



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

SEMIRAMYS MOREIRA SILVA

Potencial antimicrobiano de extratos de uma população de *Byrsonima coccolobifolia*
Kunth (mirixi-caju) de Boa Vista, Roraima

Boa Vista
2009

SEMIRAMYS MOREIRA SILVA

Potencial antimicrobiano de extratos de uma população de *Byrsonima coccolobifolia*
Kunth (mirixi-caju) de Boa Vista, Roraima

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Recursos Naturais da
Universidade Federal da Roraima, como
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Recursos Naturais.

Orientador: Marcos José Salgado Vital

Boa Vista

2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pela força, compreensão, dedicação e paciência que direcionaram a mim, para que eu hoje pudesse estar concluindo mais uma etapa da minha vida profissional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelas maravilhas que tem feito em minha vida;

Aos meus pais, que me ensinaram a lutar pelos meus objetivos;

Ao meu irmão por me auxiliar com as ferramentas da informática;

A Monique Moreira Silva, pela companhia durante as noites em claro estudando;

Ao meu orientador Professor Dr. Marcos José Salgado Vital pelo apoio e incentivo para realização desse trabalho;

A Professora Dra. Albanita de Jesus R. da Silva por toda sua dedicação e atenção que fizeram com que esse trabalho fosse concluído;

A Universidade Federal de Roraima e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais pela oportunidade;

Ao Departamento de química por permitir a preparação dos extratos, em especial aos professores Francisco das Chagas Nascimento e Antonio Alves que se prontificaram e disponibilizaram todas as instalações do Laboratório de Produtos Naturais;

Ao Centro em Biodiversidade pela disponibilização das instalações e equipamentos necessários;

Ao Professor Frank James e a amiga Natália Trajano de Oliveira pelo auxílio nas ferramentas estatísticas;

Ao Professor Rodrigo Schütz pelo auxílio na confirmação botânica do material estudado;

Ao Departamento de Solos e Engenharia Agrícola da UFRR pela compreensão e por me liberarem do trabalho para que eu pudesse me dedicar integralmente ao Mestrado;

A Márcia Brandão biomédica do Laboratório Central de Roraima do setor de Bacteriologia por ter doado as cepas ATCC tão importantes para conclusão da dissertação;

Ao amigo e aluno do Mestrado em química Isac José Soares por todo apoio e auxílio durante etapa fitoquímica da dissertação;

A amiga Marina Keiko pela indicação da área de coleta do material vegetal;

Ao Dr. Sérgio Luis Bessa Luz, coordenador do Laboratório de Biodiversidade em Saúde da FIOCRUZ, pela doação de cepas, pois sem estas não conseguiríamos a conclusão do trabalho;

Aos estagiários do laboratório de Microbiologia Jéferson e Willames pelo apoio nas atividades desempenhadas nesse laboratório;

A minha cunhada Érica Wayla pelo auxílio nos segredos da língua estrangeira;

Ao Colega do curso de Farmácia Jonnath das Chagas Santos que muito gentilmente cedeu os discos de antibióticos para realização de análises como parâmetro de controle positivo;

Aos amigos da Turma de 2007 do Mestrado em Recursos Naturais pelo companheirismo e amizade em todos os momentos difíceis durante os dois anos de curso (Keily Kathiany Almeida, David e Diana Marcela Ossa, Claymir Cavalcante);

“A vida só pode ser compreendida, olhando-se para trás; mas só pode ser vivida, olhando-se para frente”.

Soren Kierkegaard

RESUMO

Byrsonima coccolobifolia Kunth conhecida popularmente como “mirixi-caju”, pertence ao Gênero *Byrsonima* e a Família Malpighiaceae. É uma das espécies mais abundantes das regiões de savana dos trópicos brasileiros que tem sido utilizada pela medicina tradicional sob a forma de infusão das folhas e cascas para o tratamento de feridas como agentes anti-sépticos. No presente estudo avaliou-se a ação antimicrobiana dos extratos metanólico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico, produzidos a partir de partes aéreas e casca do caule de indivíduos de *B. coccolobifolia*, frente a espécies bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) e fúngica (*Candida albicans*). As análises para avaliação de atividade antimicrobiana foram realizadas seguindo o método de Kirby e Bauer e Concentração Inibitória Mínima dos extratos ativos. Os resultados obtidos indicaram que os extratos testados apresentaram atividade sobre as cepas de bactérias Gram (+), especialmente *S. aureus*, sendo que os maiores halos apresentados por extratos de acetato de etila, clorofórmico e metanólico obtidos da casca do caule. Quando testados frente a *C. albicans* apresentaram parcialmente ativos, não diferindo entre as partes da planta utilizada nem o solvente empregado para preparação do extrato. Assim, o uso de *B. coccolobifolia* pode inferir uma alternativa eficiente principalmente contra infecções bacteriana causada por *S. aureus*.

Palavras-chave: *Byrsonima coccolobifolia*; Extratos; Microrganismos; Atividade.

ABSTRACT

Byrsonima coccolobifolia Kunth popularly known as “mirixi-caju” belongs to the Genus *Byrsonima* and Family *Malpighiaceae*. It is one of the most abundant species of tropical savanna regions of Brazilian tropics which has been used by traditional medicine in the form of infusion of the leaves and bark to treat wounds as antiseptic agents. In this study we evaluated the antimicrobial activity of methanol extract, chloroform, ethyl acetate and ethanol, produced from the aerial parts and stem bark of individuals of *B. coccolobifolia*, against bacterial species (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*) and fungal (*Candida albicans*). The tests for antimicrobial activity were performed following the method of Kirby and Bauer and minimum inhibitory concentration of active extracts. The results indicated that the extracts tested showed activity against strains of Gram (+), especially *S. aureus*, with the largest halos presented by extracts of ethyl acetate, chloroform and methanol obtained from the stem bark. When tested against *C. albicans* showed partially active, with no difference between the plant parts used or the solvent employed to prepare the extract. Thus, the use of *B. coccolobifolia* can infer an effective alternative especially against bacterial infections caused by *S. aureus*.

Keywords: *Byrsonima coccolobifolia*; Extracts; Microorganism; Activity.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRAT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.2	CARACTERIZAÇÃO de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth.....	19
1.2.1	Família: <i>Malpighiaceae</i> Jussieu	19
1.2.2	Gênero: <i>Byrsonima</i> H. B. K.	19
1.2.3	Espécie: <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth.....	21
1.3	Constituintes químicos dos vegetais	22
1.4	Caracterização microbiológica dos indivíduos em estudo	24
1.4.1.1	<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani & Chalmers	25
1.4.1.2	<i>Serratia marcescens</i> Bizio.....	26
1.4.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i> Rosembach	26
1.4.1.4	<i>Bacillus subtilis</i> (Elvemberg) Cohn	26
1.4.1.5	<i>Candida albicans</i> Berkout.....	27
1.4.2	Resistência bacteriana e fúngicas aos agentes antimicrobianos.....	27
2	OBJETIVOS	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Coleta da planta e preparação do material vegetal	30
3.1.1	Preparação e secagem do material	32
3.2	Moagem das amostras	34
3.3	Preparação dos extratos.....	34
3.3.1	Extração Etanólica a frio.....	34
3.3.2	Extração a quente utilizando solvente de polaridade crescente	35
3.3.3	Evaporação dos extratos	36
3.3.4	Acondicionamento dos extratos concentrados	36
3.3.5	Diluição dos extratos	37

3.4	Métodos de Screening Fitoquímico	38
3.5	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	39
3.5.1	Microorganismos testes.....	39
3.5.2	Ensaio farmacológico <i>in vitro</i>	40
3.5.2.1	Procedimentos	40
3.5.2.2	Aplicação dos discos contendo os extratos	40
3.5.2.3	Concentração inibitória mínima (CIM)	43
3.6	Análise dos dados	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Rendimento dos extratos	44
4.2	Screening Fitoquímico	44
4.3	Ensaio farmacológico <i>in vitro</i>	47
4.4	Concentração Inibitória mínima	55
5	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exemplos de substâncias bioativas extraídas da natureza (fungos e plantas).....	17
Tabela 2	Caracterização de algumas plantas medicinais do Gênero <i>Byrsonima</i> da Família <i>Malpighiaceae</i> Jussieu	20
Tabela 3	Microrganismos utilizados para realização do bioensaio com extratos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth.....	39
Tabela 4	Massa e rendimento médio das extrações à quente e à frio de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth (partes aéreas e casca do caule)	45
Tabela 5	Resultados do screening fitoquímico de extratos metanólicos obtidos de partes aéreas e casca do caule de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth	45
Tabela 6	Ação dos extratos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth frente a cepas de <i>S.aureus</i> obtidas de três origens diferentes	49
Tabela 7	Ação dos extratos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth frente a cepas de <i>E. coli</i> obtidas de três origens diferentes	50
Tabela 8	Ação dos extratos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth frente a cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	53
Tabela 9	Ação dos extratos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth frente a cepas de <i>Serratia marcescens</i>	53
Tabela 10	Ação dos extratos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth frente a cepas de <i>Candida albicans</i>	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Área de coleta localizada em um ambiente de savana na Cidade de Boa Vista- RR.....	30
Figura 2	Aspecto geral de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth, habito da planta (A) e filotaxia (B).....	31
Figura 3	Aspecto do geral do caule de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth, detalhe do cerne (A), casca tipo escamosa (com ritidoma coberto por placas de desprendimentos associadas a fendas verticais).....	31
Figura 4	Seleção do material sadio para prática da fitoquímica	31
Figura 5	Características das flores (A) e frutos (B) de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth.....	32
Figura 6	Processo de higienização de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth coletada	33
Figura 7	Pesagem das partes aéreas de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth	33
Figura 8	Secagem das partes aéreas de indivíduos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C	33
Figura 9	Processo de moagem das partes aéreas de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth	34
Figura 10	Obtenção de extrato bruto das parte aérea (A) e casca do caule (B) de indivíduos pertencentes a espécie de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth.....	35
Figura 11	Extração à quente em aparelho Soxhlet das partes aéreas (A) e casca do caule (B) de indivíduos pertencentes a espécie de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth.....	36
Figura 12	Concentração dos extratos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth em aparelho de evaporação rotatória.....	37
Figura 13	Esquema de diluição dos extratos de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth	38
Figura 14	Extratos diluídos prontos para aplicação em discos blank.....	38
Figura 15	Aplicação do extrato de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth em discos blank	41
Figura 16	Inoculação dos microrganismos pela técnica de placa cheia com auxílio	

	de Swab.....	41
Figura 17	Aplicação dos discos blank já impregnado com extrato de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth em placas contendo o inóculo.....	42
Figura 18	Ação dos discos impregnados com extrato de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth obtido a partir da parte aérea fração acetato de etila, geral (18A) e detalhe (18B).....	42
Figura 19	Reação de solução alcoólica obtida da casca do caule de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth na presença de cloreto férrico, ocorrendo variação de coloração de vermelho para tonalidade azul-intenso	45
Figura 20	Reação positiva para presença de flavononóis, sendo demonstrada pela mudança de coloração atingindo a tonalidade vermelho-laranja.....	46
Figura 21	Reação positiva para presença de esteróides e triterpenóides, sendo mostrada no tubo 1, pela coloração verde permanente indicativa de esteróides livres: e tubo 2 coloração parda com precipitado vermelho indicando a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.....	46
Figura 22	Ação dos discos impregnados com extratos metanólicos (1) e clorofórmico (2) de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth (partes aéreas e casca do caule) frente à cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC).....	47
Figura 23	Ação dos discos impregnados com extratos acetato de etila (1) e etanólico de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth (partes aéreas e casca do caule) frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> (FIOCRUZ).....	48
Figura 24	Ausência de atividade dos discos impregnados com extratos metanólico e clorofórmio de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth, sendo partes aéreas e casca do caule frente à cepa <i>Escherichia coli</i> (FIOCRUZ).....	51
Figura 25	Ausência de atividades dos discos impregnados com extratos acetato de etila e etanólico, sendo parte aérea e casca do caule de <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth, frente à cepa <i>Escherichia coli</i> (FIOCRUZ)	51
Figura 26	Ação dos discos impregnados com extratos clorofórmico <i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth, de casca do caule frente à cepa <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC).....	52
Figura 27	Ausência de ação dos discos impregnados com extratos metanólico e clorofórmio sendo parte aérea e casca do caule de <i>Byrsonima</i>	

- coccolobifolia* Kunth frente à cepa *Serratia marcescens* (ATCC).....54
- Figura 28** Ação dos Extratos de partes aéreas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente à cepas de *Staphylococcus aureus* (FIOCRUZ). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey à 5%56
- Figura 29** Ação dos Extratos de casca do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente à cepas de *Staphylococcus aureus* (FIOCRUZ). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey à 5%56
- Figura 30** Ação dos Extratos de partes aéreas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente à cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey à 5%57
- Figura 31** Ação dos Extratos de casca do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente à cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey à 5%57
- Figura 32** Ação dos Extratos de partes aéreas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente à cepas de *Candida albicans* (ATCC). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey à 5%58
- Figura 33** Ação dos Extratos de casca do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente à cepas de *Candida albicans* (ATCC). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey à 5%59

1 INTRODUÇÃO

O potencial antimicrobiano de plantas medicinais tem sido pesquisado em diversas espécies, tanto no Brasil quanto em outros países. O conhecimento do poder de cura de muitas espécies vegetais data de longos anos, e essa experiência vem sendo transmitida de geração em geração. O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e por longo tempo minerais, plantas e produtos animais foram a principal fonte para produção de drogas (ESQUENAZI et al., 2002).

No Brasil, além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as contribuições trazidas pelos escravos e imigrantes representam papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica e original, na qual a utilização de plantas medicinais ocupa lugar de destaque (SIMÕES et al., 1995).

O primeiro estudo sistemático de plantas medicinais foi realizado, cerca de 2.700 anos a.C., durante o Império Shen Nung. Entre as 365 drogas mencionadas no Inventário de Shen Nung, encontram-se espécies tais como *Ephedra sp.*, *Ricinus communis* além do ópio de *Papaver somniferum*. Espécies estas que fornecem respectivamente efedrina, óleo de rícino e morfina, princípios ativos conhecidos e utilizados até hoje (BALICK; COX, 1997).

Segundo Korolkovas (1998), diversos medicamentos utilizados atualmente, especialmente alcalóides, antibióticos, vitaminas e hormônios resultaram da purificação de extratos e do isolamento de seus princípios ativos (tabela 1). Porém o potencial farmacológico de grande parte da flora brasileira ainda é desconhecido. De acordo com Garcia et al., (2004), cerca de 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram pesquisadas em busca de compostos bioativos; valor que representa em torno de 1100 espécies da flora nacional que foram avaliadas.

As plantas medicinais estão entre os produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de utilização como fitofármacos, por proporcionarem a obtenção de moléculas protótipos devido à diversidade de seus constituintes (NASCIMENTO et al., 2000; PESSINI et al., 2003; DUARTE et al., 2004; MICHELIN et al., 2005; LIMA et al., 2006), além de serem fontes naturais de substâncias inseticidas e antimicrobianas, o que segundo Bruschi et al., (2000), justifica os 25% dos fármacos utilizados na atualidade serem de origem vegetal.

Tabela 1: Exemplos de substâncias bioativas extraídas da natureza (fungos e plantas).

Fármaco	Isolado por	Ano	Sintetizado por	Ano
Morfina	Sertuner	1805	Gates e Tschudi	1956
Atropina	Mein	1831	Ladenburg	1883
Papaverina	Merck	1848	Pictet e Gams	1909
Cocaína	Wohle	1859	Willstatter et al.,	1901
Edefrina	Nagai	1885	Schimidt	1908
Penicilina	Fleming	1929	Sheeham	1957
Dicumarol	Link et al.,	1941	Link	1943
Cloranfenicol	Burkholder	1947	Controulis et al.,	1949
Encefalinas	Hughes et al.,	1975	Voelter et al.,	1976

Fonte: Korolkovas, (1988); Ucko, (1992).

O ressurgimento de várias doenças, consideradas extintas, ou restritas a uma determinada área geográfica do planeta, assim como o surgimento de novas linhagens de agentes infecciosos, provocou um aumento nos investimentos feitos à pesquisa de produtos naturais, tornando o mercado de fitomedicamentos com comprovação científica de eficácia clínica, segurança e qualidade, promissor em todo o mundo (CALIXTO, 2000).

Fungos e bactérias causam importantes infecções em humanos e, apesar da existência de inúmeros medicamentos específicos, o surgimento de microrganismos resistentes ou multiresistentes tem se tornado cada vez mais comum (ALVES et al., 2000). Tendo em vista tal ocorrência, é notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos.

Segundo Elizabetsky (1990), a seleção de uma espécie vegetal para pesquisa baseada nas alegações de um dado terapêutico em humanos, pode se constituir em um valioso atalho para a descoberta de fármacos. De acordo com Calixto (2000), a tendência observada para a fitoterapia, assim como no passado, deve desempenhar um papel cada vez mais importante na assistência à saúde da população.

Estudos vêm sendo realizados com o intuito de comprovar a ação antimicrobiana de plantas utilizadas na cultura popular. De acordo com Silveira (1997), extrato de plantas é uma mistura de compostos bioativos que sinergicamente atuam na permeabilidade da membrana e ou na atividade respiratória celular microbiana, causando a morte (bactericida) ou inibindo o crescimento microbiano (bacteriostático). Avancini et al., (2000), analisando decocto de *Banccharis trimera* (carqueja), verificaram a ação desse frente a bactérias Gram-positivas. Nascimento et al., (2000), relataram a ação antimicrobiana de extratos de plantas usadas na cultura popular como o “alecrim” e a “erva-cidreira” frente a bactérias sensíveis e resistentes à antibióticos sintéticos.

A etnofarmacologia também tem sido aplicada para o tratamento das enfermidades animais, não somente no Brasil como em outros países (LANS; BROWN, 1998). Schmitt (2003), ao submeter o decocto das folhas de *Bryophillum pinnatum* (folha-da-fortuna), frente às bactérias isoladas de cães com lesões de pele, observaram que os resultados obtidos sugeriam a existência de substâncias com atividade antimicrobiana, que atuavam seletivamente sobre bactérias Gram-positivas causadoras de lesões na pele, justificando assim a sua popularidade na etnomedicina.

Alves et al., (2000), realizou um screening biológico, de 42 espécies de plantas da savana utilizadas na medicina popular no controle de doenças tropicais, onde 60% das plantas estudadas apresentaram atividade antimicrobiana, especialmente contra as bactérias Gram-positiva *S. aureus* e *B. cereus*. Dentre as 42 espécies de plantas destacaram-se as pertencentes ao Gênero *Byrsonima* as quais se mostraram especialmente ativas quando obtidas da extração metanólica de folhas de *B. intermedia* e *B. verbacifolia*.

Diante destas observações temos na savana brasileira um habitat muito diversificado, onde muitas das plantas encontradas nesse ecossistema são usadas na medicina natural, no tratamento de doenças tropicais, incluindo infecções bacterianas. De acordo com Alves et al., (2000), muitas plantas existentes nesse habitat tais como: *Bowdichia virgilioides* Kunth, *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, *B. intermedia* A. Juss., *B. verbascifolia* (L.) Richard, *Roupala montana* Aubl. e *Xylopia aromatica* (Lam) Mart., presentes no estado de Roraima, são utilizadas como alternativas medicinais contra infecções tropicais como leishmaniose, esquistossomose, malária, infecções fúngicas e bacterianas.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DE *Byrsonima coccolobifolia* Kunth

1.2.1 Família: *Malpighiaceae* Jussieu

É uma família botânica que compreende 70 gêneros e cerca de 1200 espécies distribuídas nos trópicos, especialmente na América do Sul, sendo encontrados no Brasil 38 gêneros e 300 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

Freqüentemente são lianas, porém ocorre na forma de arbustos, subarbustos, e raramente árvores. Apresentam em geral folhas inteiras, alternadas, algumas são pilosas, ou seja, possuem pêlos e estes são chamados de malpighiáceos (SOUZA; LORENZI, 2005).

As inflorescências geralmente são racemosas, mas há cimosas. Há alguns gêneros com flores isoladas, que são amarelas ou róseas, hermafroditas, cíclicas, diclamídeas e de simetria zigomorfa. Seus frutos possuem cápsula esquizocarpo, constituído de três samarídeos (em forma de sâmaras) ou cocas, podendo ser também drupa ou aquênio (SOUZA; LORENZI, 2005).

As Malpighiaceae possuem grande potencial ornamental, ainda subutilizado, além de algumas espécies com folhas referidas como alucinógenas, como é o caso de *Banisteriopsis caapi*, utilizadas em rituais de caráter religioso (SOUZA; LORENZI, 2005).

1.2.2 Gênero: *Byrsonima* Humboldt, Bonpland e Kunth

Os representantes desse gênero são caracterizados por serem arbustos muito ramificados. Apresentam folhas coriáceas, flores amarelas, com glândulas visíveis no cálice, reunidas em racemos terminais. Os frutos são drupas globosas, de cor amarela, contendo uma única semente (SOUZA; LORENZI, 2005).

Várias espécies do gênero *Byrsonima* H. B. K. são conhecidas pela utilização de seus frutos na alimentação, como também pelo uso com fins medicinais (FIGUEIREDO et al., 2005). Estudos dos extratos das raízes e troncos da espécie *B. crassifolia* Kunth têm demonstrado possuir atividades antimicrobiana, tripanomicida e antiespasmódica (SANNOMIYA et al., 2005).

No entanto, poucas espécies pertencentes a esse gênero foram quimicamente estudadas. Investigações fitoquímicas de *B. verbascifolia* Rich. Ex

Juss., *B. microphylla* A. Juss. e *B. crassa* Nied. revelaram a ocorrência, em troncos e folhas, de triterpenos, flavanóides, éster aromático, naftoquinonas e amentoflavona (MENDES et al., 1999; SANNOMIYA et al., 2004). Estudos sobre *B. crassifolia* Kunth demonstraram o isolamento de glicolipídeos, triterpenos, ácidos triterpênicos, catequinas e flavonóides das folhas (BEJAR, et al., 1995; RASTRELLI et al., 1997,) e, proantocianidinas e taninos do tronco, enquanto que dos frutos (polpa) não há nenhum registro de substâncias isoladas, exceto de compostos voláteis responsáveis pelo seu aroma (REZENDE; FRAGA, 2003; ALVES; FRANCO, 2003).

Tabela 2: Caracterização de algumas plantas medicinais do gênero *Byrsonima* da família *Malpighiaceae* Jussieu.

Família vegetal	Nome científico	Nome popular	Parte vegetal utilizada	Uso popular	Referências
Malpighiaceae	<i>Byrsonima coccolobifolia</i> Kunth	Murici	Haste	Anti-séptica, anti-infecciosa/feridas.	Cavalcante e Frikel, 1973.
	<i>Byrsonima coriacea</i> (Sw.) DC.	Murici	Haste	Anti-séptica, anti-infecciosa/feridas.	Cavalcante e Frikel, 1973.
	<i>Byrsonima intermédia</i> A. Juss	Murici do campo, Murici, baga-de-tucano	Raízes	Feridas crônicas, corrimento vaginal.	Lorenzi e Matos, 2002.
	<i>Byrsonima crassa</i> Niendzu(IK)	Murici vermelho	----	Picadas de cobra, doenças febris, infecções cutâneas e distúrbios gástricos	Amarquaye et al., 1994.
	<i>Byrsonima crassifolia</i> (L.) H.B.K	Murici	Cascas e folhas	Tosse, distúrbios gastrintestinais, picadas de cobra e infecções de pele.	Rastrelli et al., 1997.

Várias espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima* ocorrem no norte e nordeste brasileiro, sendo os frutos de algumas delas intensamente consumidos na forma de sucos, licores, geléias e doces. De acordo com Cáceres et al., (1993), espécies deste gênero são comumente utilizadas como anti-asmáticas, anti-febris, em disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e ainda como antidiarréicos e no tratamento de infecções cutâneas (tabela 2). Segundo Sannomiya et al., (2004), apesar do vasto uso popular de espécies deste gênero como medicamento, encontram-se poucos estudos sobre a química ou avaliação de efeitos farmacológicos de espécies pertencentes a este gênero.

1.2.3 Espécie: *Byrsonima coccolobifolia* Kunth

O mirixi-caju (*B. coccolobifolia*) é uma das espécies mais típicas e abundantes das regiões de savanas dos trópicos brasileiros e dos cerrados do Brasil Central (SANAIOTTI, 1996). Juntamente com a espécie simpátrica *B. crassifolia* Kunth e *Curatela americana* L. (caimbé) somam mais de 90% da biomassa total (arborea-arbustiva) acima do solo das savanas de Roraima, situada no extremo norte da Amazônia brasileira (BARBOSA; MIRANDA, 2005).

De acordo com Barbosa et al., (2005), a planta apresenta fenofases reprodutivas (surgimento do botão floral, floração e frutificação) ligadas diretamente a sazonalidade, ocorrendo no período de menor precipitação pluviométrica, sendo que a floração tem início no mês de dezembro, atingindo o máximo em fevereiro e frutificação iniciando-se em fevereiro até o mês abril.

É uma planta que ocorre principalmente nas regiões Norte e Nordeste do nosso país. A espécie é constituída de arbustos e arvoretas com altura inferior a 3 m, de flores hermafroditas zigomorfas, pentâmeras, reunidas em inflorescências do tipo racemo terminal, produzidos em brotações novas, o cálice é composto por cinco sépalas, que apresentam um par de glândulas produtoras de óleo. A corola é formada por cinco pétalas albo-róseas e unguiculadas, o androceu é composto por dez estames com anteras de coloração amarela (BENEZAR; PESSONI, 2008).

Os indivíduos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth são descritos como arvoretas e arbustos com casca do tipo escamosa associadas a fendas verticais, medindo altura média de 2,78 m. Apresentam folhas obovadas de filotaxia oposta

cruzada (figura 1B), que medem cerca de 10,1 cm de comprimento e 6,5 cm de largura (RIBEIRO et al., 1999).

A infusão das folhas e cascas são empregadas pela população para o tratamento de disfunções gástricas e ainda como anti-diarréico, porém há carência de relatos na literatura sobre o gênero *Byrsonima* juntamente com a ausência de estudos químico-farmacológicos para esta espécie, *B. coccolobifolia* Kunth (LORENZI et al., 2006).

1.3 Constituintes químicos dos vegetais

O metabolismo vegetal está condicionado aos processos fotossintéticos e pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. Desses processos resultam os metabólitos primários, como os lipídios, as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucléicos (OLIVEIRA et al., 2003).

A maioria dos metabólitos secundários é formada no metabolismo da glicose. A glicose é convertida em moléculas de piruvato que entram na via do ácido chiquímico para formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos; ligninas e lignanas; cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). Essas podem seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato, formando os chamados derivados do acetato. Na via do ciclo do ácido cítrico, são formados os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, porrolizidínicos, poperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato origina os terpenóides e os esteróis. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico, e uma ou mais unidades do acetato ou derivados deste, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados (SANTOS, 2007; OLIVEIRA et al., 2003).

Simões et al., (2004), afirmam que o fracionamento do extrato bruto com solventes de polaridade crescente possibilita inferir possíveis classes de substâncias extraídas nas diferentes frações de acordo com suas polaridades e solubilidades. O fracionamento começa preferencialmente com o hexano onde são extraídos os lipídios, ceras, pigmentos e furanocumarinas; com o clorofórmio obtém-se antraquinonas livre, bases livres de alcalóides e glicosídeos cardiotônicos; o acetato

de etila e metanol extraem flavonóides, cumarinas simples, triterpenos de polaridade elevada, taninos e diversas classes de heterosídeos.

Dentre os constituintes químicos presentes nas folhas de *B. coccolobifolia* foram identificados por Lorenzi et al., (2006), taninos e açúcares livres na porção metanólica submetido à partição líquido-líquido com (água e acetato de etila 1:1). Na porção acetato de etila foi constatado a presença de derivados de ácidos fenólicos, flavonóides e catequinas, e quando esta porção foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna Sephadex LH-20 foram fornecidos 47 subfrações dentre elas encontradas catequinas, epicatequina e quercetinas, além de flavonóides e uma xantona (LORENZI et al., 2006).

Os flavonóides são compostos fenólicos, cuja síntese não ocorre na espécie humana. A maioria dos representantes desta classe possui 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por cadeia de três carbonos (SIMÕES et al., 2004). São conhecidos mais de 4.000 flavonóides, e como existem em grande quantidade na natureza, a variação de suas estruturas é grande.

Esses compostos aromáticos, nos vegetais, desempenham o papel de bloqueadores da radiação ultra-violeta, além de atuarem na pigmentação das espécies. Nos animais, os flavonóides apresentam efeitos potenciais como antioxidante, antiinflamatório, protetor cardíaco, analgésico, antialérgico, anti-tumoral, anti-diabético, cicatrizante, entre outros (SIMÕES et al., 2004).

A ação antimicrobiana dos flavonóides, provavelmente, esteja relacionada à capacidade de complexar proteínas extracelulares e solúveis, bem como estruturas da parede celular bacteriana. Flavonóides mais lipofílicos poderiam atuar provocando o rompimento das membranas microbianas (CHABOT et al., 1992; SATO et al., 1996).

De acordo com Simões et al., (2004), as saponinas, são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, e apresentam característica lipofílica (triterpenos ou esteróides) e hidrofílica (açúcares). Dentre as propriedades farmacológicas das saponinas, podemos citar atividade antiinflamatória, hemolítica, antimicrobiana e antiviral. Muitas propriedades são facilmente detectadas e testadas, porém algumas atividades constatadas, não são empregadas na terapêutica devido aos efeitos tóxicos das saponinas em organismos vivos (SCHENKEL et al., 2007).

As plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional, no tratamento de diversas moléstias orgânicas como a diarreia, hipertensão arterial,

reumatismo, hemorragia, problemas estomacais e renais, e nos processos inflamatórios (SIMÕES et al., 2004). Segundo Santos e De Mello (2004), esses compostos podem apresentar atividade bactericida, fungicida, moluscicida e antiviral.

As atividades farmacológicas dos taninos podem estar relacionadas à habilidade destes compostos de complexar-se com proteínas, polissacarídeos e íons metálicos como: Fe, Mn, Cu, Al, Ca (SANTOS; DE MELLO, 2004). Portanto a capacidade de inibir microrganismos pode estar relacionada com a inativação de adesinas, enzimas e proteínas transportadoras do envelope celular (SIMÕES et al., 2004). Os taninos podem ser tóxicos para os fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SCALBERT, 1991).

1.4 Caracterização microbiológica dos indivíduos testes

Os microrganismos são classificados em procarióticos, células que não possuem envoltório nuclear (bactérias), ou eucarióticos, células com núcleo verdadeiro com um complexo envoltório nuclear (protozoários, fungos, helmintos) (ROBERTIS; ROBERTIS Jr. 1993).

A princípio todos os seres, tanto hospedeiro quanto patógeno, possuem a mesma estrutura básica – o DNA (sendo exceção os vírus de RNA) – de forma que alguns processos bioquímicos são comuns à maioria dos organismos. Para encontrarmos agentes que afetem os patógenos e que sejam inócuos ao hospedeiro, é necessário que se encontrem diferenças bioquímicas entre eles (RANG et al., 2007).

As bactérias possuem circundando sua célula uma estrutura denominada de parede celular, que contém peptídeoglicano que é exclusivo de células procarióticas, cuja função é sustentar a membrana plasmática subjacente, que está a uma pressão osmótica interna. Segundo Tortora et al., (2003), a natureza dessa estrutura é muito importante, uma vez que ela permite que a bactéria seja caracterizada conforme sua capacidade de absorver o corante de Gram (Gram-positivas coloração azulada e Gram-negativas coloração vermelha).

Nas bactérias Gram-positivas, a parede celular consiste de várias camadas de peptídeoglicano, formando uma espessa e rígida estrutura, porém segundo Rang et al., (2007) uma estrutura relativamente simples sendo uma camada polimerizada

o que influencia a penetração de compostos carregados positivamente. Em contraste, a parede celular de bactérias Gram-negativas possui apenas uma camada de peptidoglicano e uma membrana externa, porém é uma estrutura muito mais complexa o que dificulta a penetração por essa membrana externa, razão pela qual alguns antibióticos são menos ativos contra as bactérias Gram-negativas que contra as bactérias Gram-positivas.

As substâncias químicas que lesam a parede celular de bactérias ou interferem em sua síntese frequentemente não lesam as células do hospedeiro animal, pois a parede celular bacteriana é composta de substâncias diferentes daquelas presentes nas células eucarióticas, tornando portanto a síntese da parede celular um bom alvo de algumas drogas antimicrobianas (RANG et al., 2007).

1.4.1.1 *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers

É um bacilo fermentador Gram-negativo, um habitante normal do trato gastrointestinal de animais de sangue quente, por isso, quando a encontramos em alimentos ou água podemos afirmar que há contaminação fecal. É uma espécie bacteriana mais comumente isolada em laboratórios clínicos e tem sido responsável por doenças infecciosas acometendo praticamente todos os tecidos e sistemas orgânicos dos seres humanos (KONEMAN et al., 2008).

E. coli não é uma bactéria considerada patogênica, no entanto quando ocorre migração destas para outras áreas do corpo pode causar infecções do trato urinário e de feridas, pneumonia em pacientes hospitalizados imunossuprimidos e meningite em recém-nascidos (KONEMAN et al., 2008).

1.4.1.2 *Serratia marcescens* Bizio

Serratia marcescens é constituído por bacilos Gram-negativos pertencentes às Enterobacteriaceae e são as bactérias isoladas com mais frequência em amostras biológicas. Distribuídos amplamente na natureza, esses microrganismos são encontrados no solo, água, plantas e, como indica o nome da família, no trato intestinal de seres humanos e animais (KONEMAN et al., 2008). É reconhecida como um patógeno importante, com propriedades invasivas e alta resistência a muitos antibióticos utilizados na atualidade. Os pacientes imunocomprometidos ou

debilitados são altamente susceptíveis às infecções adquiridas no hospital, após colonização com cepas ambientais ou contaminação a partir de procedimentos invasivos (MURRAY et al., 1999). Podendo causar pneumonia, bacteremia e endocardite, sobretudo em usuários de narcóticos ou drogas e pacientes hospitalizados (KONEMAN et al., 2008).

1.4.1.3 *Staphylococcus aureus* Rosembach

Microrganismo esférico Gram-positivo, que se organiza crescendo em disposição de cachos, constitui, sem dúvida alguma, o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. É encontrado no ambiente externo e nas narinas anteriores de 20-40% dos adultos, outros locais de colonização incluem as pregas cutâneas intertriginosas, o períneo, as axilas e a vagina (KONEMAN et al., 2008). Possui grande facilidade de se desenvolver em substratos como secreções nasais, alimentos com pouca umidade, além de produzirem um pigmento amarelo que segundo Tortora et al., (2003), provavelmente confere alguma proteção para os efeitos antimicrobianos do sol. São grandes produtores de toxinas o que contribui para a patogenicidade da bactéria, aumentando a habilidade de invadir o corpo e danificar tecidos.

Apesar desse microrganismo constituir freqüentemente parte da microbiota humana normal, ele pode produzir infecções oportunistas significativas em condições apropriadas como lesões cutâneas, presença de corpos estanhos como próteses, suturas etc., portadores de doenças crônicas, como neoplasias malignas, cardiopatias, e administração profilática ou terapêutica de antimicrobianos (KONEMAN et al., 2008).

1.4.1.4 *Bacillus subtilis* (Elvemberg) Cohn

É uma espécie de bacilo saprófita, Gram-positivo, podendo ser encontrado na pele, no trato respiratório, sendo aeróbio e produtor de esporos. Considerado um patógeno oportunista, foi isolado em pacientes sob o uso de próteses, imunocomprometidos e, em infecções oculares e do sistema nervoso central por introdução traumática (KONEMAN et al., 2008).

1.4.1.5 *Candida albicans* Berkhout

Os fungos são células eucarióticas e assim representam um microrganismo mais complexo. Por serem eucariontes como o seu hospedeiro, normalmente os medicamentos empregados no tratamento de uma infecção fúngica são muito tóxicos. Uma das espécies bastante comum e de importância clínica é a *C. albicans*, uma levedura que se fixa nas células epiteliais humana, freqüentemente presente nas mucosas normais da boca, da vagina e do trato intestinal em pessoas saudáveis, porém pode tornar-se patogênica, sendo responsável por causar candidíase um quadro infeccioso oportunista que freqüentemente aparece em pacientes idosos, diabéticos, mulheres grávidas e vítimas de queimadura (TORTORA et al., 2003).

1.4.2 Resistência bacteriana e fúngica aos agentes antimicrobianos

O desenvolvimento da quimioterapia antimicrobiana teve início na década de 30 do século passado, com a descoberta das sulfonamidas e as penicilinas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1968). Porém nas subseqüentes décadas de 50 e 70, epidemias por *S. aureus* resistentes à penicilina e linhagens multiresistentes (MRSA) chamaram a atenção para o problema da resistência adquirida aos antimicrobianos (COUTO; PEDROSA; NOGUEIRA, 1999).

Atualmente, *S. aureus* metilicina resistente, é o maior patógeno nosocomial em infecções hospitalares e é responsável por inativar a ação de vários antibióticos, tornando a multiresistência um grande problema de saúde pública (STRATTON, 2000). Pacientes internados em instituições de saúde estão expostos a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos, principalmente em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), onde o uso de antimicrobianos potentes e de largo espectro é a regra, e os procedimentos invasivos é rotina.

O uso indiscriminado e equivocado de antibióticos facilita o surgimento de bactérias e outros microrganismos cada vez mais resistentes, reduzindo a eficácia dos medicamentos, proporcionando internações mais longas, o uso de antibióticos mais caros e tóxicos são algumas das conseqüências do uso inadequado dessas drogas, o que, além de dificultar e encarecer os tratamentos pode até inviabilizá-los.

Apesar da indústria farmacêutica produzir um expressivo número de novos antibióticos nas últimas três décadas, a resistência microbiana a essas drogas

também aumentou. Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos aos seus descendentes muito rapidamente (COHEN, 1992). O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antimicrobianas, incerta, o que destaca a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas sendo notória a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem utilizadas no combate a esses microrganismos.

Nesse contexto, o presente trabalho propôs a investigação da espécie *B. coccolobifolia* Kunth (mirixi-caju), buscando propriedades antimicrobianas para utilização no combate a infecções causadas por microrganismos, uma vez que estudos anteriores desse gênero apontam a presença de flavonóides e glicosídeos o que pode conferir a estas atividade antimicrobiana, sendo de grande importância a realização do estudo de uma possível atividade antimicrobiana de extratos de *B. coccolobifolia* Kunth frente a cepas (bacterianas e fúngicas) padrões ATCC (American Type Culture Collection) e isolados clínicos obtidos através do LACEN-RR (Laboratório Central de Roraima) e CBAM-FIOCRUZ (Coleção de Bactérias da Amazônia da Fundação Oswaldo Cruz do Estado do Amazonas), visto que entre as infecções comunitárias nosocomiais produzidas, principalmente por *S. aureus*, tem lugar de destaque pela sua frequência, morbidade e mortalidade e principalmente pelas dificuldades de tratamento. Sendo assim, verificamos a sensibilidade de microrganismos freqüentes em quadros infecciosos avaliando a atividade antimicrobiana desse extrato frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de uma espécie fúngica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Conhecer o potencial antimicrobiano de extratos de indivíduos férteis de uma população de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (mirixi-caju), coletada em uma área de savana localizada no município de Boa Vista-Roraima.

2.2 Objetivos específicos

- Elucidar a atividade antimicrobiana dos extratos em diferentes concentrações frente a cepas ATCC e clínicas;
- Determinar a concentração mínima inibitória (CIM) do extrato capaz de produzir efeito antimicrobiano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e preparação do material vegetal

As amostras de *B. coccolobifolia* Kunth foram coletadas de uma população dessa espécie, em uma área residencial no bairro Paraviana (figura 1), situado próximo ao balneário da Polar na Cidade de Boa Vista-RR sob as coordenadas 20 N 0761122 e UT M 03116593 elevação: 80 m.



Figura 1: Área de coleta localizada em um ambiente de savana na Cidade de Boa Vista-RR.

Foram utilizadas partes da planta: casca do caule (figura 3) e partes aéreas – folhas e ramos (figura 2), e a confirmação taxonômica foi auxiliada pelo Professor Doutor Rodrigo Schütz do Centro de Estudos da Biodiversidade da Universidade Federal de Roraima.

A coleta, de acordo com Martins et al., (2000), foi realizada no início da manhã com o tempo seco, sendo coletado aproximadamente 2 kg de folhas e 500 g de casca do caule. De acordo com Matos (1998), para realização desses procedimentos foram utilizadas ferramentas como tesoura de poda para coletar partes aéreas, pá e canivete para coletar a casca do caule, sendo evitada a coleta de plantas visivelmente doentes - com manchas fora do padrão, com areia, e órgãos deformados – (figura 4).



Figura 2: Aspecto geral de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, hábito da planta (A) e filotaxia (B).



Figura 3: Aspecto do geral do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, detalhe do cerne (A), casca tipo escamosa com ritidoma coberto por placas de desprendimentos associadas a fendas verticais(B).



Figura 4: Seleção do material sadio para prática da fitoquímica.

Foram realizadas duas amostragens durante o ano de 2009, sendo a primeira no período seco (mês de abril com índice pluviométrico em média de 3,8 mm) e a segunda em período chuvoso (mês de julho com índice pluviométrico em média de 10,4 mm) na mesma área, segundo dados obtidos na estação meteorológica do Instituto Nacional de Meteorologia, situado no bairro de São Pedro Município de Boa Vista.

As coletas além de coincidirem com períodos com características diferentes (seco e chuvoso) também apresentaram fenofases distintas sendo a primeira no início do período da floração (figura 5A) e a segunda no início do período de frutificação (figura 5B).



Figura 5: Características das flores (A) e frutos (B) de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth.

3.1.1 Secagem do material coletado de *B. coccolobifolia*

Antes da secagem o material coletado foi higienizado, as folhas foram limpas com um pano embebido com água morna, já a casca do caule foi lavada e posteriormente seca com papel toalha (figura 6). O material coletado foi pesado para obtenção da massa inicial (figura 7), logo em seguida seco em estufa a 40 °C (figura 8), até biomassa constante, para estabilização dos compostos e retirada da umidade (KOROLKOVAS et al., 1988), evitando assim a oxidação, redução de rearranjos moleculares, hidrólises e remoção ou adição de radicais, que implicam alterações dos princípios ativos.



Figura 6: Processo de higienização de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth coletada.



Figura 7: Pesagem das partes aéreas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth.



Figura 8: Secagem das partes aéreas de indivíduos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth em estufa de circulação forçada de ar, a 40 °C.

3.2 Moagem das amostras

As amostras previamente secas (parte aérea e caule) foram moídas em moinho elétrico tipo Willye TE-648-Tecnal (figura 9). Após a moagem, as amostras foram acondicionadas em frasco de vidro hermeticamente fechados envoltos em papel alumínio, para evitar a oxidação de compostos.



Figura 9: Processo de moagem de partes aéreas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth.

3.3 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade Federal de Roraima.

3.3.1 Extração etanólica a frio

Os extratos foram obtidos a partir das partes secas (casca do caule e partes aéreas) e moídas de indivíduos pertencente à espécie *B. coccolobifolia* Kunth, foram colocados em uma proporção de 400 g de material vegetal para 1,5 litros de Álcool Etílico P. A, em um frasco de vidro recoberto com papel laminado impedindo a passagem de luz, para impedir a fotoxidação de compostos. Esse material foi

deixado em repouso e em média a cada quatro dias foram realizadas extrações, somando em um total de três extrações para cada parte da planta (figuras 10A e 10B). Primeiramente o material macerado por quatro dias foi submetido ao processo de filtragem, com auxílio de papel de filtro e funil de vidro, após o término da filtragem, as amostras foram concentradas em aparelho de evaporação rotatória e em seguida acondicionadas em frasco de vidro devidamente etiquetado e identificado com os códigos de cada extrato. O solvente recuperado através do processo de rotaevaporação foi novamente adicionado ao frasco, para que houvesse nova extração.

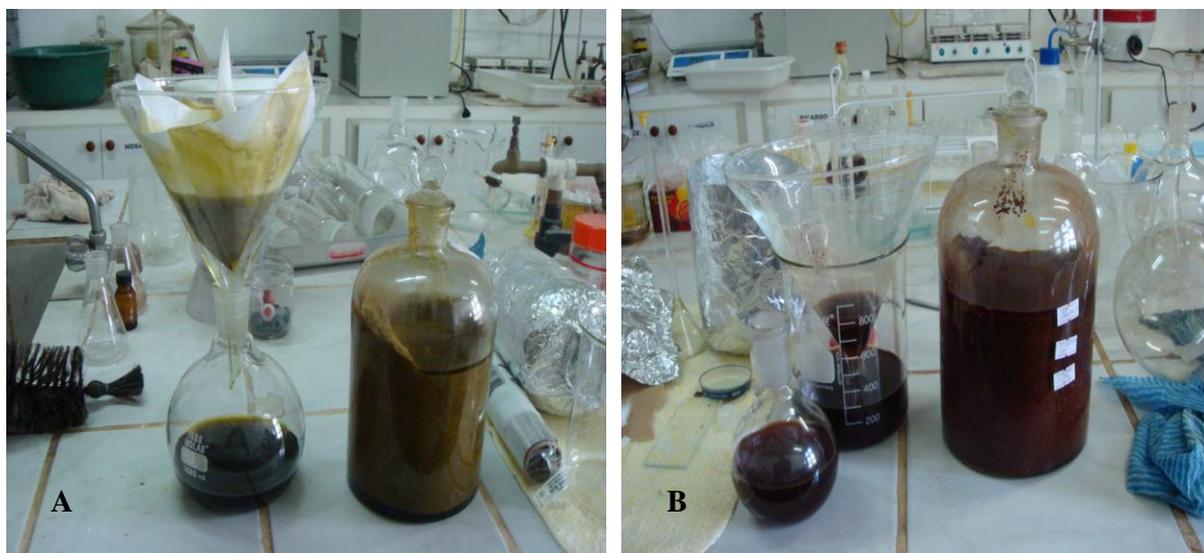


Figura 10: Obtenção de extrato bruto das partes aéreas (A) e casca do caule (B) de indivíduos pertencente à espécie *Byrsonima coccolobifolia* Kunth.

3.3.2 Extração a quente utilizando solventes de polaridade crescente

As amostras foram submetidas à extração contínua de em média 6 horas cada em aparelho Soxhlet, utilizando para este fim 1000 ml dos seguintes solventes em ordem de utilização: Hexano, Clorofórmio, Acetato de Etila e Metanol, para aproximadamente 245 g de material seco (figura 11). O solvente hexano somente foi utilizado com a finalidade de desengordurar o material vegetal, não sendo produzidos extratos para realização do ensaio visando à avaliação de atividade antimicrobiana.

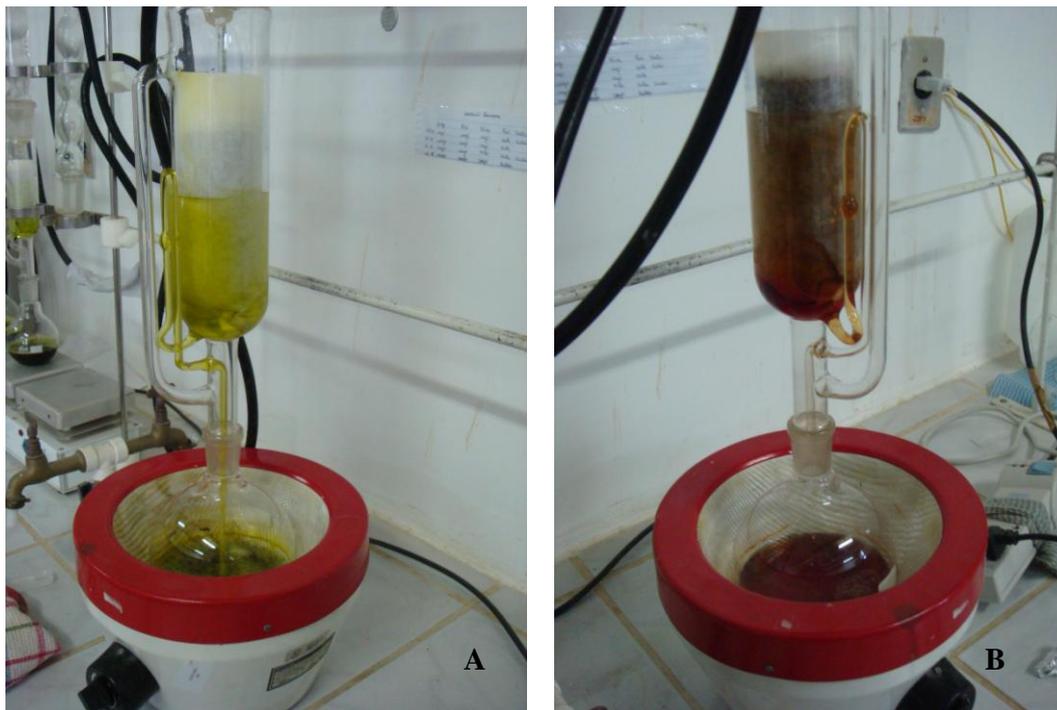


Figura 11: Extração a quente em aparelho Soxhlet das partes aéreas (A) e casca do caule (B) de indivíduos pertencente à espécie *Byrsonima coccolobifolia* Kunth.

3.3.3 Evaporação dos extratos

Após a produção dos extratos, os mesmos foram submetidos a um processo de rotaevaporação ou evaporação rotatória, com o objetivo de concentrá-los (SIMÕES et al., 2004). Para este procedimento foi utilizado um aparelho rotaevaporador que funciona através da produção de vácuo e banho de aquecimento. A partir do vácuo produzido por movimentos rotatórios, ocorreu a separação do extrato das partes da planta e dos solventes, os quais foram recuperados a partir deste processo e poderão novamente ser utilizados pelo laboratório após processo de destilação (figura 12).

3.3.4 Acondicionamento dos extratos concentrados

Os extratos, concentrados por rotaevaporação, foram transferidos para fracos de vidros etiquetados e com pesos previamente determinados em balança analítica e posteriormente foram levados em banho-maria para garantir a evaporação mais eficiente dos possíveis resíduos de solventes. Após total evaporação do solvente os

frascos contendo os extratos foram novamente pesados para avaliar o rendimento de cada extrato. Posteriormente esses foram acondicionados em geladeira até o momento da sua utilização, por aproximadamente um mês.



Figura 12: Concentração dos extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth em aparelho de evaporação rotatória.

3.3.5 Diluição dos extratos

Para diluição dos extratos de *Byrsonima coccolobifolia* a serem testados, foi utilizado balança analítica de precisão para a pesagem de 10mg, 20mg e 30 mg das porções obtidas das partes aéreas e casca do caule (figura 14), extraídas com diferentes solventes (metanol, acetato de etila, clorofórmio e etanol) e estas foram dissolvidos em 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Obtendo-se dezesseis extratos distintos para cada concentração como segue o esquema na figura 13. As concentrações de 10 mg/ml e 20 mg/ml foram utilizadas para realização do teste de concentração inibitória mínima descrita no item 3.5.2.3.

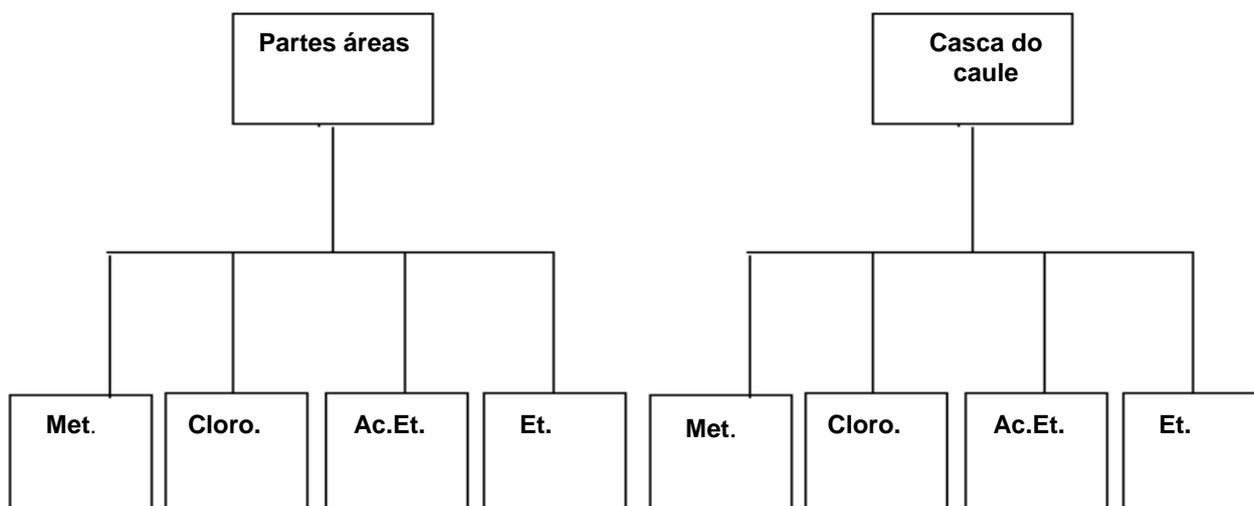


Figura 13: Esquema de diluição dos extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth.

Met. – extrato metanólico; **Cloro.** – extrato clorofórmico; **Ac. Et.** – extrato acetado de etila; **Et.** extrato bruto etanólico;

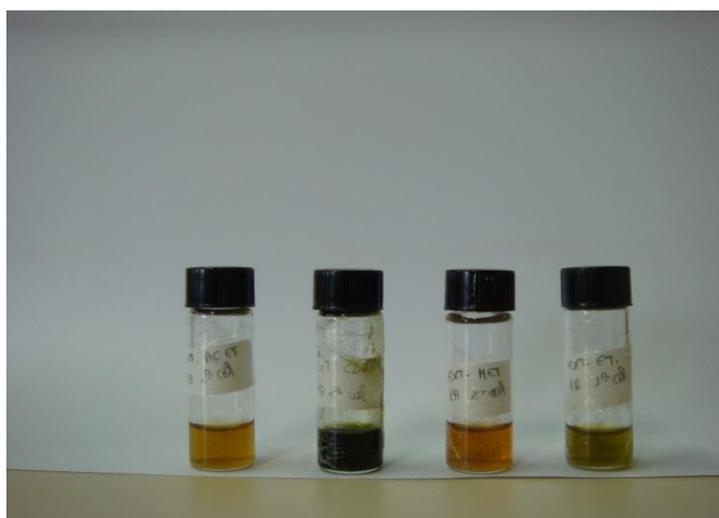


Figura 14: Extratos diluídos prontos para aplicação em discos blank.

3.4 Métodos de Screening Fitoquímico

Os testes de prospecção de constituintes em *B. coccolobifolia*, foram realizados em extrato hidroalcoólico, da fração metanólica obtida das partes aéreas e casca do caule. Foram realizados testes para detecção de fenóis e taninos; antocianinas, antocianidinas e flavonóides; leucoantocianidinas, catequinas e flavononas; flavonóis, flavononas, flavanonóis e xantonas; e confirmação de catequinas, seguindo a metodologia proposta por Matos (1998).

3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

3.5.1 Microrganismos testes

Foram utilizadas as seguintes cepas de bactérias: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, e um representante fúngico (levedura): *Candida albicans*, sendo estas, clínicas obtidas através do LACEN-RR, FIOCRUZ e algumas cepas padrão (ATCC), como seguem na tabela 3.

Tabela 3: Microrganismos utilizados para realização do bioensaio com extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth.

Clínica	Origem		Grupo
		ATCC	
-----		<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 / DAUFPE-86	Gram +
<i>Escherichia coli</i> (LACEN-RR)		<i>Escherichia coli</i> ATCC 0054	Gram -
<i>Escherichia coli</i> (CBAM/FIOCRUZ-AM) n° 38		Lote 0807554 Banco INCQS [*]	
<i>Serratia marcescens</i> (CBAM/FIOCRUZ-AM) n° 94		-----	Gram -
<i>Staphylococcus aureus</i> (LACEN-RR)		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 00015	Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i> (CBAM/FIOCRUZ-AM) n° 318		Lote 0806015 Banco INCQS [*]	
-----		<i>Candida albicans</i> ATCC 18804 Lote 0028 / UFRGS	Levedura

*INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; ATCC - American Type Culture Collection; LACEN-RR - Laboratório Central de Roraima; CBAM- Coleção de Bactérias da Amazônia.

3.5.2 Ensaios farmacológicos *in vitro*

As análises para avaliação da atividade antimicrobiana foram realizadas no laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Roraima, seguindo o método de Kirby e Bauer. A técnica baseia-se na inibição do crescimento de microrganismos na superfície do meio de cultura inoculado com microrganismos testes, através da utilização de discos de papel de filtro estéreis (discos Blank estéreis), impregnados com extratos de *B. coccolobifolia* (mirixi-caju). Sendo o resultado demonstrado através da formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano medindo-se o diâmetro com auxílio de régua milimetrada.

3.5.2.1 Procedimentos

As cepas testes de bactérias inicialmente foram semeadas em placa de Petri contendo ágar nutriente, enquanto que as fúngicas em placas contendo ágar Sabouraud, utilizando a técnica de esgotamento em placa (HENRY, 1995). Essas placas foram incubadas em estufa por um período de 24 horas com temperatura de 36°C. Posteriormente com o auxílio de uma alça bacteriológica retirou-se da superfície de cinco colônias com a mesma morfologia e inoculou-se em tubo de ensaio contendo 10 ml de solução salina estéril, até que fosse atingido a turbidez de 0,5 na Escala de McFarland, o que corresponde aproximadamente 10^8 UFC/ml. Concomitantemente a esse procedimento, foram aplicados 20 µl dos extratos solubilizados em DMSO (Dimetilsulfóxido) em cada disco blank com 6 mm de diâmetro (figura 15), o que corresponde a uma concentração em cada disco de aproximadamente 600 µg. Após estes procedimentos o inóculo bacteriano foi repicado utilizando a metodologia de placa cheia, usando swab, em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton, enquanto que as cepas fúngicas foram semeadas em ágar Sabouraud (figura 16).

3.5.2.2 Aplicação dos discos contendo os extratos

Cada placa de ágar Mueller Hinton e Sabouraud contendo o inóculo, bactérias e fungos respectivamente, receberam nove discos blank, impregnados com nove extratos distintos (figura 17). O procedimento foi realizado com três repetições, de

forma que havendo a formação do halo inibitório de crescimento do microrganismo, os diâmetros dos halos dos três discos de cada extrato foram somados e obtida a média como resultado final. Foram incubadas 6 placas para cada microrganismo à temperatura de 36 °C por 24 horas (KONEMAN et al., 2008).

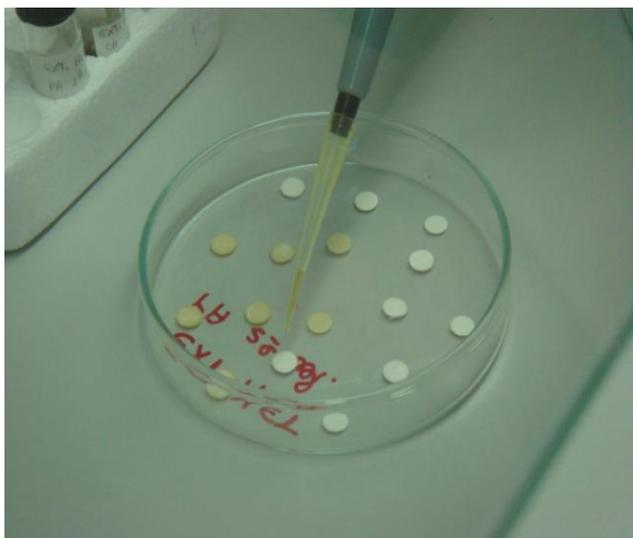


Figura 15: Aplicação do extrato de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth em discos blank.

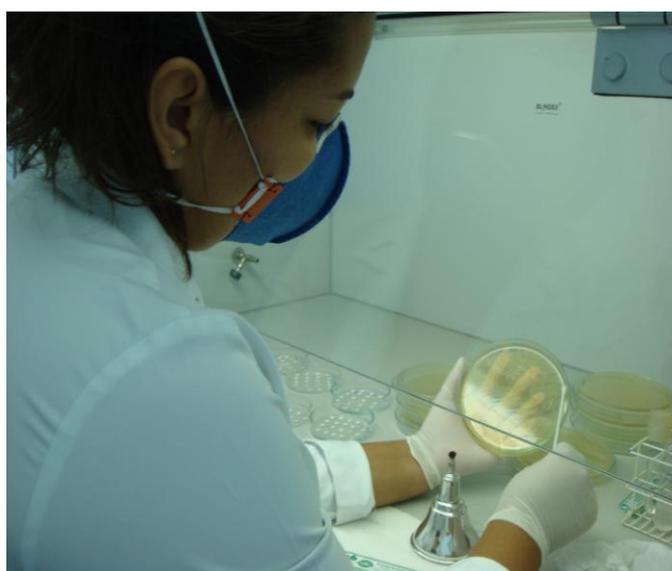


Figura 16: Inoculação dos microrganismos pela técnica de placa cheia com auxílio de Swab.



Figura 17: Aplicação dos discos blank já impregnado com extrato *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, em placas contendo o inóculo.

Os resultados foram expressos em intervalos de diâmetro de inibição de crescimento da seguinte forma: **1** - <9 mm, inativos; **2**- 9-12 mm, parcialmente ativos; **3** - 13-18 mm, ativo e **4** - > 18 mm, muito ativo, de acordo com Alves et. al., (2000), sendo estes obtidos pela média do diâmetro produzidos a partir dos extratos incluindo as duas fenofases (floração e frutificação), as quais foram realizadas as coletas (figura 18). Como controle negativo usou-se disco blank impregnado apenas com solvente empregado nas diluições dos extratos para garantir que não ocorra nenhuma interpretação de um possível resultado falso positivo, ou seja, inibição causada pelo solvente, e como controle positivo foram utilizados os antibióticos comerciais Penicilina G 10U (lote 70611067), Cefalexina 30µg (lote 70710027) e sulfazotrin 35µg – Sulfametazol + trimetopim (lote 70704019) todos produzidos pela Laborclin.

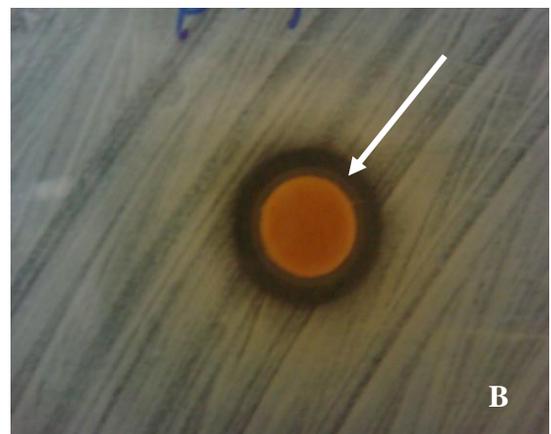
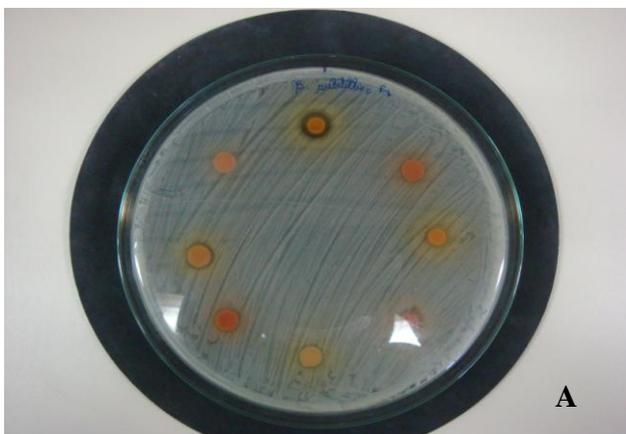


Figura 18: Ação dos discos impregnados com extrato de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth obtido a partir de parte aérea fração acetato de etila, geral (18A) e detalhe (18B).

3.5.2.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Segundo Konemam et al., (2008), o método de Concentração Inibitória Mínima, consiste em determinar a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível. Nesse sentido, os extratos com resultados inibitórios mais significativos passaram por sucessivos processos de diluição a partir da concentração padrão de 30 mg do extrato para 1 ml de solvente, o que significa aproximadamente 600 µg de extrato por cada disco, uma vez que cada disco possui 20 µl dos extratos. Sendo as demais concentrações de 20 mg e 10 mg respectivamente, após as diluições foram repetidos novamente os procedimentos descritos no item 3.5.2.1 e novamente foram realizadas as leituras do diâmetro dos halos inibitórios. As diluições sucessivas cessaram ao atingir a última concentração em que os extratos foram capazes de evidenciar ação antimicrobiana, ou seja, a formação do halo inibitório (OPLUSTIL et al., 2004).

3.6 Análise dos dados

Os dados foram analisados de forma preliminar visualmente através da medição do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano e pela determinação das médias, agrupando os dados, a eficiência dos extratos, das concentrações utilizadas e o comportamento das cepas ATCC e clínicas dos microrganismos foram comparadas através da análise de variância, e as diferenças mínimas significativas pelo teste Turkey a 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos extratos

O material previamente seco e moído teve seu peso determinado em balança analítica antes da extração, tendo rendimento de extrato conforme a tabela a baixo:

Tabela 4: Massa e rendimento médio das extrações a quente e a frio de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (partes aéreas e casca do caule).

Parte da planta	Hex.		Cloro.		Ac. Et		Met.		Et.	
	PA	CA	PA	CA	PA	CA	PA	CA	PA	CA
Peso (g)	8,10	1,24	1,1	0,44	31	7,17	31	16	10,4	36,6
Rendimento (%)	3,3	0,5	0,44	0,18	13	3	13	6,5	4,24	9,1

Hex.= Hexano; **Cloro.**= Clorofórmio; **Ac. Et.**= Acetato de Etila; **Met.**= Metanol; **Et.**= Etanol (extração a frio). **PA**= Partes aéreas; **CA**= Casca do caule.

O extrato etanólico – bruto - (a frio), obtido de partes aéreas a partir de 400 g de material seco teve rendimento aproximadamente 4% e casca do caule 9%. Dentre as extrações (hexânicas, clorofórmica, acetato de etila e metanólica) a quente, obtidas a partir de 245 g de material seco, as que apresentaram maior rendimento foi acetato de etila e metanólica, obtidas das partes aéreas de *B. coccolobifolia*.

4.2 Screening Fitoquímico

Os testes de screening fitoquímico de extratos metanólicos, obtido das partes aéreas e casca do caule de *B. coccolobifolia* (tabela 5), demonstram resultados positivos com reação forte para presença de taninos em ambos extratos, apresentando tonalidade azul escura que, segundo Matos (1998), indica a presença de taninos pirogálicos ou taninos hidrolisáveis (figura 19), resultado confirmado por Lorenzi et al., (2006), que submeteu extrato metanólico de folhas de *B. coccolobifolia* a partição líquido-líquido.



Figura 19: Reação de solução alcoólica obtida da casca do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth com cloreto férrico, ocorrendo variação de coloração de vermelho para tonalidade azul intenso.

Tabela 5: Resultados do screening fitoquímico de extratos metanólicos obtidos das partes aéreas e casca do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth.

Extrato / parte da planta		
Compostos	Partes aéreas	Casca do caule
Taninos e fenóis	+	+
Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	-	+
Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	-	+
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	+	+
Esteróides e triterpenóides	+	+
Saponinas	+	+

+: reação positiva; -: reação negativa.

O teste para identificação de antocianinas, antocianidinas e flavonóides em extrato metanólico de *B. coccolobifolia*, obtidos de partes aéreas mostrou-se negativo, porém segundo Matos (1998), a presença de alguns constituintes podem mascarar a reação levando a um resultado falso positivo. Porém no teste com extrato proveniente da casca do caule obtivemos resultado positivo (figura 20), confirmando com os dados obtidos por Lorenzi et al., (2006).

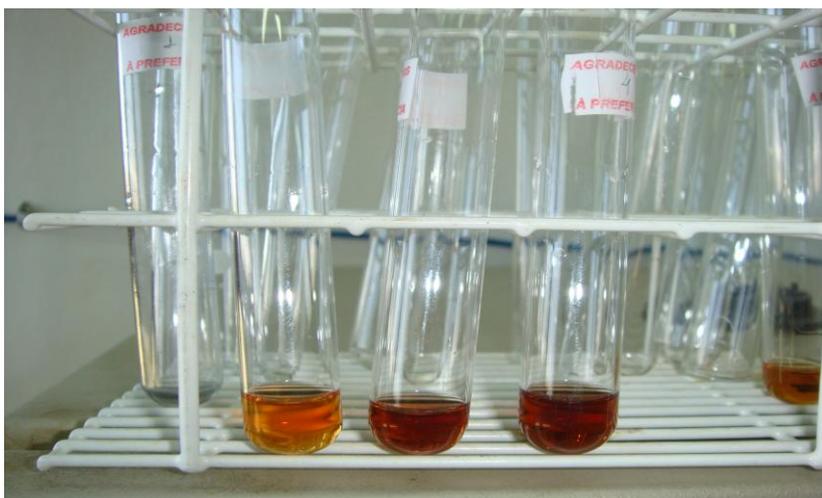


Figura 20: Reação positiva para presença de flavononóis, sendo demonstrada pela mudança de coloração atingindo a tonalidade vermelho-laranja.

Quando foram realizados os testes para detectar a presença de flavonóis, flavanonas, flavononóis e xantonas; esteróides e triterpenóides; e saponinas, de partes aéreas e casca do caule de *B. coccolobifolia*, foram detectados a presença de xantonas livres e heterosídeos, triterpenos pentacíclicos e esteróides livres (figura 21), mais uma vez coincidindo com os dados obtidos por Lorenzi et al., (2006) quando analisaram extratos metanólico e acetato de etila de folhas de *B. coccolobifolia*.

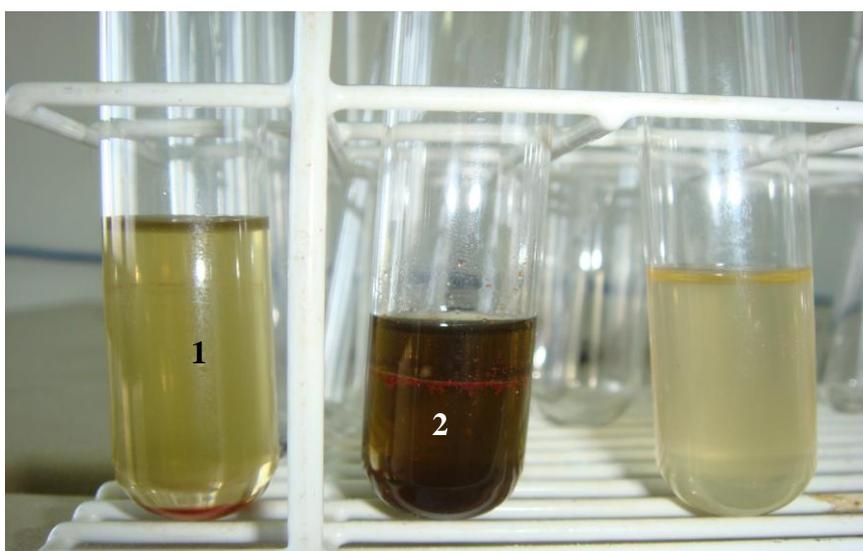


Figura 21: Reação positiva para presença de esteróides e triterpenóides, sendo mostrada no tubo 1, pela coloração verde permanente indicativa de esteróides livres: e tubo 2 coloração parda com precipitado vermelho indicando a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.

4.3 Ensaios farmacológicos *in vitro*

Dos extratos testados (metanólico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico) produzidos a partir das partes do material vegetal (partes aéreas e casca do caule) de indivíduos de *B. coccolobifolia*, os extratos metanólico, clorofórmico (figura 22) e acetato de etila (figura 23) apresentaram-se ativos (halo entre 13 – 18 mm), produzindo inibição de crescimento bacteriano.

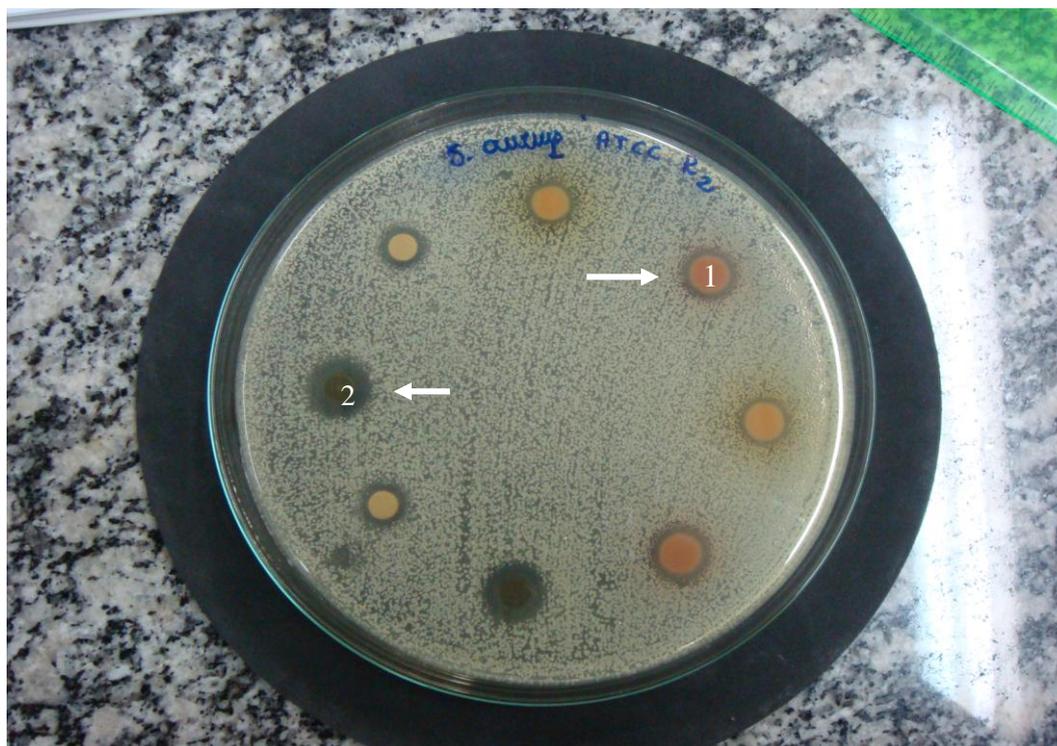


Figura 22: Ação dos discos impregnados com extratos metanólicos (1) e clorofórmico (2) de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (partes aéreas e casca do caule) frente à cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC).

As cepas *S. aureus* obtida do LACEN-RR não mostraram sensibilidade frente aos extratos obtidos de partes aéreas e casca do caule a partir de *B. coccolobifolia*, ou seja, esses extratos não produziram efeito inibitório significativo contra esse microrganismo, o que pode sugerir resistência dessa cepa, pois, sendo esta de origem clínica, modificações genéticas podem ocorrer em decorrência do uso inadequado de antibióticos. Afirmando essa hipótese observou-se que os antibióticos comerciais pertencentes a classes diferentes, ou seja, com mecanismo de ação distinto, utilizado como parâmetro positivo frente a esta mesma cepa, também não apresentaram atividade (tabela 6).

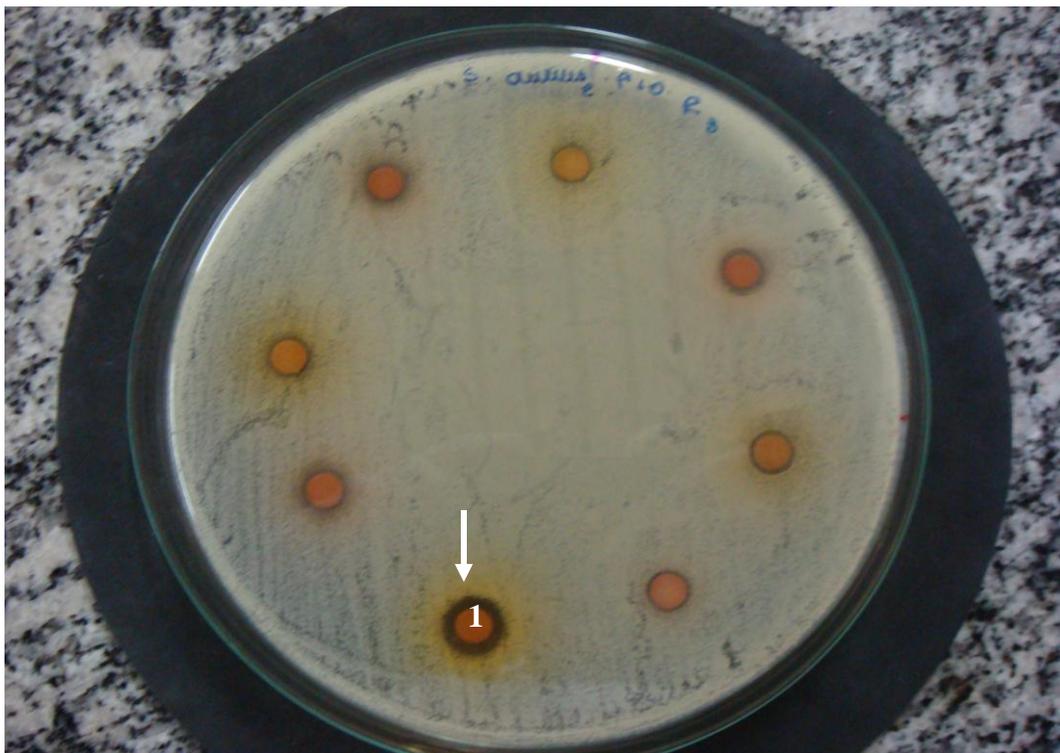


Figura 23: Ação dos discos impregnados com extratos acetato de etila (1) de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (partes aéreas e casca do caule) frente à cepa *Staphylococcus aureus* (FIOCRUZ).

Ao compararmos os resultados obtidos com os produzidos por *Himatanthus articulatus* testados por Costa (2006), observamos que os dados divergem, porém apesar das cepas serem provenientes da mesma instituição o período de obtenção das cepas foi diferente, e a origem também pode ter sido diferente já que a instituição não informa como foi obtida a amostra.

Os 16 extratos produzidos a partir de *B. coccolobifolia* quando testados sobre as cepas *S. aureus* obtidas da FIOCRUZ e ATCC, demonstraram atividade, gerando halos que variaram de 9 a 12 mm (parcialmente ativo) para primeira e 13 – 18 mm (ativo) para a segunda cepa respectivamente, sendo considerados dessa forma como extratos positivos. Dados descritos por Michelin et al., (2008), coincidiram com os obtidos neste trabalho, quando os mesmos testaram extratos metanólico e metanólico 80% provenientes de folhas de três espécies do gênero *Byrsonima* (*B. fagifolia*, *B. intermedia* e *B. basiloba*), frente a *S. aureus*, sendo as concentrações dos extratos utilizadas por esses autores foram de 50 mg/ml, 75 mg/ml e 100 mg/ml, bastante superior as utilizadas neste trabalho quando foi obtido extratos de *B. coccolobifolia*, demonstrando maior eficiência deste uma vez que, foram utilizados

para realização dos testes apenas 30 mg/ml, e o diâmetro dos halos foram semelhantes estando inseridos no intervalo de 10 a 14 mm.

Tabela 6: Ação dos extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth frente às cepas de *S.aureus* obtidas de três origens diferentes.

Extrato 30mg/ml	Partes da planta	Cepas		
		<i>Staphylococcus aureus</i>		
		LACEN	FIOCRUZ	ATCC
Metanólico	PA	1	2	2
	CA	1	3	3
Clorofórmico	PA	1	1	3
	CA	1	1	3
Acetato de Etila	PA	1	2	2
	CA	1	3	2
Etanólico	PA	1	2	2
	CA	1	2	2
Antibiótico comercial	Penicilia G	1	4	4
	Cefalexina	1	4	4
	Sulfazotrin	1	4	4

1 - < 9 mm, inativo; 2 – 9 -12 mm, parcialmente ativo; 3 – 13-18 mm, ativo; 4 - > 18 mm, muito ativo. **PA=** Partes aéreas; **CA=** Casca do caule.

Quando comparamos o diâmetro do halo produzido pelos extratos obtido de diferentes partes da planta (parte aérea e caule), podemos perceber que o extrato metanólico apresentou diferença significativa tendo o extrato proveniente do caule produzindo maior atividade inibitória quando comparado com o extrato obtido da parte aérea, sendo isto demonstrado na tabela 4 quando avaliados na presença das cepas *S. aureus* FIOCRUZ e ATCC, fato este que pode ser explicado presença de diferentes compostos químicos presente na casca do caule e ausente nas partes aéreas de *B. coccolobifolia* como podemos observar na tabela 5, sendo estes possivelmente responsáveis pelo aumento da atividade.

Os extratos de *B. coccolobifolia* testados contra as cepas de *E. coli*, não apresentaram atividade inibitória (figura 24 e 25).

Tabela 7: Ação dos extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth frente às cepas de *E. coli* obtidas de três origens diferentes.

Extrato 30mg/ml	Partes da planta	Cepas <i>Escherichia coli</i>		
		LACEN	FIOCRUZ	ATCC
Metanólico	PA	1	1	1
	CA	1	1	1
Clorofórmico	PA	1	1	1
	CA	1	1	1
Acetato de Etila	PA	1	1	1
	CA	1	1	1
Etanólico	PA	1	1	1
	CA	1	1	1
Antibiótico comercial	Penicilia G	1	4	4
	Cefalexina	1	4	4
	Sulfazotrin	1	4	4

1 - < 9 mm, inativo; 2 - 9 -12 mm, parcialmente ativo; 3 - 13-18 mm, ativo; 4 - > 18 mm, muito ativo; **PA= Partes aéreas; CA= Casca do caule.**

Coincidindo com os resultados obtidos por Alves et al., (2000), que além de extratos de outras plantas do cerrado brasileiro, testou também *B. coccolobifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. curvula*, *B. virgiloides*, *B. gaudichaudii*, *B. intermedia* e *B. verbasifolia*. Costa (2006) testou extratos obtidos de *H. articulatus*, e não obteve resultado satisfatório contra essa mesma espécie. Quando comparamos os resultados obtidos dos extratos de *B. crassifolia* (VAZQUEZ et al., 1998) obtidos da parte aérea da planta, coincidimos com os resultados obtidos.

Esses dados podem sugerir que tal resultado esta relacionado à constituição que esta cepa bacteriana possui em sua parede celular, pois sendo uma bactéria Gram (-), dotada de uma membrana plasmática interna e outra externa e entre as duas uma camada de peptidoglicano, membrana, muito mais complexa quando comparada com a parede celular das bactérias Gram (+), que confere a estas uma certa resistência e por sua vez atuam dificultando a penetração dos extratos testados.

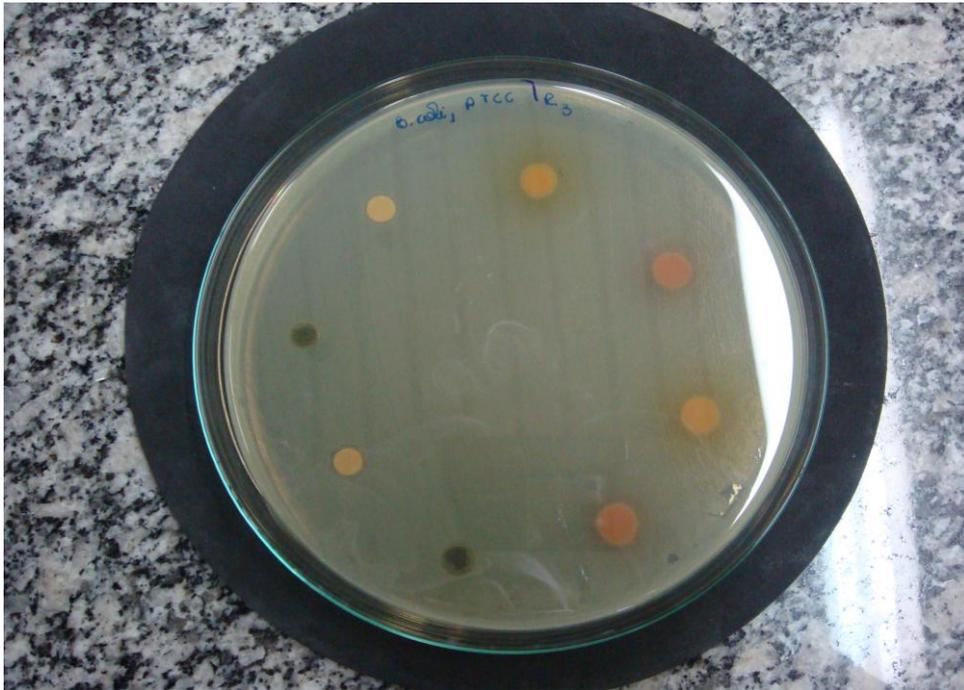


Figura 24: Ausência de atividade dos discos impregnados com extratos metanólico e clorofórmio de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, sendo partes aéreas e casca do caule frente à cepa *Escherichia coli* (FIOCRUZ).



Figura 25: Ausência de atividade dos discos impregnados com extratos acetato de etila e etanólico *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, sendo partes aéreas e casca do caule frente à cepa *Escherichia coli* (FIOCRUZ).

Com relação aos extratos testados contra a bactéria *B. subtilis*, não foram observados halos de inibição significativo (tabela 8), sendo formados halos menores que 9 mm de diâmetro (figura 26), o que converge aos resultados obtidos por Vasquez et al., (1998), onde foi observado que extrato metanólico proveniente da casca de *B. crassifolia* não apresentou atividade para o mesmo microrganismo. No entanto Lopez et al., (2001), quando realizaram screening biológico de 24 extratos de plantas medicinais utilizadas na Colômbia, por apresentarem atividade anti-viral e antimicrobiana, descreveram como positivo os testes realizados com extratos obtidos de folhas e raízes de *B. verbascifolia* contra *B. subtilis*; Costa (2006) também obteve resultado positivo quando testou extratos de *H. articulatus* frente ao mesmo microrganismo.



Figura 26: Ação dos discos impregnados com extrato clorofórmico de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, de casca do caule frente à cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC).

S. marcescens assim como *E. coli*, faz parte do grupo de bactérias Gram (-), e quando submetidas aos testes com extratos de *B. coccolobifolia* não apresentaram inibição de crescimento em nenhum dos 16 extratos produzidos (figura 27) e, como mostra a tabela 9, reafirmam a hipótese de resistência de caráter fisiológico pertencente ao grupo de bactérias Gram (-).

Tabela 8: Ação dos extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth frente à cepas de *Bacillus subtilis*.

Extrato 30mg/ml	Partes da planta	Cepas <i>Bacillus subtilis</i> ATCC
Metanólico	PA	1
	CA	1
Clorofórmico	PA	1
	CA	1
Acetato de Etila	PA	1
	CA	1
Etanólico	PA	1
	CA	1
Antibiótico comercial	Penicilina G	4
	Cefalexina	4
	Sulfazotrin	4

1 - < 9 mm, inativo; 2 - 9 -12 mm, parcialmente ativo; 3 - 13-18 mm, ativo; 4 - > 18 mm, muito ativo. **PA=** Partes aéreas; **CA=** Casca do caule.

Tabela 9: Ação dos extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth frente à cepas de *Serratia marcescens*.

Extrato 30mg/ml	Partes da planta	Cepas <i>Serratia marcescens</i> ATCC
Metanólico	PA	1
	CA	1
Clorofórmico	PA	1
	CA	1
Acetato de Etila	PA	1
	CA	1
Etanólico	PA	1
	CA	1
Antibiótico comercial	Penicilina G	1
	Cefalexina	4
	Sulfazotrin	4

1 - < 9 mm, inativo; 2 - 9 -12 mm, parcialmente ativo; 3 - 13-18 mm, ativo; 4 - > 18 mm, muito ativo. **PA=** Partes aéreas; **CA=** Casca do caule.

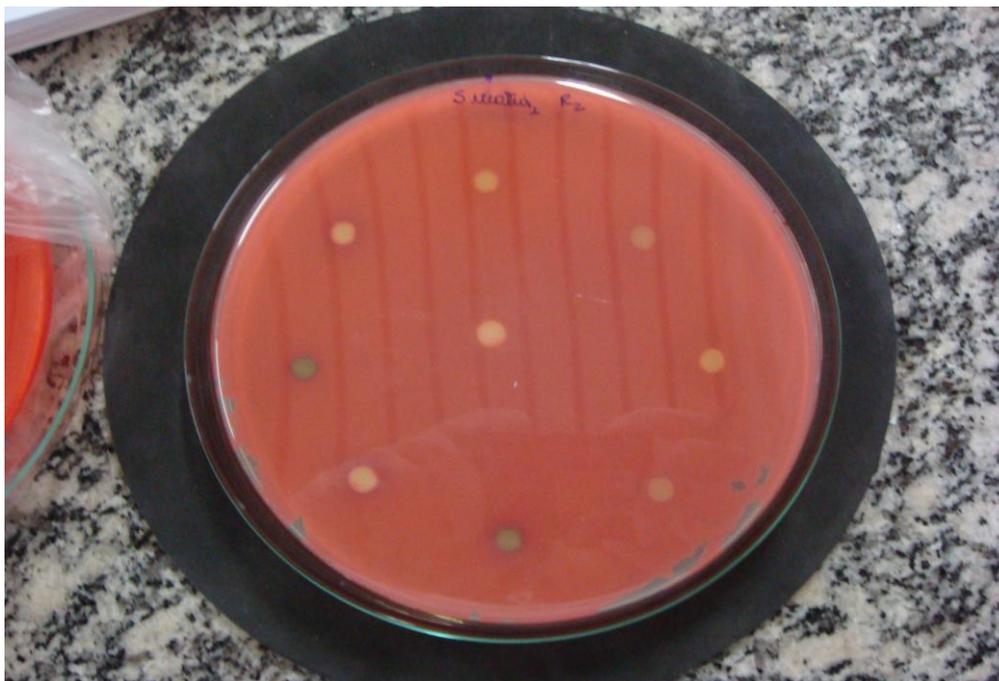


Figura 27: Ausência da ação dos discos impregnados com extratos metanólico e clorofórmio de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth, sendo partes aéreas e casca do caule frente à cepa *Serratia marcescens* (ATCC).

Tabela 10: Ação dos extratos de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth frente a cepas de *Candida albicans*.

Extrato 30mg/ml	Partes da planta	Cepas <i>Candida albicans</i> ATCC
Metanólico	PA	2
	CA	2
Clorofórmico	PA	2
	CA	2
Acetato de Etila	PA	2
	CA	2
Etanólico	PA	2
	CA	2

1 - < 9 mm, inativo; 2 - 9 -12 mm, parcialmente ativo; 3 - 13-18 mm, ativo; 4 - > 18 mm, muito ativo. PA= Partes aéreas; CA= Casca do caule.

Dos extratos produzidos (metanólico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico), testados frente à levedura *C. albicans*, todos apresentaram parcialmente efetivos com diâmetros variando 9 – 12 mm (tabela 10). As partes da planta (partes

aéreas e casca do caule), utilizados para obtenção dos extratos se comportaram de maneira semelhante produzindo halos com diâmetro muito próximos e assim situados no mesmo intervalo de atividade, podendo ser pela presença de taninos em toda a planta o que segundo Scalbert (1991), pode ser tóxico para fungos filamentosos e leveduras, demonstrando assim, um aspecto promissor desses extratos para fins farmacológicos.

Os dados obtidos no presente trabalho coincidem com os dados apresentados por Costa (2006) que testou extratos de *H. articulatus* e com Caceres et al., (1993) que testou extratos de *Bixa orellana* e *B. crassifolia*, frente a *C. albicans*, diferenciando apenas nas concentrações empregadas no teste. Porém, há divergência de resultados quando comparamos com os resultados obtidos por Lopez et al., (2001), que não encontraram nenhuma atividade quando testados extratos metanólicos de *B. verbacifolia* e *Solanum sp.* frente a essa levedura. Os resultados aqui obtidos também divergem dos dados obtidos por Silva et al., (2007), que testou extratos alcoólicos obtidos da casca de *Anacardium occidentale*, e não obteve nenhuma atividade frente a este patógeno.

4.4 Concentração Inibitória Mínima

Os extratos de *B. coccolobifolia* obtidos de parte aérea, mostram-se efetivos em concentrações a partir de 20 mg/ml (CIM), a exceção o proveniente da extração com acetato de etila que mostrou-se efetivo nas três concentrações analisadas, quando testados frente a cepas de *S. aureus* FIOCRUZ. Estes resultados foram demonstrados claramente através da análise de médias e teste de Turkey a 5% (figura 28).

O maior halo produzido quando testado frente a cepas de *S. aureus* FIOCRUZ, foi na concentração de 30 mg/ml com o extrato de acetato de etila obtido da casca do caule de *B. coccolobifolia*, sendo em média 14 mm e por sua vez considerado ativo, demonstrando eficiência deste extrato frente a este microorganismo (figura 29).

Esquenazi et al., (2002), encontraram atividade inibitória positiva contra *S. aureus*, utilizando extratos aquosos de *Cocos nucifera* L. em uma concentração de 10 mg/ml; enquanto Caceres et al., (1993), utilizando extratos metanólicos de *Bixa orellana* L. obtiveram resultado positivo com uma CIM maior que 10 mg/ml.

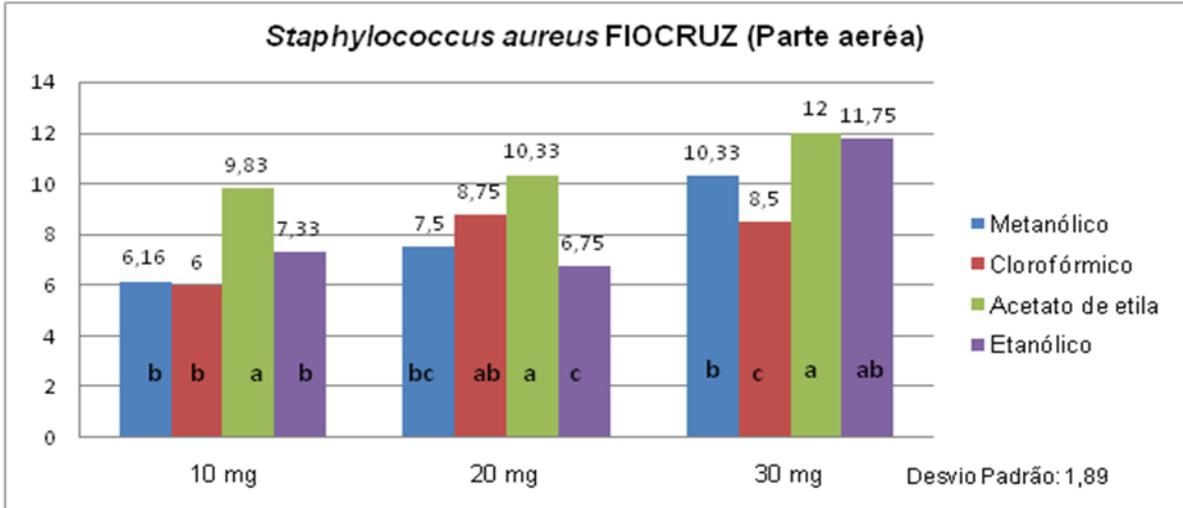


Figura 28: Ação dos extratos das partes aéreas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (FIOCRUZ). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey a 5%.

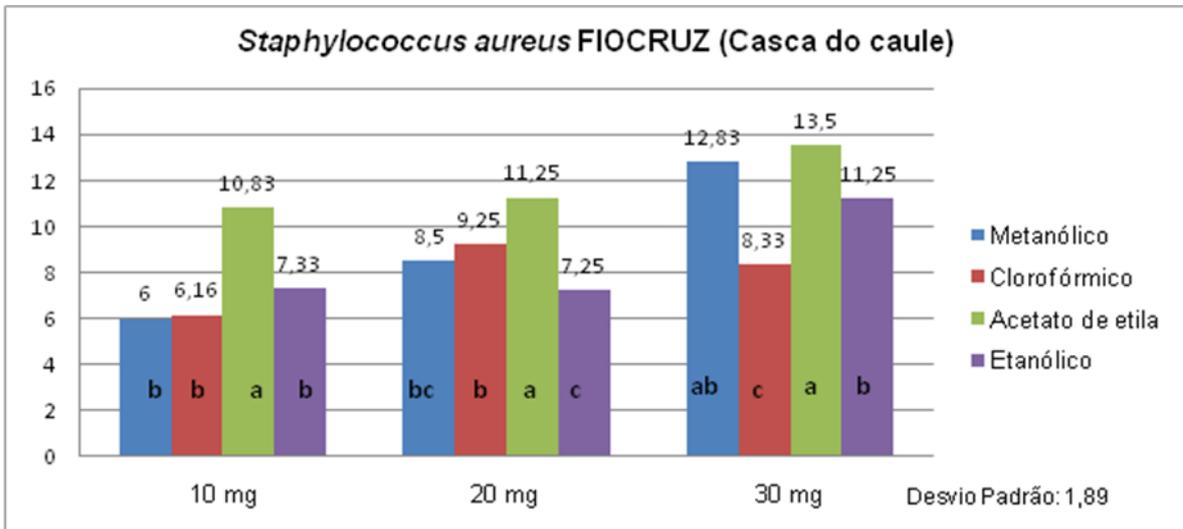


Figura 29: Ação dos Extratos da casca do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (FIOCRUZ). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey a 5%.

Quando analisamos cepas *S. aureus* ATCC, os extratos se comportaram de maneira ativa em sua maioria, com exceção do extrato etanólico nas concentrações

10 e 20 mg/ml, tanto obtidos de partes aéreas (figura 30) quanto os obtidos da casca do caule (figura 31).

Os extratos de *B. coccolobifolia* que mais se mostraram ativos frente a *S. aureus* ATCC, foram clorofórmico a 30 mg/ml, tanto das partes aéreas quanto da casca do caule e além do metanólico obtido da casca do caule na mesma concentração.

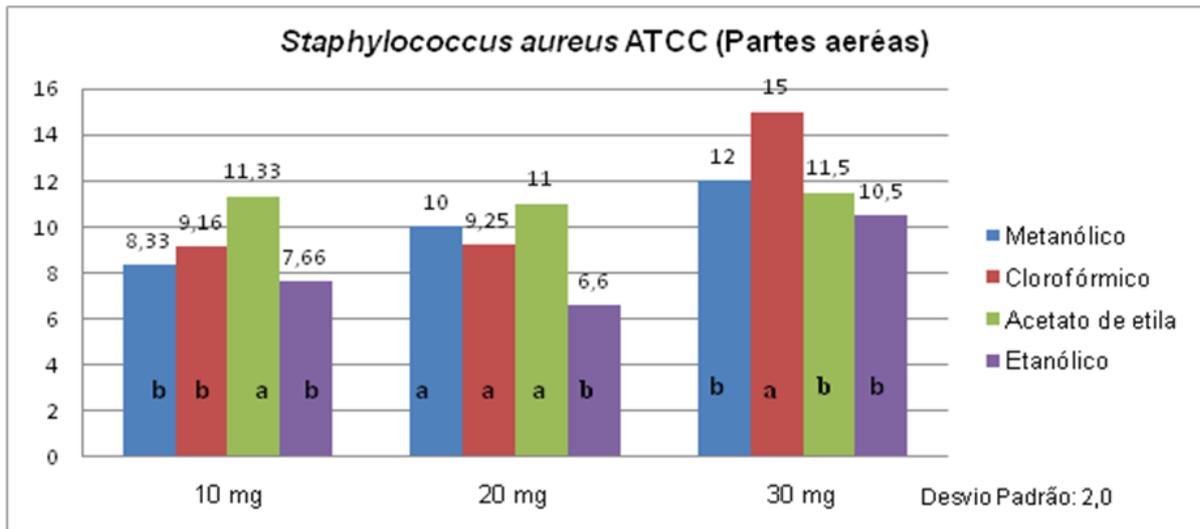


Figura 30: Ação dos extratos das partes aéreas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey a 5%.

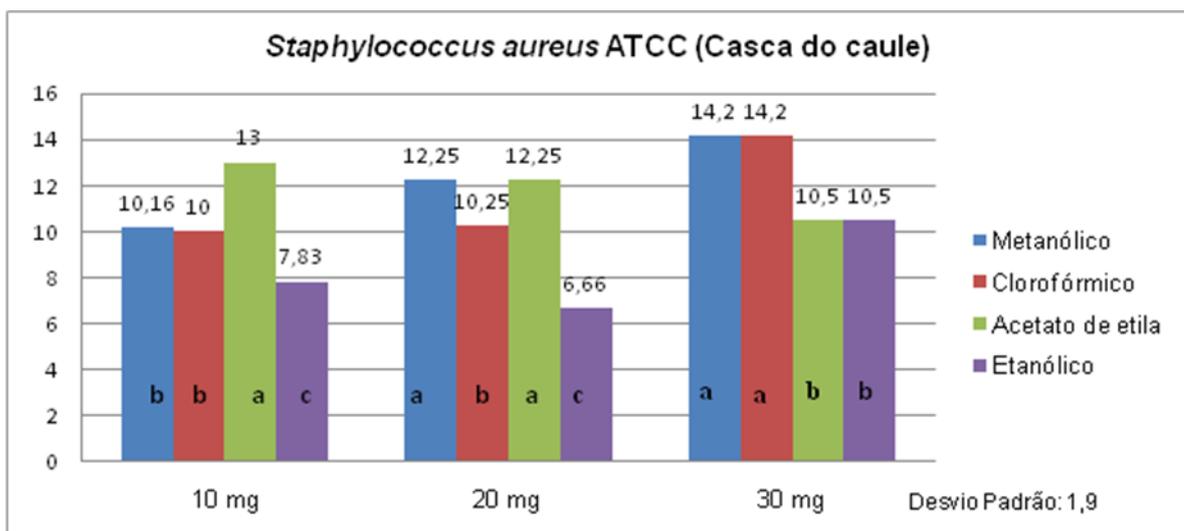


Figura 31: Ação dos extratos da casca do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey a 5%.

Dados apresentados por Michelin et al., (2008), coincidiram com os obtidos neste trabalho, quando os mesmos testaram extratos metanólico provenientes de folhas de três espécies do gênero *Byrsonima* (*B. fagifolia*, *B. intermedia* e *B. basiloba*), frente a *S. aureus*, porém as concentrações dos extratos utilizadas por aqueles autores foram de 50 mg/ml, 75 mg/ml e 100 mg/ml, sendo por sua vez bastante superior as utilizadas neste estudo, demonstrando maior eficiência destes, uma vez que, para realização dos testes a concentração máxima utilizada foi de apenas 30 mg/ml, e o diâmetro dos halos foram semelhantes estando inseridos no intervalo de 10 a 14 mm. Comportamento semelhante foi apresentado pelas cepas de *S. aureus* (FIOCRUZ e ATCC).

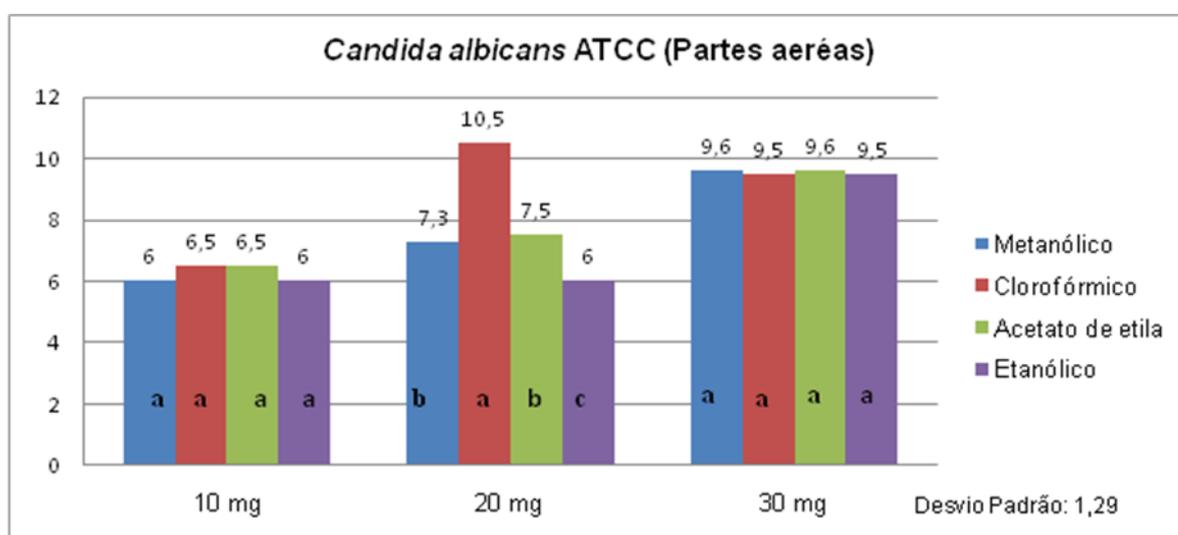


Figura 32: Ação dos extratos de partes aéreas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente a cepas de *Candida albicans* (ATCC). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey a 5%.

Os extratos *B. coccolobifolia*, quando testados frente ao representante fúngico a diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg), somente apresentou atividade na concentração de 30 mg/ml (figura 32). A exceção foi o extrato clorofórmico que apresentou média equivalente aos produzidos na maior concentração testada (30 mg), produzindo halos de em média 10 mm de diâmetro não diferindo significativamente quando analisado as médias através pelo teste Turkey à 5% (figura 33).

Ao compararmos esses resultados com os obtidos por Caceres et al., (1993), que testaram extratos metanólicos de espécies do cerrado, como *Bixa orellana* e *B. crassifolia*, contra *C. albicans*, estes obtiveram halo de inibição de 10 mm em concentração de 10 mg/ml; Costa (2006), obteve halos inibitórios de 19 mm quando utilizou a concentração de 10 mg/ml e 17 mm quando utilizou 5 mg/ml.

Já Michelin et al., (2008), quando testaram extratos metanólicos de folhas de espécies do gênero *Byrsonima* (*B. basoliba*, *B. intermedia* e *B. fagifolia*), utilizando concentrações de 50 mg/ml, 75 mg/ml e 100 mg/ml, descreveram halos com diâmetros que variaram de 7,5 mm a 9,0 mm de diâmetro contra *C. albicans*. Sendo assim demonstra que os resultados obtidos a partir de extratos de partes aéreas e casca do caule de *B. coccolobifolia*, foram superiores, haja vista que a produção de halos inibitórios foi em torno de 10 mm de diâmetro utilizando a concentração de 10 mg/ml como foi observado quando testados extratos obtido de casca do caule.

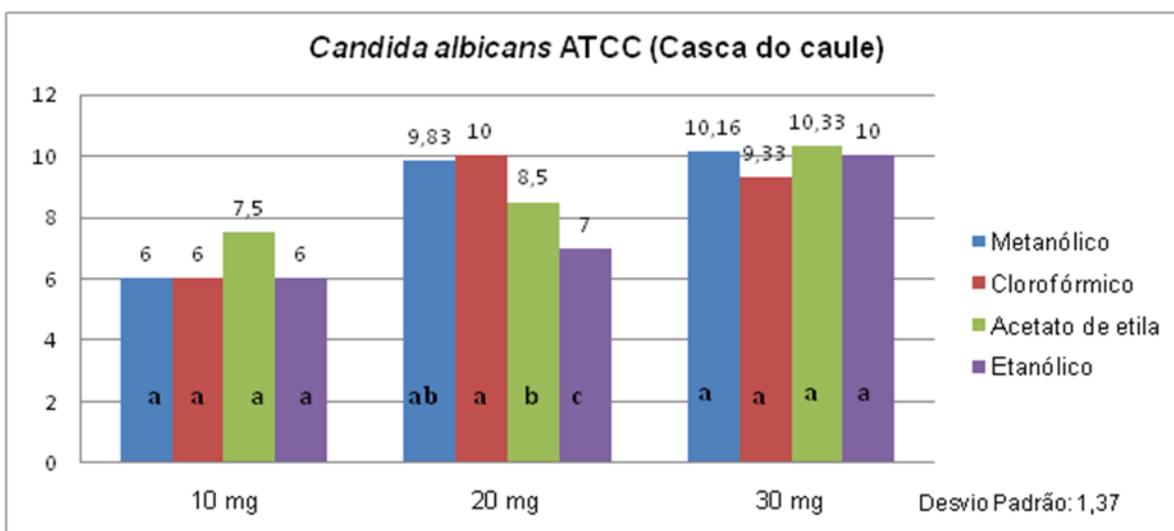


Figura 33: Ação dos extratos da casca do caule de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth sob diferentes concentrações (10, 20 e 30 mg/ml) frente a cepas de *Candida albicans* (ATCC). Médias seguidas da mesma letra dentro do mesmo conjunto de barras (mesma concentração) não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Turkey a 5%.

Quando testou-se os extratos de *B. coccolobifolia* frente à *C. albicans* na concentração de 30 mg/ml a qual apresentou maior efetividade, estes por sua vez não diferiram significativamente quanto ao tipo de extração nem perante a parte da planta utilizada.

5 CONCLUSÕES

Os extratos metanólico e acetato de etila provenientes da casca do caule de *B. coccolobifolia* são os que apresentaram maior inibição de crescimento bacteriano;

A maioria dos extratos testados (aproximadamente 75%) se mostrou ativo contra as cepas Gram-positivas, em especial *S. aureus*, o que é muito importante por se tratar de um microrganismo causador de patologias graves e na maioria das vezes de difícil tratamento;

Nenhum dos extratos testados apresentou atividade inibitória sobre as espécies bacterianas testadas do grupo Gram-negativo;

Os extratos testados frente à *C. albicans* apresentaram parcialmente ativos, não diferindo entre as partes da planta utilizada nem o solvente empregado para preparação do extrato.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G.L.; FRANCO, M.R.B. Headspace gas chromatography–mass spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). **Journal of Chromatography**, Campinas, v.985, n.1, p.297–301, jan. 2003.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. Mem. **Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.3, p.367-373, maio/jun. 2000.
- AMARQUAYE, C.T. CHE, E. BEJAR, M.H. MALONE and H.H.S. FONG, A new glycolipid from *Byrsonima crassifolia*, **Planta Med.** v.60, p. 85–86, 1994.
- AVANCINI, C. A.; WIEST, J. M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccaris trimera* (Less.) D. C. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 230 -234, 2000.
- BALICK, M. J.; COX, P. A. **Plants, people and culture. The science of ethnobotany**. New York: Scientific American Library, 1997.
- BARBOSA, R.I.; MIRANDA, I.S. Fitofisionomias e diversidade vegetal de savanas de Roraima. In: FEMACT. **Savanas de Roraima – Etnoecologia, Biodiversidade e Potencialidades Agrossilvipastoris**. Boa Vista: FEMACT, 2005. p. 61-78.
- BARBOSA, R.I.; MOURÃO JR., M.; CASADIO, G.M.L.; SILVA, S.J.R. da; **Fenologia do Mirixi-caju [*Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (*Malpighiaceae*)] em áreas de savana aberta do Estado de Roraima**. Boa Vista: EMBRAPA, 2005. (Comunicado técnico, 13).
- BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHE, C. T.; MALONE, M. H.; FONG, H. H. S. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **International Journal of Pharmacognosy A**, Washington, v.33, n.1, p.25-32. mar.1995.

BENEZAR, R. M^a. C.; PESSONI, L. A. Biologia floral e sistema reprodutivo de *Byrsonima coccolobifolia* (Kunth) em uma savana amazônica. **Acta Amazonica**. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-59672006000200005>. Acesso em: 06 jun. 2008.

BRUSCHI, M. L.; FRANCO, S. L.; NOVELLO, C. R. Projeto de manipulação e desenvolvimento de medicamentos e correlatos a base de plantas na disciplina de farmacotécnica. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 16, 2000. Recife. **Livros de Resumos**. Recife: XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2000. v. 1. p. 218 -218.

CACERES, A.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M.; SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases .2. Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Guatemala, v.39, n.1, p.77-82, mai.1993.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz. J. Med. Biol. Rev.**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAVALCANTE, P. B.; FRIKEL, P. **A farmacopéia tiriúó- estudo etno-botânico**. Belém: Falangola, 1973.

CHABOT, S.; BEL-RHLID, R.; CHENEVERT, R. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus. *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂ – enriched conditions. **New Phytology**, Canada, v.122, p. 461-467, mar. 1992.

COHEN, M..L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, Washington, v.257, n.5073, p.1050-1055, ago.1992.

COSTA, B. S. **Estudo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de *Sucuba Himatanthus articulatus* (VAHL) Wood**. 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em

Recursos Naturais) – Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais – PRONAT, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2006.

COUTO, R. C.; PEDROSA, J. M. G; NOGUEIRA, J. M. **Infecção hospitalar: epidemiologia, controle, gestão**. 2. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELENA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.14, n.1, p.6-8, jul./set. 2004.

ELISABETSKY, E.; CASTILHOS, Z. C. Plants used as analgesic by Amazonian caboclos as a basic for selecting plants for investigation. **International Journal of Crude Drug research**, v. 28, p. 309-320, 1990.

ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B. F.; SILVA, A. J. R.; ALVIANO, C. S. Antimicrobial and Antiviral Activities of Polyphenolics from *cocos nucifera* Linn. (Palmae) Husk Fiber Extract. **Research in Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 153, p. 647-52, out. 2002.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Porto Alegre, v. 42, n.3, jul./set., 2006.

FIGUEIREDO, M. E.; MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; SILVA, M. A.; SANTOS, L.; ALMEIDA, L. F. R.; BRITO, A. R. M. S.; SALGADO, H. R. N.; VILEGAS, W. Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.41, n.1, p.79 -83, jan./mar. 2005.

GARCIA, E. S.; GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Diversidade, fitoterápicos e fitofármacos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. UFSC/UFMS, 2004, 5. ed., p. 13-28.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos por Métodos Laboratoriais**. 18. ed. São Paulo: Manole, 1995.

JAWETZ, E.T.; MELNICK, J.; ADELBERG E. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1968. 15-17p.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; WINN-JR, W.C.; JANDA, W.J.; PROCOP, G.W.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G.L. **Diagnóstico microbiológico** - Texto e atlas colorido. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOROKOLVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química farmacêutica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

LANS, C.; BROWN, G. Observations on ethnoveterinary medicines in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, Trinidad and Tobago, v.35. p. 125-142, mai. 1998.

LIMA, M.R.F.; XIMENES, C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G.; The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16, n.3, p.300-306, jul./set. 2006.

LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Vancouver, v.77, p. 189-196, out. 2001.

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

LORENZI, K. C.; RODRIGUES, C. M.; SANNOMIYA, M.; ALMEIDA, L. F. R. de; BRITO-SOUZA, A. R. M.; VILEGAS, W. V. Estudo químico das folhas de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth. (Malpighiaceae). In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 2006. Disponível em: <<http://sec.sbq.org.br/cd29ra/resumos/T0789-1.pdf>>. Acesso em: 8 mar. 2009.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M. de; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 2000.

MATOS, F. J. de A. **Farmácias vivas**. 3.ed. Fortaleza: UFC, 1998.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P.; DAVID, J. P. Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.2, p.185- 188, mar./abr. 1999.

MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M. E. F.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C. dos; BRITO-SOUZA, A. R. M.; VILEGAS, W. V.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima species* (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, p. 680-695, dez. 2008.

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V.; Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, n.4, p.316-320, out./dez. 2005.

MURRAY, P.R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington: ASM Press, 1999.

NASCIMENTO, G.G.; LOCATELLI J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plants extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.** São Paulo, v.31, p.247-256, out./dez. 2000.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas Tóxicas – Conhecimento e Prevenção de Acidentes**. Ribeirão Preto: Holos, 2003.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. **Procedimentos básicos em Microbiologia Clínica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS-FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.13, n.1, p.21-24, abr./jun. 2003.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RASTRELLI, L.; DETOMMASI, N.; BERGER, I.; CACERES, A.; SARAVIA, A.; DE SIMONE, F. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, Italy, v.45, n.4, p.647-650, jun. 1997.

REZENDE, C.M.; FRAGA, S.R.G. Chemical and Aroma Determination of the Pulp and Seeds of Murici (*Byrsonima crassifolia* L.). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.14, n.3, p.425-428, maio/jun. 2003.

RIBEIRO, J. E. da S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. da S.; BRITO, J. M. de; SOUZA, M. A.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E.da C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**, Manaus: INPA, 1999.

ROBERTIS; ROBERTIS, Jr. **Bases da Biologia Celular e Molecular**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, 1993.

SANAIOTTI, T. M. **The woody flora and soil of seven Brazilian Amazonian dry savanna areas**. 1996. 145f. Tese (Ph.D- Department o Biological and Molecular Sciences), University of Stirling, Scotland,1996.

SANNOMIYA, M.; FONSECA, V. B.; SILVA, M.A.; ROCHA, L.R.M.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C.A.; BRITO A. R. M. S.; VILEGAS, W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Chromatography A**, São Paulo, v.985, n.1, p. 297–301. set./dez.2005.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C.M.; COELHO, R.G.; SANTOS, L. C.; HIRUMALIMA, C.A.; BRITO, A.R. M. S.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa Niedenzu (IK)*. **Journal of Chromatography A**, São Paulo, v.1035, p.47–51. jun. 2004.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC/UFSM, 2007, 6. ed., p. 403-434.

SANTOS, S. C.; DE MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC/UFSM, 2004, 5. ed., p. 323-354.

SATO, M.; FUJIMWARA, S.; TSUCHIYA, H. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Gifu, v.54, p. 171-176, jul. 1996.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Great Britain, v. 30, p. 3875 – 3883, mai.1991.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC/UFSM, 2007, p. 711-740.

SCHMITT, A. C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz (folha-da-fortuna) colhida em Várzea Grande, Mato Grosso, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 31, p. 55-58, dez. 2003.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium*

occidentale Linn. em amostras multiresistentes de *staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Recife, v. 17, n.4, p.572-577, out./dez.2005.

SILVEIRA, C. F. S. ***Zanthoxylum rhoifolium* Lamarck (Rutaceae): Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica.** 1997. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica), Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 1997.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6. ed. Porto Alegre - Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul.** Porto Alegre. Universidade/ UFRGS, 1995.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa – São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

STRATTON, C. W. Nuances in antimicrobial susceptibility testing for resistant gram-positive organisms. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter.** Nashville, v.18, n.08, p.57-64. abr./ago. 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

UCKO, D. A. **Química para as Ciências da Saúde.** 2 ed. São Paulo: Manole, 1992.

VASQUEZ, M. N.; NAGEM, T. A.; OLIVEIRA, T. T. β Dehidroplumericinic acid from *Himatanthus phagedaenicus*. **Biochemical Systematics and Ecology.** Brazil, v. 27, p. 669-671, nov. 1998.