *E. coli*, *Serratia* e *Proteus*

sp). São bactérias que podem causar infecções graves e frequentemente mortais, como infecções da corrente sanguínea e pneumonia.

O quadro 1 traz as bactérias que são resistentes à certos antimicrobianos, de acordo com seu nível de prioridade para o desenvolvimento de novos antibióticos. Prioridade 1 estão classificadas como “críticas”, prioridade 2 estão classificadas como “alta” e prioridade 3 estão classificadas como prioridade “média”.

Quadro 1 - Lista de agentes patogênicos prioritários da OMS para a P&D de novos antibióticos.

Crítica	Alta	Média
<i>Acinetobacter baumannii</i> , resistente a carbapenêmicos.	<i>Helicobacter pylori</i> , resistente à claritromicina.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , sem sensibilidade à penicilina.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , resistente a carbapenêmicos.	<i>Staphylococcus aureus</i> , resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina.	<i>Haemophilus influenzae</i> , resistente à ampicilina.
<i>Enterobacteriaceae</i> , resistente a carbapenêmicos.	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , resistente a cefalosporina, resistente às fluoroquinolonas.	<i>Shigella spp.</i> , resistente às fluoroquinolonas.

Fonte: Organização Pan Americana de Saúde, 2017.

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram negativa, encontrada em diversos ambientes, como solo, água, bem como em ambientes hospitalares. É um patógeno nosocomial freqüente, responsável por infecções em diversos sítios do corpo humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos.

(FUENTEFRIA et al. 2008). Pode causar infecções do Trato Urinário, infecções no Sistema Respiratório, infecções Ósseas e outras. (BUSATO, 2017).

Pseudomonas aeruginosa atualmente está entre as principais bactérias causadoras de infecções hospitalares, perdendo apenas para *Staphylococcus coagulase negativo* e *Staphylococcus aureus*. (SAFDAR, NASIA et al., 2004).

Por sua vez, *Staphylococcus aureus* é uma bactéria gram positiva, encontrada na pele e fossas nasais de seres humanos saudáveis. Pode provocar desde infecções simples a infecções graves, como pneumonia, meningite, endocardite, septicemia e etc. Infecções causadas por esse tipo de patógeno são consideradas de difícil tratamento, uma vez que pode-se necessitar de intervenções cirúrgicas e longos períodos de antibioticoterapia. (DOS SANTOS, A. et al., 2007)

A importância de se pesquisar por novos agentes antimicrobianos, se dá devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais em imunossuprimidos, associadas ao HIV, quimioterapia antineoplásica e transplantes (OSTROSKY, Elissa A. et al. 2008). O estudo de novos agentes antimicrobianos é de grande abrangência, sendo de grande importância no setor farmacêutico.

Nas plantas, o metabolismo é dividido em primário (ou de macromoléculas) e secundário (ou micromoléculas). No primário há um conjunto de processos metabólicos que desempenham funções essenciais, como fotossíntese e respiração. Na atividade metabólica secundária, os vegetais têm capacidade de produzir substâncias utilizadas na defesa contra predação por microrganismos, insetos, herbívoros e outros causadores de estresse. (MOURA, FML. 2013).

De acordo com Caetano e Peixoto Neto, “os metabólitos secundários podem ser divididos em quatro classes: Compostos fenólicos, terpenóides, compostos nitrogenados e cumarinas”. (Caetano LC, Peixoto Neto PAS, 2005). Atualmente, há uma lista abrangente de todos os compostos presentes no metabolismo secundário das plantas – MSP e, alguns destes se originam a partir de diferentes vias biossintéticas. (CAJADO, Aurilene Gomes et al. 2016).

Os metabólitos secundários das plantas podem afetar a célula de várias maneiras. Estas incluem a perturbação da função e estrutura da membrana plasmática, comprometimento da síntese e função dos ácidos nucleicos

(DNA/RNA), indução da coagulação de constituintes citoplasmáticos entre outros. (RADULOVIC, N. S. et al. 2013).

A literatura mostra que o principal alvo dos MSPs é a membrana plasmática podendo afetar a estrutura, integridade, permeabilidade ou a funcionalidade desta de várias maneiras. (FARZANEH, Vahid. 2015).

Os fitoterápicos tem sido o caminho para a busca de novos fármacos com ações antimicrobianas. Segundo a Anvisa (2004), fitoterápico é: "todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais". (VIEIRA, Silvia et al., 2010).

Os fitoterápicos usados com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser reconhecido pela OMS em 1978, quando então recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para seu uso. (DE PLANTAS, Programa de Pesquisas. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. 2006). A busca por opções terapêuticas com baixa toxicidade, mais eficazes contra resistência bacteriana, menos agressivas ao paciente e ao meio ambiente e de baixo custo para o tratamento de certas patologias, vem sendo cada vez mais procurado por especialistas, abrindo assim novos caminhos para a pesquisa.

A biodiversidade brasileira pode ser considerada uma das mais ricas do planeta, uma vez que contém muitas plantas com propriedades antibióticas e outras. Porém a exploração irracional de partes não renováveis dessas plantas, como raiz e caule, pode significar uma séria ameaça às espécies (MELO et al., 2008). Para que houvesse a exploração sustentável dessas plantas, seria necessário que se utilizasse as partes renováveis delas, como por exemplo, folhas e partes dos frutos.

A partir do extrato de certos vegetais, é possível obter compostos capazes de atuar de maneira a reduzir o crescimento de certos microrganismos. O ipê-

roxo (*Handroanthus impetiginosus*), também conhecido como pau d'arco ou lapacho, é uma árvore característica do cerrado brasileiro, bastante utilizada na ornamentação, devido à beleza das suas flores características (SILVA et al., 2012; TJHIO; PESTANA, 2011).

A entrecasca do ipê-roxo é utilizada em preparações medicinais de uso popular. Após serem desfiadas em tiras, as entrecascas são secas e pulverizadas para serem utilizadas no preparo de garrafadas, tinturas, chás e pomadas. As principais indicações apontadas são como tônico, imunostimulante, adaptógeno, no tratamento de inflamações e infecções, câncer de útero e próstata, doenças dermatológicas, doenças no sistema cardiovascular e doenças sexualmente transmissíveis (TEIXEIRA et al., 2014).

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser medida a partir da determinação de uma pequena quantidade da substância, capaz de inibir o crescimento do microrganismo teste. Esse valor é conhecido como CIM (Concentração Inibitória Mínima).

Para verificar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais, são usados vários métodos. Os principais incluem o método de difusão em ágar, método de macrodiluição e o método de microdiluição. Para determinação da CIM de extratos de plantas, tem-se usado um método sensível de microdiluição desenvolvido por Ellof em 1998. (OSTROSKY, Elissa A. et al., 2008).

Algumas variações podem ocorrer na determinação da CMI de extratos vegetais. Tais variações podem ser atribuídas à vários fatores, como por exemplo, a técnica aplicada, o tipo de microrganismo e cepa utilizados, a origem da placa, à época da coleta, se os preparos dos extratos foram feitos a partir de plantas secas ou frescas, bem como a quantidade de extrato utilizado. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (Fennel et al., 2004).

Sendo assim, com o intuito de investigar o potencial antimicrobiano de espécies do cerrado brasileiro, o presente estudo testou o potencial antimicrobiano do extrato de Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) obtido de raizeiros de três locais distintos. Logo, foram analisados os extratos do ipê roxo e sua atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e

Pseudomonas aeruginosa, ambos agentes de alta prevalência na etiologia de processos infecciosos.

2 JUSTIFICATIVA

A resistência bacteriana aos antimicrobianos usados atualmente pode ser vista como uma situação de emergência, sendo assim a busca por novos fármacos antimicrobianos torna-se indispensável. As espécies vegetais presentes no bioma Cerrado, devido à sua composição variada e de seus metabólitos, podem ser vistas como excelentes alvos na busca por atividade biológica e inibição microbiana.

Dessa forma, esse trabalho busca avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de extrato de Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) coletado em várias regiões do Brasil, devido ao fato de apresentar um histórico de uso popular nos processos infecciosos e inflamatórios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato de Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

3.2 Objetivos específicos

- Testar a capacidade antimicrobiana do extrato de *Handroanthus impetiginosus* em diferentes concentrações, pelo método de microdiluição em placa.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima do extrato de *Handroanthus impetiginosus* frente às cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Comparar a eficiência de diferentes métodos extrativos para obtenção de compostos bioativos com efeitos antimicrobianos.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do material vegetal

A droga vegetal do ipê-roxo é constituída pela sua entrecasca seca (DIAS; LAUREANO, 2009). O material foi obtido de três fontes distintas, para posterior comparação dos resultados. Desse modo, as amostras foram adquiridas de raizeiros locais em feiras livres de Brasília (DF), Manaus (AM) e Vitória da Conquista (BA).

4.2 Caracterização do material vegetal

a) Caracterização organoléptica:

Foram observadas as características perceptíveis pelos órgãos do sentido segundo a Farmacopeia Brasileira e de acordo com literatura científica relacionada à identificação botânica (BRASIL, 2010; LOZANO; ZAPATER, 2008; SILVA et al., 2009).

b) Determinação de materiais estranhos:

A amostra da droga vegetal foi homogeneamente espalhada sobre uma superfície plana, seguida da técnica de quarteamento. Com o auxílio de uma pinça, o material estranho foi separado da droga a olho nu e depois com auxílio de lupa. O teor de material estranhos foi calculado de acordo com sua pesagem (BRASIL, 2010).

c) Determinação do teor de água:

A droga vegetal foi reduzida de acordo com os parâmetros estabelecidos na Farmacopeia Brasileira. Foram transferidos cerca de 2 a 5 g de amostra para pesa-filtro tarados, previamente dessecados nas mesmas condições

adotadas para a amostra, durante 30 minutos. A amostra foi dessecada a 100-105°C durante 5 horas, até peso constante. Por fim, foi calculada a porcentagem de água em relação à droga seca ao ar (BRASIL, 2010).

d) Determinação de cinzas totais:

Foram pesados cerca de 3 g da amostra pulverizada. A amostra foi transferida para um cadinho previamente tarado. A amostra foi distribuída uniformemente no cadinho e incinerada a 600°C por 5 horas. Após a amostra ter sido resfriada em um dessecador, foram realizadas as pesagens. A porcentagem de cinzas foi, então, calculada (BRASIL, 2010).

4.3 Técnicas extrativas e preparo dos extratos

O preparo de amostras é uma importante etapa na análise de materiais de plantas, pois é necessário extrair compostos químicos para posterior separação e caracterização (Jacques Rosângela, 2005).

Um extrato de planta pode ser definido como um composto ou mistura de compostos obtidos de plantas frescas ou secas, ou parte das plantas (flores, folhas, semente, raiz e casca), por diferentes métodos de extração. Caracteristicamente, os compostos ativos são obtidos juntamente com outros materiais presentes na massa vegetal (extrato).

A partir da coleta das amostras e tratamento das mesmas, foram preparados extratos aquosos, hidroalcoólicos, utilizando-se a razão de droga vegetal: solvente de 1:20.

Para cada uma das amostras, foram preparados extratos por diferentes técnicas, conforme o quadro 2. O preparo da solução hidroalcoólica foi realizado com alcoômetro, utilizando-se etanol absoluto (J.T.Baker, Brasil). A água utilizada para todas as amostras foi de grau Milli-Q (Millipore, França).

Quadro 2 - Técnicas utilizadas para o preparo dos extratos de ipê-roxo.

Solvente	Técnica extrativa
Água	Maceração
Solução hidroalcolólica 70%	Maceração
Água	Sonicação
Solução hidroalcolólica 70%	Sonicação

Fonte: Autoria própria

A maceração foi realizada por 7 dias, em frascos de vidros vedados e armazenados em temperatura ambiente, protegidos da incidência de radiação.

A sonicação foi realizada com o equipamento Vibra-Cell VC 750 (Sonics, Estados Unidos da América). A extração ocorreu em banho de gelo, utilizando amplitude de 30% por 5 minutos, com intervalos de 30 segundos a cada 30 segundos.

As etapas 4.1 a 4.4 foram executadas com a colaboração da profa. Msc. Tamara Damasceno.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

A verificação da ação antimicrobiana do extrato de *Handroanthus impetiginosus* contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foi realizada com a técnica de microdiluição das amostras em placas de 96 poços, submetendo o microrganismo a ação do extrato em estudo, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Após a quantificação dos produtos extraídos das plantas, foi realizada diluição em água deionizada, formando soluções estoque de cada amostra em suas respectivas concentrações.

As soluções de trabalho foram preparadas a uma concentração de 4 mg/ml, 32mg/ml e 120 mg/ml, com DMSO (Dimetilsulfóxido) a 2,5% e filtrada com filtro de 0,45 µm. Nos três primeiros poços da coluna 1 foram colocadas alíquotas de 200 µl da solução de trabalho. Os poços seguintes da série já continham 100 µl de caldo puro. Foi realizada a diluição seriada transferindo 100 µl dos primeiros poços para os seguintes resultando em uma série de

concentrações. Após a diluição seriada os poços com o teste receberam 80 µl de meio puro, completando o volume para 180 µl por poço e em seguida 20 µl de inóculo, totalizando um volume final de 200 µl por poço.

Na preparação dos inóculos foram usadas as cepas ATCC de bactérias, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As cepas foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ. Os inóculos foram preparados com o crescimento das cepas incubadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por duas horas. A concentração foi ajustada pela turbidez de 0,5 na escala de Mcfarland, prosseguindo com uma diluição de 1:100, apresentando aproximadamente 1×10^6 UFC/ml, conforme orientação da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014), com o auxílio de aparelho espectrofotométrico SP-22.

Foi usado como controle positivo de inibição, o antimicrobiano Meropenem, da classe dos Carbapenêmicos. (Padronizados pelo manual M100S22 CLSI/2014).

Os ensaios foram realizados em microplacas de ELISA, de fundo chato, em triplicata, usando um branco específico para cada diluição, uma vez que a cor do extrato é alterada de acordo com a diluição.

Realizou-se a leitura das placas após a incubação a 36,5°C por 18 horas em estufa bacteriológica, em uma leitora de placas de ELISA da marca Celer, modelo Polaris, com comprimento de onda de 630 nm.

Os dados da leitura de absorbância obtidos, foram calculados através da formula seguinte, indicando a porcentagem e inibição alcançada:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(DO \text{ obtida} - DO \text{ contr. Negativo})}{(DO \text{ contr. positivo} - DO \text{ contr. negativo})} \times 100$$

4.5 Análise estatística

Foram executadas a análise da repetibilidade dos dados pelo calculo do Intervalo de Correlação Intraclasse a 95% e cálculos de IC 50 foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. Os

programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0 e o GraphPad prism versão 7.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

A atividade antimicrobiana do extrato de *Handroanthus impetiginosus* foi avaliada como mostram as tabelas 1,2 e 3. Com esses resultados foi assim determinado, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente aos microrganismos testados, com os métodos extrativos utilizados.

Conforme indicado na tabela 1, para concentração de extrato de 4 mg/mL percebeu-se que o método por maceração foi mais eficiente, quando comparado aos outros dois métodos extrativos, uma vez que se necessitou de uma quantidade menor de extrato para alcançar a inibição do crescimento dos microrganismos, principalmente em *Staphylococcus aureus*.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima a partir de 4 mg-ml de extrato.

	Hidroalcoólico mg /mL		Ultrassom mg /mL		Maceração mg /mL	
	Staphylococcus aureus	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus	Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus aureus	Pseudomonas aeruginosa
IC 50 (CIM)	2,83	1,11	1,70	2,35	0,13	0,23
IC (IC 50)	NA	NA	1,60 a 1,80	1,81 a 3,06	NA	NA
IC 99,9 (MBC)	2827,17	1108,89	1698,3	2347,65	129,87	229, 77

NA: Não se aplica.

Fonte: Autoria própria.

Quando analisado o método de extração hidroalcoólico, percebeu-se que houve uma melhor inibição para *Pseudomonas aeruginosa*, do que para *Staphylococcus aureus*, resultado este, que se mostra contrário ao método por maceração e ultrassom.

Com isto foi possível identificar que métodos extrativos diferentes, podem resultar em diferentes ações sobre as cepas ATCC.

Comparando os resultados da concentração de 32 mg/mL com a concentração de 4 mg/mL, percebe-se que nessa última a concentração inibitória mínima para *Staphylococcus aureus* por meio do método de ultrassom, apresentou-se mais satisfatório quando comparado com a concentração de 32 mg/mL. Nota-se que houve uma inversão nesses resultados, ou seja, para o método de ultrassom em uma concentração de 32

mg/mL, a CIM para *Pseudomonas aeruginosa* foi mais efetiva, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima a partir 4 e 32 mg/mL de extrato pelo método de ultrassom.

	ULTRASSOM 4 MG/ML		ULTRASSOM 32 MG/ML	
	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>
IC 50 (CIM)	1,70	2,35	22,63	8,71
IC (IC 50)	1,60 A 1,80	1,81 A 3,06	NA	NA
IC 99,9 (MBC)	1698,3	2347,65	22607,37	8701,29

NA: Não se aplica.

Fonte: Autoria própria.

Ao comparar os resultados de CIM nas concentrações de 120 mg/mL e 4 mg/mL, pelo método de maceração, percebe-se que a CIM para *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 4 mg/mL foi melhor do que na concentração de 120 mg/mL, mostrando que se necessitou de uma concentração menor de extrato para alcançar a inibição do crescimento do microrganismo.

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima a partir de 4 e 120 mg/mL de extrato pelo método de maceração.

	MACERAÇÃO 4 MG/ML		MACERAÇÃO 120 MG/ML	
	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>
IC 50 (CIM)	0,13	0,23	38,03	8,56
IC (IC 50)	NA	NA	1,39 A 1,78	NA
IC 99,9 (MBC)	129,87	229,77	37991,97	8557,43

NA: Não se aplica.

Fonte: Autoria Própria

Nota-se que concentrações muito altas de extrato, acabam resultando em um CIM muito maior, quando comparado com uma concentração menor de extrato, como por exemplo, no caso da concentração de 4 mg/mL. Ou seja, concentrações muito altas não trazem bons resultados experimentais, uma vez que na concentração de 4 mg/mL foi possível obter um CIM muito mais baixo quando comparado às outras concentrações.

A partir da leitura espectrofotométrica foi possível calcular a porcentagem de inibição do crescimento dos microrganismos. A figura 1 descreve os resultados da inibição de crescimento microbiano nas concentrações de 4

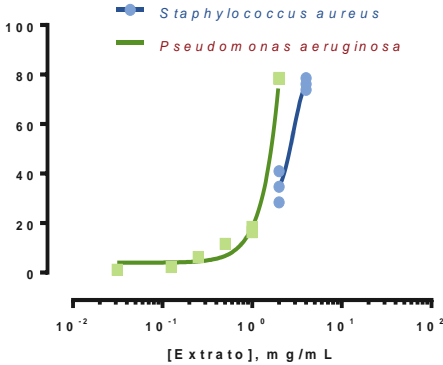
mg/mL, 32 mg/mL e 120 mg/mL respectivamente com os métodos extrativos utilizados.

Os resultados de CIM das atividades antibacterianas mostram que o extrato é capaz de inibir o crescimento dos microrganismos testados, sendo que o extrato na concentração de 4 mg/mL pelo método de maceração, apresentou o melhor resultado para *Staphylococcus aureus*, com CIM de 0,13 mg/mL. Porém quando se observa o método de extração hidroalcolico, percebe-se que houve uma inversão nos resultados da CIM, sendo para este caso, mais favorável para *Pseudomonas aeruginosa*.

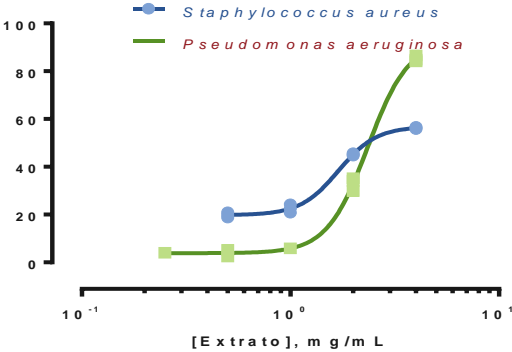
Referente aos resultados obtidos para concentração de 32 mg /mL pelo método de ultrassom, nota-se que a CIM mais desejável foi alcançada em *Pseudomonas aeruginosa*.

O extrato na concentração de 120 mg/mL pelo método de maceração, apresentou um valor de CIM mais favorável em *Pseudomonas aeruginosa* do que em *Staphylococcus aureus*.

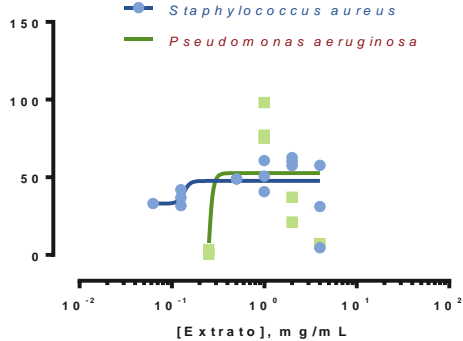
Figura 1 - Diferentes métodos extrativos e diferentes concentrações do extrato de ipê roxo resultam em diferentes CIMs. Em: A) Concentração de 4mg/mL, método hidroalcoólico; B) Concentração de 4mg/mL, método ultrassom; C) Concentração de 4mg/mL, método maceração ; D) Concentração de 32 mg/mL, método ultrassom; E) Concentração de 120 mg/mL, método maceração.



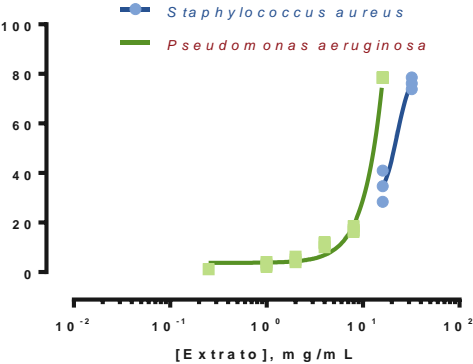
A



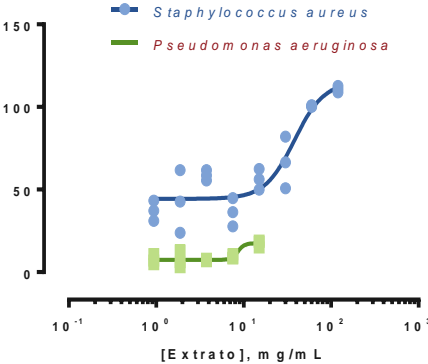
B



C



D



E

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi possível identificar que o extrato obtido da casca do ipê roxo (*Handroanthus impetiginosus*) aparenta ter um potencial antimicrobiano em bactérias gram positivas e gram negativas, e que diferentes processos extrativos possuem eficiências distintas nesta ação.

As plantas apresentam uma enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas, o que justifica o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir destas fontes naturais (ROZATTO, 2012).

Extratos, frações e compostos isolados extraídos destas fontes têm sido estudados por pesquisadores por mostrarem significativas propriedades, entre estas a antimicrobiana (DUARTE et al., 2005; MARTINI et al., 2009; SILVA Jr. et al., 2009; ALBERNAZ et al., 2010; COGO et al., 2010; HÖFLING et al., 2010).

Handroanthus impetiginosus é uma espécie arbórea pertencente à família Bignoniaceae, além de ser muito apreciada para fabricação de móveis e assoalhos finos, possui propriedades farmacológicas com ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e antineoplásica. (LIMA et al., 2014).

Este estudo trouxe como resultado, que o extrato da casca do ipê roxo apresentou atividade tanto para *P. aeruginosa* quanto para *S. aureus*. Porém dentre os métodos de extração analisados, o método de maceração em concentração mais baixa (4mg/mL), foi o que trouxe um melhor resultado, uma vez que o valor da CIM nesse caso para *S. aureus* foi de 0,13 mg/mL e para *P. aeruginosa* foi de 0,23 mg/mL.

Na literatura não há uma classificação consensual sobre os valores de CIM. Aligiannis e colaboradores (2001) apresentaram a seguinte classificação: CIM até 0,5 mg/mL são inibidores potentes; CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1,6 mg/mL são inibidores fracos. Enquanto Webster e colaboradores (2008) propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1000 µg/mL (1mg/mL) ou menos. Seguindo a primeira classificação, o extrato de ipê roxo em uma concentração de 4 mg/mL, obtido pelo método de maceração, pode ser considerado um inibidor potente, uma vez

que apresentou CIM=0,13 mg/mL para *S. aureus* e CIM= 0,23 mg/mL para *P. aeruginosa*.

Uma possível explicação para os efeitos apresentados do extrato sobre as bactérias e em diferentes métodos extrativos seria a disponibilidade (em quantidade) de moléculas com efeitos antimicrobianos nos produtos extrativos.

Por exemplo, o lapachol é um produto natural, quimicamente identificado como uma naftoquinona (um composto orgânico) extraído da casca do Ipê Roxo, uma das árvores mais belas da flora brasileira, com reconhecida ação antiinflamatória, analgésica, antiviral, antifúngica, antioxidante, antibiótica e antineoplásica. (ARAÚJO et al., 2002).

Oswaldo Gonçalves de Lima e colaboradores foram os primeiros a descreverem a atividade antimicrobiana do lapachol frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus flavus*, *B. anthracis*, *B. cereus* e *Escherichia coli*. (FERREIRA et al., 2010).

Segundo ANTUNES e colaboradores (2006) o lapachol e seus análogos possuem atividade para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, o que leva a supor, que esta pode ser a substância bioativa do extrato da casca do ipê roxo frente a essas bactérias.

Somado a isso, Januário e Silvério (2014), indicam que a casca interna do ipê roxo é rica em compostos naturais, como flavonoides. A atividade antibacteriana de flavonoides é comprovada por muitos autores (COWAN, 1999; CUSHNIE et al., 2005; CUSHNIE & LAMB, 2011). Cushnie e Lamb (2011) propõem que esta atividade dos flavonoides está relacionada a danos na membrana citoplasmática (causada por perfuração e/ ou redução da fluidez da membrana), inibição da síntese de ácidos nucleicos (causada pela inibição da topoisomerase) e inibição do metabolismo energético (causada pela inibição da NADHcitocromo C redutase). O efeito inibitório dos flavonoides contra microrganismos pode ser também, da interação deste com a membrana celular dos microrganismos alvo, provavelmente devido à sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares e com a parede celular (COWAN, 1999).

Portanto, extratos brutos de espécies vegetais podem muitas vezes apresentar ação antimicrobiana mais pronunciada (efetiva) contra patógenos devido ao sinergismo entre os constituintes bioativos que são extraídos pelo

solvente ou método de extração empregado, uma vez que substâncias isoladas podem alterar suas propriedades na presença de outras substâncias (Lee & Lee, 2010; DelgadoAdámez et al., 2012).

Desta forma a presença de fitocomplexos em extratos brutos de plantas, pode estar relacionada a ação antimicrobiana uma vez que o sinergismo entre os constituintes, pode demonstrar efetividade maior contra os microrganismos testados se comparados a outros tipos de extratos (Arias et al., 2004; Simões et al., 2004).

Analisando-se os resultados obtidos, nota-se que dependendo do método extrativo utilizado, têm-se uma resposta de CIM diferente. A extração é uma etapa fundamental para obtenção de compostos químicos a partir das plantas ou das suas partes vegetais. A utilização de uma técnica de extração adequada é determinante para separação e/ou purificação, identificação e caracterização de compostos bioativos, e também evita a sua perda ou degradação (Sasidharan, et al., 2011; Dai & Mumper, 2010).

A toxicidade, a volatilidade, viscosidade e pureza do solvente de extração também influenciam a eficiência de extração (Bucar, et al., 2013). A seleção do solvente depende da natureza dos compostos bioativos, sendo os mais usuais, água, os solventes orgânicos e misturas de solventes, entre os quais, metanol, etanol, acetato de etilo, acetona, diclorometano e hexano (Sasidharan, et al., 2011).

Segundo SANTOS, Miriam (2014) a técnica de maceração consiste na imersão do material vegetal num solvente apropriado num recipiente fechado, à temperatura ambiente durante um longo período de tempo. Por se realizar à temperatura ambiente este processo é menos suscetível de provocar a degradação dos metabólitos termolábeis. Porém como uma das desvantagens dessa técnica, têm-se por exemplo, o consumo de grandes volumes de solvente, o que pode originar perda de metabólitos ou material vegetal. Dessa forma, pode-se sugerir que o extrato na concentração de 120 mg/mL obtido por esse método de maceração, tenha sofrido perda do material vegetal, provavelmente devido ao uso de grandes volumes de solvente, de forma que acabou requerendo então uma maior quantidade de composto para alcançar um valor de CIM. Fato este, que se mostra contrário quando analisado o resultado de CIM para concentração de 4 mg/mL.

Percebeu-se que uma concentração muito alta de extrato, acaba resultando em uma CIM muito maior do que quando comparado com uma concentração menor de extrato. Concentrações muito altas não resultaram em bons resultados experimentais, pois obteve-se um valor elevado de CIM. Notou-se que quanto menor a concentração do extrato, mais eficiência é notado no tratamento.

Outra técnica que foi utilizada para extração do composto foi o método por ultrassom. Esse método pode facilitar a hidratação e dilatação do material da planta e pode causar alargamento dos poros da parede celular. Melhora a inchaço e a razão de transferência de massa e, ocasionalmente, quebra a parede celular, resultando no aumento da eficiência de extração e ou redução do tempo de extração. (TOMA, Maricela et al.2001).

Dessa forma, com os resultados obtidos nota-se que com concentração menor de extrato obteve-se uma CIM menor, quando comparada com uma concentração maior do extrato. Este evento pode ser possivelmente explicado pelo fato de que na concentração de 4 mg/mL, a menor de todas avaliadas neste trabalho, mais moléculas de água estariam ligadas ao composto bioativo com ação antimicrobiana; e concentrações maiores do extrato, não teriam moléculas de água disponíveis como ligantes, e assim, os compostos reagiriam entre si formando dímeros ou ligação com outras moléculas, o que reduziria seu efeito, e, portanto, devolveriam CIM maiores.

7 CONCLUSÃO

O extrato de Ipê Roxo (*Handroanthus impetiginosus*) possui ação microbiana distinta frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, sob diferentes métodos extrativos e sob diferentes concentrações.

A concentração de 4 mg/mL do extrato bruto obtido por meio do método de maceração, resultou em menores CIMs, quando comparados ao método hidroalcolico e ultrassom.

Além disto, essa mesma concentração, comparada com concentrações maiores do extrato obtido sob o mesmo método extrativo, resulta também em CIM menor, o que mostra aumento do efeito antimicrobiano em extrato mais diluído, possivelmente permitido pela ligação de moléculas de água com os compostos antimicrobianos, potencializando seu efeito.

Sendo assim, outros estudos deverão ser executados para melhor compreensão do efeito antimicrobiano do extrato de ipê roxo, tanto para o isolamento de moléculas quanto para o mecanismo de ação das mesmas.

8 REFERÊNCIAS

1. ANTUNES, Rossana M. Pessoa et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev. bras. farmacogn.** v. 16, n. 4, p. 517-524, 2006.
2. ARAUJO, Evani L.; ALENCAR, João Rui B.; ROLIM NETO, Pedro J.. **Lapachol**: segurança e eficácia na terapêutica. **Rev. bras. farmacogn.**, v. 12, supl. 1, p. 57-59, 2002.
3. BRASÍLIA – DF. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Diretriz Nacional para o Uso de Antimicrobianos em Serviços de Saúde**. Brasília, 2016. 30p.
4. PEIXOTO NETO, P. A. S.; CAETANO, L. C. Plantas medicinais: do popular ao científico. **Maceió: Edufal**, 2005.
5. CAJADO, Aurilene Gomes et al. Efeito Antimicrobiano In Vitro do Extrato Aquoso e Hidroalcoólico das Folhas de *Anacardium occidentale* e *Mangifera indica*. **Journal of Health Sciences**, v. 18, n. 3, p. 177-82, 2016.
6. DAI, Jin; MUMPER, Russell J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.
7. DE PINHO, Lucinéia et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

8. BRASÍLIA (DF). **Ministério da Saúde**. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos, v.1, 147p, 2006. Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/docs/geral/fitoterapia_no_sus.pdf>. Acesso em: 21 de junho de 2017.
9. DOS SANTOS, A. et al. Staphylococcus aureus: Visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras. Patol. Med. Lab**, v. 43, p. 413-423, 2007.
10. DUARTE et al., 2005; MARTINI et al., 2009; SILVA Jr. et al., 2009; ALBERNAZ et al., 2010; COGO et al., 2010; HÖFLING et al., 2010).
11. FARZANEH, Vahid; CARVALHO, Isabel S. A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 247-258, 2015.
12. FERREIRA, Sabrina Baptista et al. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Rev. Virtual Quim**, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.
13. FUENTEFRÍA, Daiane Bopp et al. Pseudomonas aeruginosa: disseminação de resistência antimicrobiana em efluente hospitalar e água superficial. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, n. 5, p. 470-473, Oct. 2008.
14. JACQUES, Rosângela Assis. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DA ERVA MATE (Ilex paraguariensis): APLICAÇÃO DE DIFERENTES PROCESSOS DE EXTRAÇÃO E INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE PLANTIO SOBRE A COMPOSIÇÃO QUÍMICA**. 2005. Tese de Doutorado. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/5459>>. Acesso em: 21 de junho de 2017

15. JANUÁRIO, Sônia Regina; SILVÉRIO-LOPES, Sandra. O Poder Terapêutico do Ipê Roxo e seu Uso na Terapia Complementar ao Tratamento de Neoplasias. **Rev Bras Terap e Saúde**, v. 5, n.2,9-14, 2014.
16. LIMA, Paulo Ricardo et al. Avaliação morfofisiológica em mudas de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC.) Mattos durante a rustificação. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 3, p. 316-326, 2014.
17. MENDONÇA, Alessandra Esther et al. Estudo das tendências de prescrição de antimicrobianos para pacientes idosos hospitalizados sob a perspectiva do uso racional de medicamentos. **HU Revista**, v. 35, n. 2, 2009.
18. MOTA, RA et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.
19. Moura FML. **Efeito antimicrobiano e antiaderente in vitro de plantas da caatinga frente a micro-organismos patogênicos de interesse na área de alimentos**. 2013. 71f. Dissertação. Mestrado em Ciência Animal Tropical] – Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2013. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/5049>>. Acesso em: 21 de junho de 2017.
20. ORGANIZAÇÃO PAN AMERICA DE SAÚDE. OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=816> Acesso em: 20 de junho de 2017

21. OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
22. Radulovi CNS, Blagojevi CPD, Stojanovic-Radic ZZ, Stojanovi CNM. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. **Curr Med Chem** 2013;20:932-52.
23. ROZATTO, Mariana Rodrigues. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de Arrabidaea brachypoda**. 2012. 100 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94817>>. Acesso em: 21 de junho de 2017
24. SAFDAR, Nasia; HANDELSMAN, Jo; MAKI, Dennis G. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 4, n. 8, p. 519-527, 2004.
25. SANTOS, Miriam Pires dos. **Extração e caracterização de extratos de Jatropha gossypifolia L.: avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante**. 2014. Tese de Doutorado. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
26. SASIDHARAN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 8, n. 1, 2011.

- 27.TOMA, Maricela et al. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 8, n. 2, p. 137-142, 2001.
- 28.VIEIRA, Silvia C. Heredia et al. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.