UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CRISTIANE KARINA MALVEZZI

**Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos
biofármacos: estudo dos extratos brutos e suas associações**

Lorena – SP
2010

CRISTIANE KARINA MALVEZZI

**Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos:
estudo dos extratos brutos e suas associações**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração: Conversão de Biomassa.

Orientador: Dr. Silvio Silvério da Silva

Co-Orientador: Dr. George Jackson de M. Rocha

Lorena – SP
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Malvezzi, Cristiane Karina

Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo dos extratos brutos e suas associações / Cristiane Karina Malvezzi; orientador Sílvio Silvério da Silva, co-orientador George Jackson de M. Rocha. – Lorena: 2010.

113 pág. : fig.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Extrato de Plantas 2. Xilitol 3. Atividade antimicrobiana 4. Sinergismo. I.
Título

663.1 - CDU

Ao meu sogro Sr. Dalto José da Silva, que morreu aos 54 anos durante a execução deste trabalho, por seu companheirismo e dedicação a família.

Aos meus pais, Norival Malvezzi e Maria O. Malvezzi, que me ensinaram grande parte do que aprendi sobre integridade, bom humor e me despertaram o gosto pelas coisas simples da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho, minhas escolhas e me dar forças para tornar tudo possível.

Ao meu amado esposo Dalto José da Silva Júnior pelo carinho, presença, apoio e principalmente pela paciência e compreensão.

Ao meu filho Breno Malvezzi da Silva cuja simples existência é um estímulo constante para ultrapassar meus limites em busca da excelência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva que, nestes anos de convivência, muito me ensinou e contribuiu para meu crescimento científico e intelectual.

Aos meus irmãos Newton K. Malvezzi e Lúcia M. S. Malvezzi e aos meus sobrinhos Pedro Malvezzi e Daniel Malvezzi por compreenderem e perdoarem minhas ausências em momentos especiais do convívio familiar.

Ao Técnico do Laboratório de Microbiologia da FATEA José Eduardo de Freitas pelo incansável auxílio, dedicação, disponibilidade, competência e amizade durante toda execução deste trabalho.

Aos alunos Jacqueline S. Barbosa de Souza, Emily A. Dionísio da Silva, Valéria Siqueira Mota e Isaque P. de Siqueira pelo inestimável auxílio e companheirismo.

Ao Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha pelas contribuições durante a elaboração do projeto de pesquisa.

As amigas Maria Odete Pereira, Cristiane Gomes, Ana Maria Cugliana e Ivanéa Vasques Cruz pelos inestimáveis conselhos e pelo incentivo.

Ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena – USP, especialmente a Coordenadora Profa. Dra. Inês Conceição Roberto e ao Auxiliar Administrativo André F. da Silva, meus sinceros agradecimentos.

A Direção das Faculdades Integradas Teresa D’Avila, especialmente a Profa. Dra. Irmã Olga de Sá e a Profa. Dra. Irmã Raquel de Godoy Retz pelo apoio e por disponibilizar o Laboratório de Microbiologia para a etapa experimental deste trabalho.

A todos os funcionários e alunos das Faculdades Integradas Teresa D’Avila que direta ou indiretamente contribuíram na execução desta tese.

Ao apoio financeiro da FAPESP que possibilitou a execução deste trabalho por meio do Auxílio à Pesquisa nº 2008/1144-8.

RESUMO

MALVEZZI, C. K. **Atividade antimicrobiana de produtos naturais para obtenção de novos biofármacos: estudo dos extratos brutos e suas associações.** 2010. 113p. Tese (Doutorado em Ciência) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

Estudos da atividade biológica de produtos naturais visando suas aplicações no controle de microrganismos são estratégicos e de fundamental importância econômica e social. Considerando o grande potencial da biodiversidade brasileira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do xilitol e dos extratos brutos obtidos das folhas das plantas *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* e *Syzygium cumini*, bem como da associação entre os extratos e entre o xilitol e os extratos. Os extratos foram obtidos de folhas frescas maceradas em uma solução de etanol 95%, filtrada após 72 horas e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Foi realizada a técnica de macrodiluição em caldo e o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi verificado pela leitura da absorbância dos tubos. O crescimento bacteriano normal foi considerado como 100%. A porcentagem de inibição sobre o crescimento bacteriano foi calculada subtraindo-se de 100% a porcentagem de crescimento na presença do extrato, xilitol ou associações. Todos os extratos inibiram o crescimento bacteriano, no entanto a atividade sobre a bactéria *E. coli* foi inferior aquela obtida para a bactéria *S. aureus*. Nos ensaios na presença de xilitol apenas a bactéria *S. aureus* teve seu crescimento inibido. As associações entre os extratos das folhas das espécies *E. uniflora* e *P. guajava* e das espécies *E. uniflora* e *P. granatum* promoveram inibições superiores e em concentrações menores sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* quando comparadas com as inibições promovidas pelos extratos isolados, indicando um efeito antimicrobiano sinérgico entre estes extratos. As associações entre o xilitol e os extratos das folhas das espécies *E. uniflora* ou *S. cumini* e entre o xilitol e os extratos das folhas das espécies *P. guajava* ou *P. granatum* apresentaram um efeito antimicrobiano sinérgico sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Os resultados do presente estudo contribuem na busca de novas alternativas terapêuticas antimicrobianas, uma vez que pode servir de subsídio para novos estudos químicos e farmacológicos a partir de fontes naturais brasileiras.

Palavras-chave: Extrato de Plantas. Xilitol. Atividade Antimicrobiana. Sinergismo.

ABSTRACT

MALVEZZI, C. K. **Antimicrobial activity of natural products for obtainment of new biodrugs: study of crude extracts and their associations.** 2010. 113p. Thesis (Doctoral of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

Biological activities studies of natural products aiming their applications in microorganisms control are strategic, economic, and socially important. Considering the Brazilian biodiversity's large potential, the purpose of this work was to evaluate antimicrobial activity of xylitol and of crude extracts obtained from leaves of the following plants: *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* and *Syzygium cumini*, as well as from the association of the extracts and of xylitol with the extracts. The extracts were obtained from fresh leaves macerated in a 95% ethanol solution, filtered after 72 hours and concentrated in spinning evaporator under reduced pressure. The broth macrodilution technique was used and growth of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) bacteria was observed upon reading of pipes absorption. Regular bacterial growth was considered as 100%. The percentage of inhibition over bacterial growth was calculated by subtracting from 100%, the growth percentage in the presence of the essence, xylitol or associations. All extracts inhibited bacterial growth, but the activity on *E. coli* bacteria was inferior to the one obtained for *S. aureus* bacteria. In tests in the presence of xylitol only the *S. aureus* bacteria had its growth inhibited. Associations between the extracts from leaves of the species *E. uniflora* and *P. guajava* and the species *E. uniflora* and *P. granatum* promoted superior inhibitions and in inferior concentrations over the growth of *S. aureus* bacteria in comparison to inhibitions promoted by isolated extracts, indicating a synergetic antimicrobial effect between these extracts. The associations between xylitol and the extracts of *E. uniflora* or *S. cumini* species and between xylitol and the extracts from leaves of the species *P. guajava* or *P. granatum* presented a synergetic antimicrobial effect over the *S. aureus* and *E. coli* bacteria, respectively. The results of the present study contribute in the search of antimicrobial therapeutic alternatives, once it can be used as base for new chemical and pharmacological studies from Brazilian natural sources.

Keywords: Plant Extracts. Xylitol. Antimicrobial Activity. Sinergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rota biossintética do metabolismo secundário dos vegetais	27
Figura2	Árvore da espécie <i>Eugenia uniflora</i>	32
Figura3.A	Folhas e Fruto da espécie <i>Eugenia uniflora</i>	33
Figura 3.B	Flores da espécie <i>Eugenia uniflora</i>	33
Figura 4	Árvore da espécie <i>Psidium guajava</i>	35
Figura 5.A	Frutos da espécie <i>Psidium guajava</i>	36
Figura 5.B	Folhas da espécie <i>Psidium guajava</i>	36
Figura 6	Árvores da espécie <i>Punica granatum</i>	37
Figura 7.A	Folhas da espécie <i>Punica granatum</i>	38
Figura 7.B	Flores da espécie <i>Punica granatum</i>	38
Figura 7.C	Frutos da espécie <i>Punica granatum</i>	38
Figura 8	Árvore da espécie <i>Syzygium cumini</i>	40
Figura 9.A	Folhas da espécie <i>Syzygium cumini</i>	41
Figura 9.B	Frutos da espécie <i>Syzygium cumini</i>	41
Figura 10.A	Fotomicrografia óptica da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	49
Figura 10.B	Fotomicrografia óptica da bactéria <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	49
Figura 11	Curva de crescimento das bactérias <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	56
Figura 12	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Eugenia uniflora</i>	59
Figura 13	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Psidium guajava</i> sobre o crescimento bacteriano	60
Figura 14	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Punica granatum</i> sobre o crescimento bacteriano	61

Figura 15	Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento bacteriano	62
Figura 16	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Psidium</i> guajava sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	64
Figura 17	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Punica granatum</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	65
Figura 18	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	65
Figura 19	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Psidium guajava</i> e <i>Punica granatum</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	66
Figura 20	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Psidium guajava</i> e <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	66
Figura 21	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Punica granatum</i> e <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	67
Figura 22	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Psidium</i> guajava sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	68

Figura 23	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Punica granatum</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	68
Figura 24	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	69
Figura 25	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Psidium guajava</i> e <i>Punica granatum</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	70
Figura 26	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Psidium guajava</i> e <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	71
Figura 27	Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas <i>Punica granatum</i> e <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	71
Figura 28	Efeito do Xilitol sobre o crescimento bacteriano	73
Figura 29	Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Eugenia uniflora</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	75
Figura 30	Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Eugenia uniflora</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	76
Figura 31	Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Psidium guajava</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	77

Figura 32	Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Psidium guajava</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	77
Figura 33	Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Punica granatum</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	78
Figura 34	Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Punica granatum</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	79
Figura 35	Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento da bactéria <i>S. aureus</i>	80
Figura 36	Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta <i>Syzygium cumini</i> sobre o crescimento da bactéria <i>E. coli</i>	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécie, família e nome local dos vegetais utilizados	47
Tabela 2	Relação entre a massa e o volume da extração hidroalcoólica das folhas frescas das plantas <i>E. uniflora</i> , <i>P. guajava</i> , <i>P. granatum</i> e <i>S. cumini</i>	55
Tabela 3	Crescimento bacteriano normal e frente aos extratos hidroalcoólicos das folhas das diferentes espécies de plantas expresso pelos valores de absorbância	58
Tabela 4	Crescimento bacteriano normal e frente às associações entre extratos hidroalcoólicos das folhas das diferentes espécies de plantas expresso pelos valores de absorbância	63
Tabela 5	Crescimento bacteriano normal e frente às diferentes concentrações de xilitol expresso pelos valores de absorbância	72
Tabela 6	Crescimento bacteriano normal e frente às associações entre o xilitol e os extratos hidroalcoólicos das folhas das diferentes espécies de plantas expresso pelos valores de absorbância	74

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – Micrograma

ATCC – American Type Culture Collection

BHI – Brain Heart Infusion

CIM – Concentração Inibitória Mínima

cm – Centímetro

DMSO – Dimetilsulfóxido

E. coli – *Escherichia coli*

E. uniflora – *Eugenia uniflora*

EEL – Escola de Engenharia de Lorena

FATEA – Faculdades Integradas Teresa D'Ávila

g – Gramas

h – Horas

m – Metro

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

nm – Nanômetro

P. granatum – *Punica granatum*

P. guajava – *Psidium guajava*

RPM – Rotações por Minuto

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. cumini – *Syzygium cumini*

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UNICAMP – Universidade de Campinas

USP – Universidade de São Paulo

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1. As Plantas Medicinais	23
2.2. Seleção de Espécies Vegetais	24
2.3. Princípios Ativos Naturais	25
2.4. Extração com Solventes Orgânicos	27
2.5. Atividade Antimicrobiana das Plantas Medicinais	28
2.6. Características e Atividade Medicinal da Planta <i>Eugenia uniflora</i>	31
2.7. Características e Atividade Medicinal da Planta <i>Psidium guajava</i>	35
2.8. Características e Atividade Medicinal da Planta <i>Punica granatum</i>	37
2.9. Características e Atividade Medicinal da Planta <i>Syzygium cumini</i>	39
2.10. Xilitol: um composto com alto potencial farmacêutico	42
3. OBJETIVOS	45
3.1. Geral	45
3.2. Específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. Locais Onde Foram Realizados os Experimentos	47
4.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal	47
4.3. Extração Hidroalcoólica	48
4.4. Microrganismos	48
4.5. Preparo e Padronização da Suspensão Bacteriana	49
4.6. Determinação da Curva de Crescimento	50

4.7. Ensaio para Determinação da Atividade Antibacteriana dos Extratos Hidroalcoólicos e suas Associações	51
4.8. Ensaio para Determinação da Atividade Antibacteriana do Xilitol e sua Associação com os Extratos Hidroalcoólicos	53
4.9. Análise dos Resultados	54
5. RESULTADOS	55
5.1. Extratos Hidroalcoólicos	55
5.2. Curva de Crescimento	56
5.3. Atividade Antimicrobiana	57
5.4. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Hidroalcoólicos	57
5.5. Atividade Antimicrobiana da Associação entre os Extratos Hidroalcoólicos	62
5.6. Atividade Antimicrobiana do Xilitol e sua Associação com os Extratos Hidroalcoólicos	72
6. DISCUSSÃO	81
6.1. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Hidroalcoólicos	81
6.2. Atividade Antimicrobiana da Associação entre os Extratos Hidroalcoólicos	85
6.3. Atividade Antimicrobiana do Xilitol e sua Associação com os Extratos Hidroalcoólicos	86
7. CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXO A. Composição Química dos Meios de Cultura Utilizados	109
ANEXO B. Sugestões para Trabalhos Futuros	111
ANEXO C. Fluxograma dos Experimentos Realizados	113

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades faz parte da cultura de inúmeras civilizações (HERNANDEZ et al., 2004). Embora seja um recurso autêntico do saber popular, tradicionalmente utilizado no seio familiar e socializado nas relações da vizinhança, o conhecimento das suas propriedades terapêuticas e formas de utilização não são baseados somente no saber adquirido do senso comum, sendo há tempos baseados também na observação e na experimentação.

Os vegetais superiores, devido a sua atividade metabólica secundária, são capazes de produzir substâncias antibióticas que naturalmente são utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (VERPOORTE et al., 2000). A emergente resistência dos microrganismos aos antibióticos convencionais e o aumento da mortalidade e morbidade causadas por infecções microbianas (ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007b), tem estimulado estudos para melhor conhecimento da atividade biológica dos extratos obtidos das diferentes partes anatômicas das plantas e suas aplicações no controle de microrganismos como uma estratégia de fundamental importância econômica e social.

A atividade farmacológica do extrato de uma planta é produto das substâncias químicas presentes, denominadas de princípio ativo. Sabe-se que esta atividade, muitas vezes, é devido à ação combinada de mais de um princípio ativo (SIXEL; PECINALLI, 2005). Este fato justifica o uso inicial de solventes e condições de processos capazes de extrair o maior número possível de compostos e também estudos sobre efeitos sinérgicos da associação entre extratos de diferentes espécies de vegetais com um mesmo efeito farmacológico.

Por exemplo, no ano 2000, Nascimento et al. avaliaram o efeito combinado entre extratos vegetais e antimicrobianos mostrando efeitos sinérgicos na associação do extrato de alho com a ampicilina e do extrato de cravo da índia com a tetraciclina contra *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus spp*, respectivamente. Ao observar o sinergismo entre plantas e antimicrobianos comumente usados este trabalho surgiu com o interesse em verificar a existência de sinergismo na associação entre diferentes espécies de vegetais com o efeito farmacológico comprovado, uma vez que não foi observado nenhum trabalho na literatura com este propósito.

Outro produto de origem natural largamente obtido pela indústria química é o xilitol. Este composto é um poli-álcool de cinco átomos de carbono largamente utilizado pelas indústrias odontológica, alimentícia e médico-farmacêutica (TAPIAINEM et al., 2002). Destaca-se o efeito do xilitol no controle de crescimento de microrganismos, relatados nas publicações das duas últimas décadas (AGUIRRE-ZERO et al., 1993; KONTIOKARI et al., 1995; MÁKINEN, 2000; SAJJAN et al., 2004). Tendo em vista que o xilitol apresenta atividade antimicrobiana comprovada o presente estudo surge como uma nova abordagem ao verificar a existência de atividade antimicrobiana sinérgica significativa entre o xilitol e os extratos de plantas.

Ao conhecer melhor a atividade antimicrobiana de produtos naturais com alto valor econômico, social e medicinal agregado, este trabalho visa contribuir com resultados essenciais para transformar biomoléculas extraídas de plantas comuns da flora brasileira em um medicamento eficaz no controle de microrganismos patogênicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. As Plantas Medicinais

O ser humano sempre buscou na natureza o necessário para diminuir suas dores e curar suas doenças. O uso dos vegetais como medicamento é quase tão antigo quanto à existência do ser humano na terra. Sendo assim, as plantas medicinais fazem parte da história da humanidade, empregadas na alimentação, em práticas religiosas, no folclore, na medicina e nas lendas.

Toda planta que é administrada de alguma forma e por qualquer via ao homem ou animal e exerce uma ação farmacológica qualquer é denominada de medicinal (ALMEIDA, 1993). Os primeiros indícios do uso destas plantas provêm da China. Há registros médicos que comprovam a utilização de plantas para fins terapêuticos pelos chineses desde 3700 a.C (LANGMEAD; RAMPTON, 2001). Outros documentos antigos como o Código de Hamurabi (2000 a.C.), o papiro de Ebers (1500 a.C.) e a obra Universo Medicina de Penadio Dioscorides (40 – 90 d.C.), contém informações relativas à utilização empírica de plantas medicinais (COWAN, 1999; LANGMEAD; RAMPTON, 2001).

Entretanto, a pesquisa sistemática, tendo em vista o isolamento dos princípios ativos vegetais, iniciou-se no século XIX, quando o farmacêutico alemão Fridiech Wilhelm Setumer procurava no ópio, a substância responsável por sua ação hipnótica (SIANI, 2003). Foi neste século então, que a humanidade se deparou com a descoberta das diversas e inesgotáveis substâncias ativas, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuem atividade biológica (VIRTUOSO et al., 2005).

Embora a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998) estime que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde, a grande maioria não possui dados científicos que comprovem a

sua eficácia. Apesar da grande diversidade de espécies de plantas existente no planeta a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico, sendo somente cerca de 5% das espécies conhecidas estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor avaliada sob os aspectos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Nesse sentido, o Brasil tem uma destacada biodiversidade, possuindo uma das mais ricas floras do mundo, o que tem atraído países do primeiro mundo na busca e utilização dos recursos renováveis brasileiros na geração de fármacos e produtos de elevado valor agregado. O país detém cerca de 20% de toda biodiversidade do planeta, com valor superior a duzentas mil espécies de plantas, animais e microrganismos já registrados e o número pode atingir a 1,8 milhões de espécies (CALIXTO, 2005).

Nos últimos anos, no Brasil, várias pesquisas foram realizadas com contribuições relevantes sobre o assunto, não só quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (DESMARCHELIER et al., 1999; JORGE et al., 2004; DUARTE et al., 2004; LIMA et al., 2006; HIRUMA-LIMA et al., 2006). Mesmo assim, das cerca de 120 mil espécies vegetais existentes no Brasil, pouco mais de 0,5% foram estudadas química e farmacologicamente (SILVA, 2002).

Embora o uso das plantas medicinais seja um recurso autêntico do saber popular, o conhecimento científico das suas propriedades químicas, farmacológicas e terapêuticas é importante na obtenção de fármacos naturais seguros e na obtenção de modelos para o desenvolvimento de moléculas sintéticas para a produção de novos medicamentos.

2.2. Seleção de Espécies Vegetais

Considerando quantidade de espécies vegetais existente surge à necessidade em se estabelecer critérios para selecionar quais serão estudadas fitoquimicamente e farmacologicamente. Apesar

de várias abordagens para a seleção serem apresentadas na literatura (MACIEL et al., 2002), três tipos são alvo de maiores investigações: a) abordagem randômica onde a escolha da planta ocorre sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética onde a seleção da espécie é correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família; c) abordagem etnofarmacológica onde a seleção da espécie está de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico.

A abordagem etnofarmacológica foi a mais explorada nos últimos anos para a descoberta de produtos naturais bioativos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Esta abordagem etnodirigida consiste na seleção de espécies de acordo com a indicação de grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso, enfatizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito de seus recursos naturais e de suas aplicações no sistema de saúde e doença. O tempo e o custo são os principais fatores que fazem desta a abordagem mais utilizada atualmente, uma vez que a descrição do histórico da planta como um recurso terapêutico eficaz para o tratamento e cura de doenças de determinado grupo étnico se traduz na economia de tempo e custos na coleta dessas informações (MACIEL et al., 2002).

2.3. Princípios Ativos Naturais

As plantas têm uma capacidade quase ilimitada para sintetizar várias substâncias aromáticas provenientes do seu metabolismo primário e secundário (COWAN, 1999). Os carboidratos, proteínas, ácidos graxos e ácidos nucléicos são substâncias essenciais à sobrevivência e desenvolvimento do vegetal e são produtos do seu metabolismo primário (VERPOORTE; MEMELINK, 2002). Além desses metabólitos as plantas produzem uma variedade de

metabólitos secundários. Esses compostos, não necessariamente essenciais ao organismo produtor e exercem um papel importante na sobrevivência da planta em seu ecossistema (SIMÕES et al., 2001). Em muitos casos, estas substâncias servem como mecanismos de defesa da planta contra a predação por microrganismos, insetos e herbívoros. Ainda, algumas substâncias, como os terpenóides, conferem odores aos vegetais; outras, como as quinonas e taninos, são responsáveis pela pigmentação (VERPOORTE et al., 2000).

Assim como os metabólitos primários, praticamente todos os metabólitos secundários são formados do metabolismo da glicose (Figura 1). Esta é convertida em moléculas de ácido pirúvico que podem seguir duas vias metabólicas distintas. Na primeira, moléculas de piruvato 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 é oxidado até a formação de moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA). Estas podem seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato. Os produtos destas três vias são os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos, os terpenóides, os esteróis e as acetogeninas. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados destes, poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados (OLIVEIRA et al., 2003) (Figura 1).

Estes metabólitos secundários encontram-se presentes nas plantas em baixas concentrações, porém com uma variedade química muito grande. A literatura reporta que já foram isolados pelo menos doze mil diferentes compostos, um número inferior a 10% do estimado (COWAN, 1999; LOURENÇO, 2003). São estes os compostos bioativos produzidos pelos vegetais e os responsáveis pelas propriedades terapêuticas encontrada nas plantas medicinais. Sendo assim, o

efeito farmacológico é resultado da ação de uma ou mais substâncias presentes na composição química da planta, denominada de princípio ativo.

Figura 1. Rota biossintética do metabolismo secundário dos vegetais (SIMÕES et al., 2001, adaptado).

2.4. Extração com Solventes Orgânicos

A análise das substâncias ativas é complexa, uma vez que as plantas podem conter centenas de metabólitos secundários (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. No entanto, a atividade medicinal deve ser inicialmente testada em extratos que possibilitem a retirada de um maior número destes compostos como os extratos brutos. A

obtenção destes extratos normalmente é realizada por meio de solventes orgânicos ou destilação com vapor d'água.

A extração por solvente é uma operação simples e foi aplicada pela primeira vez em 1835 por Robiquet para extração de compostos de flores (HUI, 2007). Os componentes contidos em uma matriz sólida são extraídos dissolvendo-os em um solvente líquido que é posteriormente removido em um evaporador para a obtenção de um extrato concentrado. Este processo é conhecido como extração sólido-líquido. O solvente selecionado influencia na composição e qualidade sensorial do extrato e no rendimento da extração, pois os solventes orgânicos possuem parâmetros diferentes de solubilidade (DANISCO, 2001).

O etanol é uma alternativa adequada quando se utilizam solventes orgânicos, uma vez que possibilita a extração de um grande número de compostos, principalmente compostos aromáticos ou compostos orgânicos saturados que constituem a maioria dos componentes ativos identificados (COWAN, 1999). Ainda, é obtido de fontes renováveis, não é tóxico e evita a utilização de derivados de petróleo.

2.5. Atividade Antimicrobiana das Plantas Medicinais

As doenças infecciosas, principalmente causadas por bactérias, representam uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente em países em desenvolvimento (BETONI et al., 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001), as infecções causam 25% das mortes em todo o mundo e 45% nos países menos desenvolvidos. O custo pessoal e social das doenças bacterianas, representado por custos diretos dos tratamentos, dias não trabalhados, invalidez parcial ou permanente, e mortes é significativamente elevado.

Os antimicrobianos ou antibióticos são fármacos utilizados com o intuito de provocar a morte ou inibir o crescimento de determinado agente microbiano. São originados de substâncias produzidas pelos próprios microrganismos, oriundas de vegetais ou mesmo sintéticas (ALTERTHUM; TRABULSI, 2003).

O aumento da resistência microbiana aos antibióticos é um problema de grande relevância enfrentado nas últimas três décadas (LOGUERCIO et al., 2005). Uma bactéria é resistente a um determinado antibiótico quando esta é capaz de crescer *in vitro* em presença da concentração inibitória mínima deste fármaco. A resistência pode ser natural, onde os genes da bactéria codificam enzimas que inativam o mecanismo de ação do fármaco; ou adquirida, quando a bactéria torna-se resistente a um fármaco sensível, por meio da aquisição de fatores genéticos ou mutação em seus genes de defesa (TAVARES, 2006).

Devido ao aumento de microrganismos patogênicos resistentes a múltiplas drogas associado com o concomitante crescimento do número de pacientes imunocomprometidos surge à preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas (ANTUNES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007b). Várias medidas tecnológicas são sugeridas para resolver o problema da resistência das bactérias, sendo uma delas a procura de novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais (CECHINEL FILHO, 2000).

Devido à rica diversidade, fácil acessibilidade e baixo custo de produtos naturais de origem vegetal, muitos países têm investido fortemente em pesquisas para obtenção de substâncias com atividade antimicrobiana advindas de plantas já conhecidas popularmente como medicinais. Exemplo disto destaca-se estudo realizado por Anesini e Perez (1993), que testaram a atividade antimicrobiana de 122 espécies de plantas usadas popularmente contra infecções na Argentina e observaram que 12 espécies inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, 10 espécies

inibiram o crescimento da *Escherichia coli* e 4 espécies inibiram o crescimento de *Aspergillus niger*. Recentemente, no sul do Texas, foi verificada a atividade antibiótica de 23 extratos de ervas comumente usadas para o tratamento de infecções. Destas 23 ervas 10 inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e 9 ervas o crescimento de duas espécies gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (ROMERO et al., 2005).

O Brasil é conhecido mundialmente pela sua grande e destacada biodiversidade. O país detém cerca de 20% da biodiversidade do planeta, são mais de 200 mil espécies de plantas, animais e microrganismos já registrados e o número pode atingir a 1,8 milhões de espécies (CALIXTO, 2005). Toda esta riqueza estimula o estudo das possíveis ações terapêuticas de plantas usadas pela medicina popular de diversas regiões do país. Neste contexto, estão inseridas pesquisas que visam determinar a atividade antimicrobiana, como por exemplo, as realizadas por Alves et al. (2000) no cerrado brasileiro. Estes autores realizaram um rastreamento da atividade antiparasitária, antifúngica e antibacteriana de 60 espécies de plantas comuns nesta região e mostraram que 42 extratos apresentavam alguma atividade para um ou mais destes bioensaios. A Amazônia, região que ultrapassa as fronteiras brasileiras, destaca-se por apresentar uma variedade significativa de espécies vegetais. A espécie *Bixa orellana*, nativa desta região e utilizada tanto na culinária, conhecida como colorau, como na medicina popular para doenças coronarianas, afecções do estômago e intestino, afecções respiratórias, queimaduras e como afrodisíaco apresentou atividade antibacteriana após ensaios farmacológicos (COELHO et al., 2003). Recentemente, em 2005, Virtuoso et al., observaram atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da *Erythrina velutina*, planta utilizada na medicina popular do nordeste brasileiro, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Outras plantas comuns no nordeste brasileiro cujo óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana são *Croton citratus*,

Croton argyrophylloides, *Croton sonderianus* e *Lippia sidoides* (BERTINI et al., 2005). Outras regiões também ricas em variedades vegetais cujo potencial contra doenças infecciosas tem sido avaliado e comprovado são a sul e sudeste. Os frutos de palmeiras típicas do sudeste e folhas de *Struthanthus vulgaris* conhecida como erva-de-passarinho, uma hemiparasita de árvores ornamentais e plantas frutíferas do sul do país, também tiveram seu potencial antibiótico testado e confirmado (VIEIRA et al., 2005; SILVEIRA et al., 2005).

Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresenta grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de microrganismos (GONÇALVES et al., 2005). Alguns mecanismos responsáveis pela ação antimicrobiana dos princípios ativos extraídos de plantas já foram estudados e estão relacionados com a regulação do metabolismo intermediário da bactéria através do bloqueio de reações químicas, da ação direta sobre a síntese enzimática, ou mesmo de alterações nas estruturas de membrana (SINGH & SHUKLA, 1984; COWAN, 1999).

Os principais grupos de compostos com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas incluem: terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, lectinas, polipeptídios, tanino, cumarinas e substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides (FESSENDEN, 1982; TORSEL, 1989; SCALBERT, 1991; TERRAS et al., 1993; STERN et al., 1996; O'KENNEDY; THORNES, 1997; ZHANG; LEWIS, 1997).

2.6. Características e Atividade Medicinal da Planta *Eugenia uniflora*

A *Eugenia uniflora* L. pertence à família Myrtaceae, composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies de arbustos e árvores verdes durante todo o ano. O gênero *Eugenia* é um dos

maiores da família, com aproximadamente 500 espécies, sendo a maioria encontrada na América do Sul.

Figura 2. Árvore da espécie *Eugenia uniflora*.

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eugenia_uniflora_-_Jardim_Bot%C3%A2nico_de_S%C3%A3o_Paulo_-_IMG_0388.jpg

No Brasil a espécie *Eugenia uniflora* pode ser encontrada em Goiás, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ANGELY, 1965). Weyerstahl et al. (1988) mencionam as denominações populares Ibitanga, Pitangatuba e Pitanga, para os frutos de *Eugenia uniflora* no Brasil, e Brazil Cherry, Surinam Cherry na América de língua inglesa. São árvores ou arbustos com 4 a 10 metros de altura de folhas caducas, com um tronco liso castanho claro (Figura 2). As folhas são simples, apresentam 3 a 7 centímetros de comprimento, com um odor característico quando esmagadas (Figura 3A). As flores são brancas, individuais ou em grupos de 2 ou 3, e os frutos são drupas globosas e enrugadas de cor vermelha brilhante, amarela ou preta, a polpa é carnosa com sabor amargo-doce e contendo 1 ou 2 caroços rígidos (Figura 3A e 3B) (LORENZI; MATOS, 2002).

Figura 3. A: Folhas e Fruto da espécie *Eugenia uniflora*. B: Flores da espécie *Eugenia uniflora*.

Fontes: <http://www.jungleseeds.com/images/Eugenia.jpg>

http://farm4.static.flickr.com/3192/2808789879_bee0503dc7.jpg

A espécie *Eugenia uniflora* faz parte da medicina empírica graças aos índios Guarany no século XV (ALONSO, 1998). Suas folhas são utilizadas na medicina popular como anti-hipertensiva e diurética (CONSOLINI; SARUBBIO, 2002); adstringente para o tratamento de distúrbios digestivos (BANDONI et al., 1972); antipirética e anti-reumática (ALICE et al., 1991), e antimicrobiana (SOUZA et al., 2004).

Testes farmacológicos do extrato das folhas desta planta em roedores indicam atividade inibitória sobre a enzima xantina oxidase (THEODULOZ et al., 1988); atividade anticolinérgica sobre a contratilidade de duodeno isolado (GBOLADE et al., 1996); redução na pressão arterial mediada por vasodilatação direta e uma fraca ação diurética que pode estar relacionada como um aumento na perfusão sanguínea renal (CONSOLINI et al., 1999); supressão dos níveis séricos de açúcar atribuída à atividade inibitória sobre as enzimas α -glicosidase, maltase e sucrase (MATSUMURA et al., 2000).

Adebajo et al. (1989) demonstraram as propriedades antimicrobianas do óleo essencial da espécie *Eugenia uniflora*. A bactéria mais susceptível aos óleos essenciais das folhas e frutos frescos foi a *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto que *Staphylococcus aureus* e *Serratia marcescens* mostraram-se resistentes. O fungo mais suscetível foi *Trichophyton mentagrophytes*,

enquanto que *Candida albicans* foi o mais resistente. O efeito antibacteriano do óleo essencial das folhas e dos frutos desta planta também foi verificado mais recentemente por Ogunwande et al. (2005). Estes autores observaram que os melhores resultados, com concentração inibitória mínima (CIM) de 39 µg/mL, para do óleo essencial dos frutos e o óleo essencial das folhas foram obtidos contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, respectivamente.

No ano 2000 um rastreamento para verificar a atividade de 60 espécies de plantas medicinais brasileiras contra 4 espécies bacterianas, pela aferição de halos de inibição, realizado por Alves et al., observou que extratos de folhas da *Eugenia uniflora* obtidos pela adição de solventes orgânicos inibiam o crescimento bacteriano. Corroboram com estes resultados os obtidos por Gonçalves et al. (2005), utilizando metodologia semelhante. Estudos para avaliar a CIM foram realizados por Holetz et al. em 2002. Estes autores observaram que a CIM do extrato hidroalcoólico das folhas desta planta sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi de 0,2 mg/mL e 0,5 mg/mL respectivamente. Recentemente, Fiuza et al. (2008) encontraram valores diferentes da CIM para o mesmo tipo de extrato. Foi obtida a CIM de 2,18 mg/mL e 17,5 mg/mL para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente.

Os estudos sobre os compostos químicos presentes nas folhas desta espécie que podem estar associados ao efeito farmacológico foram realizados principalmente sobre os componentes apolares voláteis encontrados no óleo essencial, mas uma série de polifenóis, flavonóides e taninos encontrados em extratos obtidos com solventes orgânicos também já foram isolados e caracterizados (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 1995; LEE et al., 1997; OGUNWANDE et al., 2005).

2.7. Características e Atividade Medicinal da Planta *Psidium guajava*

A *Psidium guajava* é uma árvore de pequeno porte, pertencente à família Myrtaceae (Figura 4). Esta é denominada comumente de goiabeira em português, guava em inglês e guayabo em espanhol, e é frequentemente cultivada, em razão dos frutos comestíveis em pomares domésticos ou plantações comerciais para a indústria alimentícia (LORENZI, 1992; LOZOYA et al., 2002).

Figura 4. Árvore da espécie *Psidium guajava*.

Fonte: http://lh4.ggpht.com/_CRmtC5uAyy4/SCu3FxflpUI/AAAAAAAAAWE/wiKfCuchGhE/Psidium+guajava+tree+%5B640x480%5D.jpg

Planta rústica, que atinge porte arbustivo ou arbóreo com menos de 10m, é considerada nativa da América tropical, em especial do Brasil e das Antilhas (SILVA, 2001). O tronco é tortuoso, liso e descamante e as folhas são simples e de textura coriácea, de 8-12 cm de comprimento por 3-6 cm de largura (LORENZI, 1992) (Figura 5B). O fruto é globoso ou piriforme, casca verde ou amarelada ou roxa, com superfície irregular, cerca de 8 cm de diâmetro (CARVALHO et al., 2002) (Figura 5A).

As folhas de *Psidium guajava* são empregadas popularmente para tratar distúrbios gastrointestinais, prática herdada originariamente da medicina asteca no México (LOZOYA et al., 2002). Infusos ou decoctos preparados com folhas frescas ou desidratadas são indicados para

diarréia, disenteria, flatulência e cólica abdominal (VENDRUSCOLO et al., 2005; TÔRRES et al., 2005). Na Índia, os brotos da goiabeira são usados como antitussígeno e os chineses os usam com antiinflamatório e agente hemostático (LIN et al., 2002). Preparações caseiras também são usadas no bochecho e gargarejo para inflamações da boca e da garganta (ALVES et al., 2006).

Figura 5. A: Frutos da espécie *Psidium guajava*. B: Folhas da espécie *Psidium guajava*.

Fonte: <http://www.geocities.com/wessaaliens/species/guava.htm>

Diferentes edições da Farmacopéia Brasileira definem as folhas como sendo a parte mais usada como medicinal (FARMACOPÉIA, 2003). Os taninos, óleo essencial, flavonóides, riterpenóides e sesquiterpenóides são os principais grupos de compostos químicos com possível bioatividade que já foram isolados (CARVALHO et al., 2002; IHA et al., 2008). Morales & Lozoya (1994) comprovaram o efeito espasmolítico e antidiarréico das folhas e os relacionaram com a quercetina, um flavonóide que atua como antagonista do cálcio nas fibras musculares lisas. Adicionalmente, outros autores já comprovaram as atividades antitussígena (JAIARJ et al., 1999), sedativa (LUTTERODT & MALEQUE, 1988), antioxidante (MARTIN et al., 1998; ANJANEYULU; CHOPRA, 2004; WOODMAN; CHAN, 2004) e antiproliferativa para células cancerígenas (MANOSROI et al., 2005).

Nos últimos dez anos, vários estudos verificaram atividade inibitória dos extratos obtidos das folhas da *Psidium guajava*, principalmente os hidroalcoólicos, sobre diferentes microrganismos.

Estudos recentes para avaliação da CIM do extrato hidroalcoólico desta planta obtiveram valores maiores de 1 mg/mL para cepas padrão de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, valores entre 0,1 e 0,5 mg/mL para cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e 2,5 mg/mL para cepas multirresistentes de *S. aureus* (SANCHES et al., 2005; USHIMARU et al., 2007; CHOMNAWANG et al., 2009). A literatura refere-se ainda a uma atividade micótica contra *Cândida albicans*, *Candida Krusei*, *Cândida parapsilosis*, *Cândida stellatoidea*, *Aspergillus fumigatus*, *Arthrinium saccari* e *Chaetomium funicola* (CARCERES et al., 1991; SATO et al., 2000; NAIR; CHANDA, 2007).

2.8. Características e Atividade Medicinal da Planta *Punica granatum*

A romãzeira, *Punica granatum* L., é um arbusto lenhoso, ramificado, da família Punicaceae, nativa da região que abrange desde o Irã até o Himalaia, a noroeste da Índia (Figura 6). Tem sido cultivada mundialmente em regiões de clima tropical e subtropical como planta frutífera e ornamental (SOUZA, 1991).

Figura 6. Árvores da espécie *Punica granatum*.

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Punica_granatum_with_fruit_in_august.JPG

Apresenta folhas pequenas, rijas, brilhantes e membranáceas, flores vermelho-alaranjada dispostas nas extremidades dos ramos, originando frutos esféricos, com muitas sementes em camadas as quais estão envolvidas em arilo polpososo (Figura 7) (LORENZI; SOUZA, 2001; FERREIRA, 2004).

Figura 7. A. Folhas da espécie *Punica granatum*. B. Flores da espécie *Punica granatum*. C. Frutos da espécie *Punica granatum*.

Fontes: <http://www.scienceviews.com/photo/browse/SIA0614.jpg>

<http://flowersinisrael.com/picts/Punica%20granatum4.jpg>; <http://luizmeira.com/punica2.jpg>

Os preparos obtidos principalmente da flor, fruto e casca da árvore da romãzeira são popularmente usados para tratar vários problemas de saúde. O suco é usado contra úlceras na boca e genitálias, alivia dores de ouvido, é utilizado no tratamento de dispepsia, disenteria e benéfico contra a lepra (WERKMAN et al. 2008). As flores são usadas para tratamento da gengiva, prevenindo a perda dentária; possuem atividade adstringente e hemostática e servem para o tratamento de *diabetes mellitus* (WERKMAN et al. 2008). Os brotos das flores, secos e pulverizados, são usados para a bronquite (LANGLEY, 2000). No México, é usada para diarreia, aftas, parasitismo, abscessos, tosse, angina, inflamação urinária e lesões da pele (NAVARRO et al., 1996).

Atualmente, a literatura aponta a *Punica granatum* como uma planta com grande potencial para prevenir e combater várias doenças. Trabalhos experimentais comprovam suas propriedades antioxidante, hipoglicemiante, redutora de colesterol, preventiva de câncer, reparadora de feridas e estrogênica (AVIRAN et al., 2000; DAS et al., 2001; KELAWARA; ANANTHANARAYAN, 2004; KOHNO et al., 2004; MORI-OKAMOTO et al., 2004; MURTHY et al., 2004).

Entre as várias propriedades biológicas dos extratos principalmente do pericarpo da romã, destaca-se a sua atividade antimicrobiana. Vários ensaios microbiológicos *in vitro* desde a década de 70 relatam a sensibilidade de vários microrganismos a substâncias presentes em diferentes tipos de extratos obtidos da casca desta planta. Um estudo recente para avaliar a CIM do extrato metanólico 80% da casca da *Punica granatum* obteve valores de 2 mg/mL para cepa padrão de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* e 1 mg/mL para cepa padrão de *Escherichia coli* (AL-ZOREKY, 2009). Silva et al. (2008) comprovaram o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico da casca da romã sobre 38 linhagens bovinas de *Staphylococcus aureus*, 22 resistentes a penicilina, ao observar halos de inibição variando de 10 a 36 mm de diâmetro. Ainda, um estudo *in vivo* realizado por Choi et al. (2009) observou uma diminuição significativa no número de *Salmonella typhi* viáveis recuperadas de fezes de camundongos infectados e tratados com o extrato etanólico da casca dos frutos da *Punica granatum*, em relação aos camundongos infectados e não tratados.

2.9. Características e Atividade Medicinal da Planta *Syzygium cumini*

A espécie *Syzygium cumini*, membro da família Myrtaceae, é uma árvore nativa das regiões dos trópicos, particularmente a Índia, Tailândia, Filipinas e Madagascar (Figura 8). A planta foi

introduzida em muitas regiões tropicais como leste e oeste da Índia e da África, bem como o Brasil, sendo encontrada em diversos estados das regiões sudeste, nordeste e norte (DANADIO et al., 1998). Tem como sinônimas científica *Eugenia jambolana* Lam., *Syzygium jambolanum* D.C., *Syzygium caryophyllifolium* D.C., *Eugenia cortisona* Lour., *Eugenia frondosa* Wall., *Eugenia caryophyllifolia* Lam., *Eugenia jambolifera* Roxb., *Eugenia moorei* Muell., *Eugenia obtusifolia* Roxb., *Eugenia cumini* Druce, *Jambolifera pedunculata* Gaertn, *Eugenia glomerata* Sieber, *Calyptrantes caryophyllifolia* Willd, *Calyptrantes jambolana* Willd, *Calyptrantes cumini* Pers. e *Myrtus cumini* L. (MARCHIORI; SOBRAL, 1997). Vem sendo cultivada no Brasil como planta ornamental e é popularmente conhecida pelas seguintes denominações: jambolão, azeitona, azeitona-roxa, oliva, jambolan, java plum, jamun.

Figura 8. Árvore da espécie *Syzygium cumini*.

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Syzygium_cumini_Tree_3.jpg

Syzygium cumini L. é descrita como uma árvore que mede cerca de 10 m de altura e de 3 a 4,5 m de diâmetro de projeção da copa (Figura 8), com folhagem abundante, ramos de coloração

acinzentada-claro, com fissuras escuras e cicatrizes foliares bastante aparentes (Figura 8A). Os frutos são carnosos do tipo baga, elípticos, apresentando cerca de 3 a 4 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, com pericarpo de coloração roxa escura intensa, apresentando apenas uma semente de aspecto oval e coloração marrom escura (Figura 8B). O mesocarpo é carnoso e sucoso com sabor ácido e adocicado, oferecendo forte sensação de adstringência (MIGLIATO et al., 2006).

Figura 9. A. Folhas da espécie *Syzygium cumini*. B. Frutos da espécie *Syzygium cumini*.

Fontes: http://www.ethnopharmacologia.org/phototheque/Syzygium_cumini2.jpg

http://farm3.static.flickr.com/2332/2431514829_259b3becfb.jpg

Preparações caseiras das folhas desta planta são usadas no tratamento de diversas patologias. O uso mais comum é para o controle do diabetes, mas estas preparações também são usadas como diurético, estomáquico, hipotensor e antiinflamatório (MIGLIATO, 2006; LOGUERCIO et al., 2005). Ainda, a decocção da casca é um eficaz enxagüante bucal no tratamento de aftas, estomatites, afecções da garganta e outras doenças das vias orais (KAPOOR, 1990).

O emprego intenso desta planta na medicina popular estimulou a pesquisa científica, identificando inúmeras ações farmacológicas relacionadas às suas indicações populares. Trabalhos experimentais comprovam suas propriedades antioxidante, antidiarréica, antiinflamatória, protetora gástrica e larvicida (CHAUDIHURI et al., 1990; MUKHERJEE et al.,

1998; RAMIREZ; ROA JUNIOR, 2003; CAVALCANTI et al., 2004; BENERJEE et al., 2005).

No entanto, sua atividade mais propagada, a antidiabética, é motivo de controvérsia, uma vez que parte dos autores encontrou efeitos benéficos (PRINCE et al., 1998; GROVER et al., 2000; VIKRANT et al., 2001; SHARMA et al., 2003; SRIDHAR et al., 2005) e outros não (PEPATO et al., 2001; MAZZANTI et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2004).

Nascimento et. al. (2000) ao avaliarem a atividade antibacteriana de vários extratos de plantas e fitofármacos sobre bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos verificaram que o extrato de *Syzygium cumini* inibiu 57,1% dos microrganismos testados, muitos dos quais resistentes a antibióticos. Recentemente, Oliveira et al. (2007a) obtiveram CIM de 200 µg/mL para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* e CIM de 90 µg/mL para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans*. Ainda, estudos *in vivo* realizados por Maciel et al. (2008) mostram que o extrato hidroalcoólico das folhas desta espécie tem um efeito profilático na sepse induzida por ligadura cecal e punção.

2.10. Xilitol: um Composto com Alto Potencial Farmacêutico

O xilitol é um carboidrato polissacarídeo naturalmente encontrado em diversos vegetais, entretanto a extração a partir destas fontes é economicamente inviável devido às pequenas concentrações (EMODI, 1978). Possui um poder adoçante similar à sacarose, porém 40% menos calórico (PEREIRA et al. 2009). É produzido em larga escala por redução química da xilose extraída principalmente de hidrolisados de madeira das árvores da família Betulaceae e outras árvores, próprias de países escandinavos (SILVA; AFSHAR 1994). A via biotecnológica é outra possibilidade de obtenção do xilitol, considerando o potencial de algumas leveduras em excretar

quantidades significativas de xilitol sob condições adequadas de fermentação (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

Atualmente, a produção mundial de xilitol ultrapassa 10.000 toneladas por ano e é direcionada principalmente às indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética (TAPIAINEN et al., 2002). A adição do xilitol em produtos dietéticos pode substituir no todo ou em parte os diversos tipos de açúcar contidos em balas, doces e gomas de mascar (Lynch; Milgron, 2003).

O xilitol possui grande potencial de aplicação nas áreas médica e odontológica. Já se mostrou eficiente para o tratamento de diabetes, desordem de metabolismo de lipídeos, lesões renais e parenterais, prevenção de cárie dentária, infecções pulmonares, otites, anemia hemolítica e osteoporose (MAKINEN, 2000; MUSSATO; ROBERTO, 2002; SINTES, et al., 2002).

Os estudos da ação do xilitol sobre microrganismos iniciaram-se com a observação de seu efeito não (PEPPER; OLINGER, 1988) e anti cariogênico (AGUIRRE-ZERO et al., 1993). Essa ação foi observada sobre a bactéria *Streptococcus mutans*, principal causador das cáries. O efeito não cariogênico é uma consequência deste microrganismo não fermentar o xilitol, não o utilizando como uma fonte de carbono, além do xilitol não acidificar o pH, o que contribui para o crescimento do *Streptococcus mutans*. O xilitol também impede a aderência da bactéria nos dentes, diminuindo a contagem de células, o que diminui também a chance de transmissão (MÁKINEN, 2000).

Outra ação antimicrobiana estudada foi no controle da otite média aguda. Um estudo *in vitro* na presença de 1% e 5% de xilitol promoveu a inibição do crescimento da bactéria *Streptococcus pneumoniae* em 35% e 72%, respectivamente. No entanto, assim como nos microrganismos cariogênicos, o mecanismo de ação do xilitol sobre as bactérias otopatogênicas não ocorre apenas pela inibição do crescimento bacteriano, mas também pela propriedade deste carboidrato em

diminuir a aderência dos pneumococos às células da nasofaringe, o que dificulta a sua migração até o ouvido médio, importante etapa da patofisiologia da otite média aguda (KONTIOKARI et al. 1995).

Ainda, já foi comprovada atividade profilática do xilitol para infecções respiratórias causadas por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (ZABNER et al., 2000) e para colite causada por *Clostridium difficile* (NAABER et al. 1996); e também ação na conservação de pulmões para serem transplantados (SAJJAN et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do xilitol e dos extratos brutos obtidos das folhas das plantas *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* e *Syzygium cumini*.

3.2. Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* e *Syzygium cumini* frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* e *Syzygium cumini* e comparar com suas atividades isoladas.
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do xilitol.
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* da associação dos extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* e *Syzygium cumini* com o xilitol e comparar com suas atividades isoladas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Locais Onde Foram Realizados os Experimentos

A extração hidroalcoólica e os testes para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Microbiologia das Faculdades Integradas Teresa D'Ávila (FATEA) no município de Lorena estado de São Paulo em parceria com o Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos da Escola de Engenharia de Lorena EEL/USP.

4.2. Coleta e Identificação do Material Vegetal

As folhas das plantas *Eugenia uniflora*, *Punica granatum*, *Psidium guajava* e *Syzygium cumini* foram coletadas nos meses de agosto e setembro de 2008 de árvores cultivadas na EEL/USP e fazendas da região, sempre no período da manhã. As folhas foram colocadas em sacos plásticos e mantidas sobre refrigeração até o processamento que foi realizado até 48h após a coleta.

Na mesma ocasião, todas as espécies de plantas foram amostradas para o processo de conferência de excicata, identificadas pelo Botânico Ms. Luiz Fernando da Silva Martins da FATEA e enviadas para depósito no Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP (Tabela 1).

Tabela 1. Espécie, família e nome local dos vegetais utilizados

Espécie vegetal	Família	Nome local
<i>Eugenia uniflora</i> L.	Myrtaceae	Pitangueira
<i>Psidium guajava</i> L.	Myrtaceae	Goiabeira
<i>Punica granatum</i> Linn.	Punicaceae	Romãzeira
<i>Syzygium cumini</i> L.	Myrtaceae	Jambolão

4.3. Extração Hidroalcoólica

Após a coleta, as folhas frescas das plantas *E. uniflora*, *P. guajava*, *P. granatum* e *S. cumini* foram lavadas, fragmentadas, maceradas e colocadas em uma solução de etanol a 95% em uma proporção planta/solvente de 1:2 (peso/volume) e filtradas após 72 h. A solução de etanol foi ajustada para 95% com um alcoholometro segundo Gay-Lussac (Incoterm, Brasil).

Os filtrados foram recolhidos e o solvente orgânico foi removido em evaporador rotativo (Fisaton, modelo 802, Brasil), sob pressão reduzida e temperatura constante de 45°C, para obtenção do extrato bruto hidroalcoólico. A remoção do etanol evitou que sua atividade bacteriostática influenciasse nas propriedades antimicrobianas do extrato vegetal; sua remoção foi feita em condições controladas de temperatura para evitar a degradação de substâncias presentes no extrato.

Para verificar a quantidade de folhas necessária para se obter o volume de 1 mL de extrato foi calculada a seguinte relação: massa de folha (g) / volume de extrato (mL).

Os extratos obtidos das folhas de todas as espécies de plantas foram armazenados em recipientes de vidro, protegidos da luz e congelados para posterior diluição e determinação da atividade antibacteriana.

4.4. Microrganismos

Foi utilizada uma cepa padrão Gram-positiva e uma Gram-negativa, ambas catalogadas no *American Type Culture Collection* (ATCC). A cepa Gram-positiva de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 10A) foi obtida do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A cepa Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figura

10B) foi adquirida da Newprov® (Paraná, Brasil) e reconstituída de acordo com a indicação do fornecedor.

Figura 10. **A.** Fotomicrografia óptica da bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. **B.** Fotomicrografia óptica da bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922. Lâminas coradas com a técnica de Gram e analisadas sob microscópio óptico com aumento de 1000X, digitalizadas por meio do software Pinnacle Systems GmbH 2004 (Braunschweig, Alemanha).

Estas cepas foram mantidas sob refrigeração em tubos inclinados com ágar Gymp (Anexo). Quinzenalmente foram feitos novos repiques e verificação da pureza através da inoculação em placas com meios seletivos e diferenciais, bem como avaliação microscópica.

4.5. Preparo e Padronização da Suspensão Bacteriana

Foram preparadas culturas de crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* em 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (HIMEDIA, Mumbai, India) (Anexo) e incubadas em estufa bacteriológica (Logen Scientific, modelo ECB 1.3 Digital) a 36⁰C, durante 05 h. Após este período, para cada bactéria foi feita a padronização da suspensão bacteriana.

As culturas foram centrifugadas a 1000 RPM por 10 minutos em uma centrífuga clínica ângulo fixo (SPPENCER). O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em solução salina 0,9% estéril transferidas para um Erlenmeyer, onde foram diluídas nesta mesma concentração de solução salina estéril até obter-se uma leitura de 25% de transmitância. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro digital (Biospectro, modelo SP22, China) a 540 nm. O ajuste do aparelho foi feito para 100% de transmitância, utilizando-se salina 0,9% estéril para zerar o aparelho.

4.6. Determinação da Curva de Crescimento

Foram realizados experimentos para se obter a curva padrão de crescimento das cepas utilizadas *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922. A medida do crescimento bacteriano foi feito através da leitura da absorbância de tubos de cultura durante 24 h em intervalos de 1 h utilizando um espectrofotômetro a 540 nm zerado com caldo BHI estéril.

Foi transferido 1 mL da suspensão bacteriana padronizada para tubos contendo 4 mL de caldo BHI. Estes tubos foram incubados em estufa bacteriológica, exceto os que foram utilizados para fazer a primeira leitura considerada tempo zero. A leitura da absorbância dos outros tubos foi verificada em intervalos de 1 h durante 24 h. Todas as leituras foram feitas em duplicatas. Uma pequena amostra de todos os tubos foi analisada microscopicamente para confirmação morfológica dos microrganismos.

4.7. Ensaio para a Determinação da Atividade Antibacteriana dos Extratos Hidroalcoólicos e suas associações.

O extrato de cada planta foi descongelado e diluído em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear), 0,02% de Tween 80 (Vetec) e solução salina 0,9% até obter-se uma solução final do extrato a uma concentração de 40 mg/mL.

Para facilitar a dispersão de moléculas lipossolúveis do extrato no meio de cultura, o DMSO e o Tween foram utilizados como solvente e agente emulsificante, respectivamente (GROPPO et al., 2002; BAYDAR et al., 2004; BRUNI et al., 2004). Para evitar interferência do agente emulsificador na susceptibilidade da bactéria ao extrato foram usadas concentrações descritas na literatura como seguras (HOOD et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2007). Ainda, para verificar possíveis ações antimicrobianas destas substâncias, foram feitos testes, com as concentrações utilizadas, sobre os inóculos e o crescimento microbiano foi comparado com o crescimento das bactérias na ausência destas substâncias.

Os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *E. uniflora*, *P. granatum*, *P. guajava* e *S. cumini*, na concentração de 40 mg/mL, foram filtrados em membrana Millipore com diâmetro de poro de 0,22 µm e submetidos a diluições até obter as seguintes concentrações: 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL e 2,5 mg/mL. Para testar as associações entre dois extratos de diferentes espécies de plantas, volumes iguais, na concentração de 40 mg/mL, de cada um foram devidamente misturados. A mistura foi filtrada em membrana esterelizante e submetida às mesmas diluições do extrato isolado.

Para determinação da atividade dos extratos e associações de extratos sobre o crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, tubos contendo 3 mL de caldo BHI e 1 mL das diferentes concentrações do extrato foram inoculados com 1 mL da suspensão bacteriana (volume final 5

mL). Sendo assim, as concentrações testadas dos extratos foram de: 8 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL, uma vez que 1 mL de cada concentração inicial do extrato foi diluído em um volume de 4 mL totalizando 5mL.

Foi utilizado como controle tubos contendo 4 mL de meio BHI e 1 mL de suspensão bacteriana para verificar o crescimento normal do microrganismo e comparar com o crescimento na presença dos extratos. A esterilidade de todas as concentrações do extrato foi verificada através de tubos contendo 4 mL de caldo e 1 mL do extrato. Para verificar possíveis ações antimicrobianas do DMSO e do Tween foram preparados tubos com 1 mL de solução fisiológica contendo estas substâncias nas concentrações utilizadas, 3 mL de caldo BHI e 1 mL do inóculo.

Todos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 36°C durante 15 h.

O crescimento bacteriano foi determinado pela leitura da absorbância dos tubos. A leitura dos tubos controle foi considerada como 100% de crescimento bacteriano. Para cada concentração do extrato o espectrofotômetro foi ajustado em 0% de absorbância com tubos contendo 4 mL de caldo BHI e 1 mL da concentração do extrato que estava sendo analisada. A inibição do crescimento bacteriano pelos extratos foi determinada subtraindo-se de 100% a porcentagem de crescimento na presença do extrato. A equação utilizada para calcular a porcentagem de inibição bacteriana foi:

$$Porcentagem\ de\ Inibição = \left| \frac{Absorância_{(extrato+bactéria)} \times 100}{Absorbância_{(controle)}} - 100 \right|$$

Todas as leituras foram realizadas em um comprimento de onda de 540nm e todos os ensaios foram feitos em triplicata. Uma pequena amostra de todos os tubos que apresentaram crescimento microbiano foi analisada microscopicamente para confirmação morfológica dos microrganismos.

4.8. Ensaios para Determinação da Atividade Antibacteriana do Xilitol e sua Associação com os Extratos Hidroalcoólicos

Foi utilizado o xilitol químico (98% de pureza) (Fluka, Finlândia). O xilitol foi solubilizado em solução salina 0,9% até obter-se uma solução de 60 mg/mL. Esta solução foi filtrada em membrana Millipore com diâmetro de poro de 0,22 µm e submetida a diluições até obter as seguintes concentrações: 50 mg/mL, 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL e 2,5 mg/mL. Para testar as associações entre xilitol e os extratos das diferentes espécies de plantas, volumes iguais, ambos na concentração de 40 mg/mL, de cada um foram misturados. A mistura foi filtrada em membrana esterilizante e diluída até obter as seguintes concentrações: 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL e 2,5 mg/mL.

Para determinação da atividade do xilitol e das associações do xilitol com os extratos sobre o crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, tubos contendo 3 mL de caldo BHI e 1 mL das diferentes concentrações de xilitol e associações foram inoculados com 1 mL da suspensão bacteriana (volume final 5 mL). Sendo assim, as concentrações testadas do xilitol foram de: 12 mg/mL, 10 mg/mL, 8 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL; e as concentrações testadas das associações do xilitol com os extratos das folhas das plantas foram de: 8 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL. Foi utilizado como controle tubos contendo 4 mL de meio BHI e 1 mL de suspensão bacteriana para verificar o crescimento normal do microrganismo e comparar com o crescimento na presença do xilitol e associações com os extratos.

Todos os tubos foram incubados em estufa bacteriológica durante 15 horas em uma temperatura de 36°C.

O crescimento bacteriano foi determinado pela leitura da absorbância dos tubos. A inibição do crescimento bacteriano promovida pelo xilitol e sua associação com os extratos hidroalcoólicos

das folhas das plantas *E. uniflora*, *P. guajava*, *P. granatum* e *S. cumini* sobre as bactérias *S. aureus* e *E. coli* foi determinado conforme os cálculos descritos para os extratos hidroalcoólicos e suas associações.

4.9. Análise dos Resultados

Os resultados da atividade antimicrobiana das concentrações testadas dos extratos das folhas das plantas, do xilitol, bem como das associações entre os extratos e dos extratos com o xilitol estão apresentados em gráficos e tabelas que expressam a porcentagem de inibição do crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* em relação ao crescimento normal destes microrganismos. Nestes experimentos os controles negativo, bem como as triplicatas, asseguram a reprodutividade dos resultados.

5. RESULTADOS

5.1. Extratos Hidroalcoólicos

A Tabela 2 apresenta a relação entre a massa das folhas e o volume final após a extração hidroalcoólica. Foi calculada a quantidade de folhas frescas em gramas necessária para se obter um volume de 1 mL de extrato das folhas das espécies *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* e *Syzygium cumini*.

Tabela 2. Relação entre a massa e o volume da extração hidroalcoólica das folhas frescas das plantas *E. uniflora*, *P. guajava*, *P. granatum* e *S. cumini*.

Plantas	Folhas (g)	Extrato (mL)	Relação
			(massa de folhas (g) / volume de extrato (mL))
<i>Eugenia uniflora</i>	254	60	4,23
<i>Psidium guajava</i>	1500	80	18,75
<i>Punica granatum</i>	150	60	2,5
<i>Syzygium cumini</i>	758	150	5,05

Após a evaporação do álcool observou-se que a melhor relação obtida foi com as folhas da espécie *P. granatum*, uma vez que foi necessária uma menor quantidade de folhas para se obter um volume de 1 mL de extrato. Em oposição, para as condições de extração utilizadas, a relação obtida com as folhas da espécie *P. guajava* foi muito maior quando comparada com a de todas as outras espécies de folhas.

5.2. Curva de Crescimento

A Figura 11 representa a curva de crescimento normal das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana.

A avaliação do crescimento bacteriano normal foi importante para se estabelecer, baseado nas fases de crescimento, o tempo de incubação antes do preparo da suspensão bacteriana para inoculação nos ensaios e o período de incubação dos ensaios para posterior avaliação do crescimento bacteriano.

Figura 11. Curva de crescimento normal das bactérias *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922).

Foram estabelecidos os períodos de 5 h de incubação das bactérias antes do preparo e padronização da suspensão bacteriana e o período de 15 h de incubação dos ensaios para posterior avaliação do crescimento bacteriano. Para um crescimento normal sem interferência dos extratos a curva de crescimento de ambas as bactérias estaria no fim da fase logarítmica após 5 h e ainda na fase estacionária após 15 h.

5.3. Atividade Antimicrobiana

Durante todos os testes de atividade antimicrobiana, os ensaios controle apresentaram crescimento bacteriano observado pela turvação dos caldos (Tabela 3, 4, 5, 6). A finalidade destes ensaios foi verificar o crescimento normal das bactérias *S. aureus* e *E. coli* e compará-lo com o crescimento das bactérias quando inoculadas com os extratos vegetais ou o xilitol.

Os tubos contendo apenas as diferentes concentrações do extrato ou do xilitol e o meio de cultura confirmaram a eficácia da técnica utilizada para a esterilização dos extratos, uma vez que não apresentaram crescimento microbiano. Ainda, em todos os cultivos a pureza foi comprovada por meio da análise microscópica.

5.4. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Hidroalcoólicos

A Tabela 3 apresenta os resultados do crescimento bacteriano na presença de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico das folhas frescas das espécies *E. uniflora*, *P. guajava*, *P. granatum* e *S. cumini*. Todas as concentrações dos extratos das plantas testadas promoveram alguma inibição sobre o crescimento bacteriano expresso pela diminuição da média da absorbância em relação ao crescimento controle.

A inibição do crescimento bacteriano promovido pelo extrato hidroalcoólico das folhas da planta *E. uniflora* expressos em porcentagem estão apresentados na Figura 12. A atividade deste extrato sobre a bactéria *E. coli* foi inferior aquela obtida para a bactéria *S. aureus*, não alcançando 50% de inibição para nenhuma das concentrações estudadas. Em contraste a ação do extrato das folhas da *E. uniflora* sobre a bactéria *S. aureus* foi superior a 60% em todas as concentrações, atingindo a inibição máxima de 88% na concentração de 4 mg/mL.

Tabela 3. Crescimento bacteriano normal (Controle) e frente aos extratos hidroalcoólico das folhas das diferentes espécies de plantas expresso pelos valores de absorbância (540 nm).

		EXTRATOS							
		<i>E. uniflora</i>		<i>P. guajava</i>		<i>P. granatum</i>		<i>S. cumini</i>	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (mg/mL)	0,5	0,19 ± 0,03	0,53 ± 0,03	0,15 ± 0,02	0,71 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,64 ± 0,04
	1	0,24 ± 0,08	0,44 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,78 ± 0,03	0,09 ± 0,00	0,59 ± 0,01	0,09 ± 0,04	0,61 ± 0,05
	2	0,13 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,13 ± 0,06	0,52 ± 0,01	0,11 ± 0,04	0,6 ± 0,06	0,08 ± 0,03	0,56 ± 0,08
	4	0,09 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,55 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,52 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,55 ± 0,03
	8	0,19 ± 0,03	0,56 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,14 ± 0,05	0,55 ± 0,02
C		0,75 ± 0,16	0,79 ± 0,05	0,27 ± 0,10	0,7 ± 0,09	0,27 ± 0,10	0,7 ± 0,09	0,28 ± 0,03	0,82 ± 0,08

C – Controle

Resultados expressos como Média ± Desvio-Padrão, n = 3

Figura 12. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Eugenia uniflora* sobre o crescimento bacteriano. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

A figura 13 apresenta a ação do extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *P. guajava* sobre o crescimento das bactérias. Verifica-se que a bactéria *S. aureus* apresentou-se sensível ao observar-se apenas uma discreta inibição do crescimento da *E. coli* nas três maiores concentrações do extrato. Para a bactéria *S. aureus* este extrato promoveu uma inibição do crescimento superior a 95% na concentração de 8 mg/mL e para as demais concentrações do extrato foi observada uma inibição em torno dos 50%.

Figura 13. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Psidium guajava* sobre o crescimento bacteriano. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

O extrato das folhas da planta *P. granatum* também não foi eficaz em inibir o crescimento da bactéria *E. coli*. No entanto, um melhor desempenho foi observado para a bactéria *S. aureus* que teve seu crescimento inibido em 74% pelo extrato desta planta na concentração de 4 mg/mL (Figura 14).

Faz-se necessário destacar que tanto o extrato da *E. uniflora*, quanto o extrato da *P. granatum* tiveram uma redução na sua atividade inibitória sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* na concentração de 8 mg/mL (Figuras 12 e 14). Estes ensaios foram confirmados e reproduziu-se este mesmo fenômeno.

Figura 14. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Punica granatum* sobre o crescimento bacteriano. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

A inibição sobre o crescimento da bactéria *E. coli* pelo extrato das folhas da planta *S. cumini* foi gradativo conforme se aumentava a concentração do extrato, no entanto não chegou a 40% em relação ao crescimento normal desta bactéria (Figura 15). Ainda na Figura 15, é possível observar que a ação do extrato das folhas desta planta sobre a bactéria *S. aureus* promoveu um aumento gradual da inibição do crescimento que chegou a 70% na concentração de 2 mg/mL, seguido por uma diminuição também gradual desta inibição nas duas maiores concentrações testadas para o extrato.

Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Syzygium cumini* sobre o crescimento bacteriano. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

5.5. Atividade Antimicrobiana da Associação entre os Extratos Hidroalcoólicos

A Tabela 4 apresenta os resultados do crescimento bacteriano na presença diferentes concentrações das associações entre os extratos hidroalcoólicos das folhas frescas das espécies *E. uniflora*, *P. guajava*, *P. granatum* e *S. cumini*. Todas as concentrações testadas para as associações entre os extratos das folhas das diferentes espécies promoveram alguma inibição sobre o crescimento bacteriano expresso pela diminuição da média da absorbância em relação ao crescimento controle.

Tabela 4. Crescimento bacteriano normal (Controle) e frente às associações entre extratos hidroalcoólicos das folhas das diferentes espécies de plantas expresso pelos valores de absorbância (540 nm).

ASSOCIAÇÕES DE EXTRATOS													
<i>E. uniflora</i> <i>P. guajava</i>		<i>E. uniflora</i> <i>P. granatum</i>		<i>E. uniflora</i> <i>S. cumini</i>		<i>P. guajava</i> <i>P. granatum</i>		<i>P. guajava</i> <i>S. cumini</i>		<i>P. granatum</i> <i>S. cumini</i>			
<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
CONCENTRAÇÃO DO EXTRATO (mg/mL)	0,5	0,03 ± 0,02	0,55 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,63 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,51 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,07 ± 0,03	0,60 ± 0,03	0,13 ± 0,05	0,67 ± 0,05
	1	0,04 0,04	0,55 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,57 ± 0,05	0,11 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,65 ± 0,02	0,10 ± 0,04	0,57 ± 0,03	0,11 ± 0,05	0,56 ± 0,01
	2	0,03 ± 0,02	0,57 ± 0,05	0,01 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,13 ± 0,05	0,45 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,14 ± 0,08	0,56 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,53 ± 0,03
	4	0,03 ± 0,01	0,61 ± 0,05	0,05 ± 0,00	0,52 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,52 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,54 ± 0,01
	8	0,02 ± 0,00	0,61 ± 0,03	0,02 ± 0,01	0,50 ± 0,03	0,21 ± 0,07	0,52 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,57 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,67 ± 0,02	0,08 ± 0,05	0,59 ± 0,00
	C	0,72 ± 0,13	0,84 ± 0,04	0,72 ± 0,13	0,84 ± 0,04	0,75 ± 0,16	0,79 ± 0,05	0,27 ± 0,10	0,70 ± 0,09	0,28 ± 0,03	0,82 ± 0,08	0,28 ± 0,03	0,82 ± 0,08

C – Controle

Resultados expressos como Média ± Desvio-Padrão, n = 3

A ação das diferentes associações entre os extratos hidroalcoólicos sobre o crescimento da bactéria *E. coli* foi menor que àquela promovida sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* e semelhante àquela promovida pelos extratos isolados (Figura 16, 17, 18, 19, 20, 21). A inibição máxima alcançada foi de 50% sobre o crescimento da *E. coli* com a associação entre os extratos das folhas das espécies *E. uniflora* e *S. cumini* (Figura 18).

Figura 16. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora* e *Psidium guajava* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 17. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 18. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 19. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Psidium guajava* e *Punica granatum* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 20. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Psidium guajava* e *Syzygium cumini* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 21. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Punica granatum* e *Syzygium cumini* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

A associação entre os extratos das folhas das espécies *E. uniflora* e *P. guajava* sobre a bactéria *S. aureus* promoveu uma inibição maior que 90% para todas as concentrações testadas, atingindo a inibição máxima de 97% com 8 mg/mL (Figura 22). A atividade inibitória da associação entre estes extratos sobre este microrganismo foi melhor que a atividade dos extratos isolados e se manteve constante para todas as concentrações analisadas.

A Figura 23 mostra que o efeito da associação entre os extratos das folhas das espécies *E. uniflora* e *P. granatum* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* foi semelhante ao da associação entre os extratos das folhas *E. uniflora* e *P. guajava*. Promoveram uma inibição melhor que a dos extratos isolados e maior que 90% em todas as concentrações testadas.

Figura 22. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora* e *Psidium guajava* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 23. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Com a associação entre os extratos das folhas das espécies *E. uniflora* e *S. cumini* foi observado uma inibição melhor que a promovida pelos extratos isolados sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* apenas nas concentrações inferiores de 1 e 0,5 mg/mL, ultrapassando 85% de inibição (Figura 24). Nas outras concentrações da associação dos extratos a inibição do crescimento bacteriano foi semelhante aquela observada com o extrato isolado das folhas da espécie *E. uniflora*.

Figura 24. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

A Figura 25 ilustra a inibição sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* promovida pela associação entre os extratos das folhas das espécies *P. guajava* e *P. granatum* e a compara com a destes extratos isolados. A atividade observada com a associação foi melhor que a dos extratos isolados apenas na concentração de 2 mg/mL, que promoveu 84% de inibição do crescimento da *S. aureus*. Nas demais concentrações a ação da associação entre os extratos foi semelhante ou inferior a dos extratos isolados.

Figura 25. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Psidium guajava* e *Punica granatum* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

As Figuras 26 e 27 ilustram respectivamente a inibições promovidas pela associação entre os extratos das folhas das espécies *P. guajava* e *S. cumini* e pela associação entre os extratos das folhas das espécies *P. granatum* e *S. cumini* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*, e as compara com a dos extratos isolados. O efeito de ambas as associações foi semelhante ou inferior a pelo menos um dos extratos isolados em quase todas as concentrações testadas, e as melhores inibições sobre crescimento da *S. aureus* em ambas as associações ficou entre 70 e 75%. Na Figura 27, é possível observar que a maior concentração, 8 mg/mL, da associação entre os extratos das folhas das espécies *P. granatum* e *S. cumini* promoveu uma inibição 20% maior que a dos extratos isolados sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*, no entanto inferior a 75%.

Figura 26. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Psidium guajava* e *Syzygium cumini* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 27. Efeito da associação entre os extratos hidroalcoólicos das folhas das plantas *Punica granatum* e *Syzygium cumini* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

5.6. Atividade Antimicrobiana do Xilitol e sua Associação com os Extratos Hidroalcoólicos

A Tabela 5 apresenta os resultados do crescimento bacteriano na presença de diferentes concentrações do xilitol. Exceto na concentração de 1 mg/mL, o xilitol promoveu alguma inibição sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*, expresso pela diminuição da média da absorbância em relação ao crescimento controle. A porcentagem máxima de inibição, 48%, foi observada com a presença de 8 mg/mL de xilitol (Figura 28).

Tabela 5. Crescimento bacteriano normal (Controle) e frente às diferentes concentrações de xilitol expresso pelos valores de absorbância (540 nm).

	CONCENTRAÇÃO DO XILITOL (mg/mL)							C
	0,5	1	2	4	8	10	12	
<i>S. aureus</i>	0,60	0,71	0,44	0,51	0,36	0,37	0,61	0,69
	± 0,02	± 0,03	± 0,00	± 0,02	± 0,04	± 0,01	± 0,04	± 0,06
<i>E. coli</i>	0,51	0,58	0,57	0,54	0,51	0,56	0,59	0,50
	±0,05	± 0,04	± 0,02	± 0,01	± 0,04	± 0,01	± 0,02	± 0,02

C – Controle

Resultados expressos como Média ± Desvio-Padrão, n = 3

Para verificar se haveria um aumento desta atividade sobre o crescimento deste microrganismo com concentrações maiores desta substância, 10 e 12 mg/mL de xilitol foram ensaiadas. No entanto, com 10 mg/mL a inibição do crescimento foi muito semelhante à observada na concentração anterior e com 12 mg/mL houve uma brusca queda de aproximadamente 36% nesta

capacidade inibitória (Figura 28). Estes ensaios foram repetidos e reproduziu-se este mesmo fenômeno.

A presença de xilitol durante o crescimento da bactéria Gram-negativa *E. coli* não resultou em alterações em todas as concentrações testadas (Figura 28).

Figura 28. Efeito do Xilitol sobre o crescimento bacteriano. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

A Tabela 6 apresenta os resultados do crescimento bacteriano na presença de diferentes concentrações das associações entre o xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas frescas das espécies *E. uniflora*, *P. guajava*, *P. granatum* ou *S. cumini*. Todas as concentrações das associações acima promoveram alguma inibição sobre o crescimento bacteriano expresso pela diminuição da média da absorbância em relação ao crescimento controle.

Tabela 6. Crescimento bacteriano normal (Controle) e frente às associações entre o xilitol e os extratos hidroalcoólicos das folhas das diferentes espécies de plantas expresso pelos valores de absorbância (540 nm).

		ASSOCIAÇÕES							
		Xilitol <i>E. uniflora</i>		Xilitol <i>P. guajava</i>		Xilitol <i>P. granatum</i>		Xilitol <i>S. cumini</i>	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	0,5	0,04 ± 0,01	0,64 ± 0,08	0,26 ± 0,03	0,70 ± 0,06	0,17 ± 0,02	0,64 ± 0,04	0,61 ± 0,05	0,27 ± 0,05
	1	0,01 ± 0,01	0,45 ± 0,05	0,26 ± 0,03	0,56 ± 0,01	0,18 ± 0,00	0,48 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,34 ± 0,03
	2	0,02 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,49 ± 0,04	0,06 ± 0,00	0,34 ± 0,03
	4	0,01 ± 0,02	0,59 ± 0,08	0,18 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,24 ± 0,04	0,51 ± 0,08	0,16 ± 0,02	0,33 ± 0,01
	8	0,03 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,53 ± 0,02	0,33 ± 0,03	0,30 ± 0,05	0,28 ± 0,07	0,41 ± 0,04
C		0,82 ± 0,00	0,80 ± 0,04	0,46 ± 0,03	0,80 ± 0,00	0,61 ± 0,10	0,84 ± 0,03	0,69 ± 0,06	0,50 ± 0,02

C – Controle

Resultados expressos como Média ± Desvio-Padrão, n = 3

A associação entre o xilitol e o extrato das folhas da planta *E. uniflora* destacadamente em todas as concentrações testadas promoveu uma inibição maior que 95% sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*, alcançando aproximadamente 99% na concentração de 1 mg/mL (Figura 29). A maior porcentagem de inibição sobre o crescimento deste microrganismo promovida pelo extrato isolado das folhas da espécie *E. uniflora* foi com uma concentração maior, 4 mg/mL, e 10% menor que a promovida pela associação (Figura 29).

Figura 29. Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Eugenia uniflora* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

No entanto, a atividade desta mesma associação entre o xilitol e o extrato das folhas da espécie *E. uniflora* sobre o crescimento da bactéria *E. coli* não apresentou nenhuma vantagem sobre a ação inibitória do extrato isolado desta espécie de planta sobre este microrganismo (Figura 30).

Figura 30. Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Eugenia uniflora* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

A associação entre o xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *P. guajava* promoveu uma inibição gradual do crescimento da bactéria *S. aureus* conforme o aumento da concentração utilizada, chegando a 65% (Figura31). Apesar de esta inibição ser maior que a produzida pelo xilitol, é possível visualizar na Figura 31 que ela foi 30% menor que a maior inibição promovida pelo extrato isolado.

A Figura 32 ilustra a inibição promovida por diferentes concentrações do xilitol, do extrato das folhas de *P. guajava* e da associação entre estas substâncias sobre o crescimento da *E. coli*. A associação diferentemente das substâncias isoladas promoveu alguma inibição sobre o crescimento desta bactéria em todas as concentrações testadas e a maior inibição do crescimento produzida foi de 44% com 2 mg/mL.

Figura 31. Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Psidium guajava* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 32. Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Psidium guajava* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

A porcentagem de inibição provocada pela associação entre o xilitol e o extrato das folhas da espécie *P. granatum* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* foi semelhante a do extrato isolado das folhas desta planta, ao redor de 73%. No entanto, a concentração necessária para promover esta porcentagem de inibição com a associação entre o xilitol e o extrato, 0,5 mg/mL, foi 8 vezes menor que a do extrato isolado, 4 mg/mL (Figura 33).

Figura 33. Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Punica granatum* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

De todos os ensaios realizados com a bactéria *E. coli* a associação entre o xilitol e o extrato das folhas da planta *P. granatum* foi o que apresentou o melhor resultado. Esta associação manteve uma porcentagem de aproximadamente 40% de inibição sobre o crescimento deste microrganismo no intervalo de concentração entre 1 e 4 mg/mL que aumentou para 62% na maior concentração estudada, 8 mg/mL (Figura 34).

Figura 34. Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Punica granatum* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

O padrão de inibição sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* promovido pela associação entre o xilitol e o extrato das folhas da espécie *S. cumini* em função das concentrações crescentes testadas foi semelhante a do extrato isolado desta planta, no entanto com porcentagens maiores de inibição para quase todas as concentrações (Figura 35). A máxima inibição observada sobre o crescimento deste microrganismo foi de 91% na presença de 2 mg/mL desta associação.

A Figura 36 mostra que o crescimento da bactéria *E. coli* na presença da associação entre o xilitol e o extrato das folhas da planta *S. cumini* foi inibido em uma porcentagem semelhante à observada com o extrato isolado, inferior a 35%, para a maioria das concentrações testadas. Na presença desta associação na menor concentração, 0,5 mg/ml, a inibição do crescimento da *E. coli* foi maior que a promovida pelo extrato isolado 46%.

Figura 35. Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Syzygium cumini* sobre o crescimento da bactéria *S. aureus*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

Figura 36. Efeito da associação entre o Xilitol e o extrato hidroalcoólico das folhas da planta *Syzygium cumini* sobre o crescimento da bactéria *E. coli*. Os dados são expressos em porcentagem de inibição em relação ao crescimento normal de cada microrganismo.

6. DISCUSSÃO

6.1. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies *E. uniflora*, *P. guajava*, *P. granatum* e *S. cumini* promoveram algum nível de inibição sobre o crescimento bacteriano (Tabela 3), o que está de acordo com os trabalhos de Fiuza et al. (2008), Duraipandiyan et al. (2006), Gonçalves et al. (2005) e Michelin et al. (2005) que também observaram atividade antimicrobiana para estas espécies vegetais. No entanto, a porcentagem de inibição foi consideravelmente menor para a bactéria *E. coli* quando comparada a porcentagem de inibição promovida sobre a bactéria *S. aureus* (Figuras 12, 13, 14 e 15), alcançando no máximo 44% de inibição com 1 mg/mL do extrato das folhas da planta *E. uniflora* (Figura 12).

A maior resistência de bactérias Gram-negativas aos extratos vegetais também foi verificada por diversos autores. Magina et al. (2009) e Fiuza et al. (2008) observaram que tanto o óleo essencial quanto o extrato hidroalcoólico das folhas de plantas do gênero *Eugenia* inibiam o crescimento de bactérias Gram-positivas em concentrações inferiores aquelas necessárias para inibir espécies de bactérias Gram-negativas. Ainda, estudos empregando o método de difusão em ágar para avaliar a sensibilidade de microrganismos a extratos vegetais obtidos por meio de solventes orgânicos, incluindo a *P. guajava*, *P. granatum* e *S. cumini*, observaram um maior número de bactérias Gram-negativas resistentes ou com halo de inibição de diâmetro menor quando comparado com bactérias Gram-positivas (NAIR; CHANDA, 2007; DURAIPANDIYAN et al., 2006; GONÇALVES et al., 2005). A maior resistência das bactérias Gram-negativas aos extratos vegetais pode ser explicada pela presença da membrana externa que representa uma barreira para muitas substâncias, incluindo antibióticos (PALOMBO; SEMPLE, 2001), e pela presença de enzimas no espaço periplasmático capazes de quebrar moléculas não reconhecidas

(DUFFY; POWER, 2001). Além disso, as bactérias Gram-negativas possuem bombas de efluxo que reduzem os níveis de antibióticos intracelulares (KOHLENER et al., 1999).

O crescimento da bactéria *S. aureus* na presença de 4 mg/mL do extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *E. uniflora* foi inibido em quase 90% (Figura 12). Em estudos anteriores as concentrações do extrato necessárias para inibir o crescimento deste microrganismo foram maiores, como 80 mg/mL (AURICCHIO et al., 2007), ou menores, como 2,187 mg/mL e 0,25 mg/mL (FIÚZA et al., 2008; HOLETZ et al., 2002), que aquelas utilizadas no presente trabalho. Estudos recentes evidenciaram neste extrato a presença de flavonóides e principalmente taninos que parecem estar envolvidos na atividade antimicrobiana (FIÚZA et al., 2008; AURICCHIO et al., 2007). Nos relatos de Haslam (1996), os taninos apresentam a habilidade de complexar-se com macromoléculas, tais como polissacarídeos e proteínas, atuando sobre o crescimento bacteriano.

No presente trabalho o extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *P. guajava* promoveu quase 100% de inibição sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* (Figura 13). Trabalhos publicados nos últimos cinco anos, utilizando metodologias diversas, confirmaram esta atividade antimicrobiana do extrato das folhas desta espécie, no entanto, a menor concentração inibitória variou entre 0,25 mg/mL a 5 mg/mL (CHOMNAWANG et al., 2009; USHIMARU et al., 2007; SANCHES et al., 2005). Triagens fitoquímicas confirmaram a presença de taninos e flavonóides, possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana (CHOMNAWANG et al., 2009; IHA et al., 2008; SANCHES et al., 2005; BEGUM et al., 2004).

A casca dos frutos da espécie vegetal *P. granatum* tem sido bastante estudada ao longo dos anos quanto ao seu potencial antimicrobiano. Em exceção, o presente trabalho avaliou a ação do extrato hidroalcoólico das folhas desta espécie e verificou uma inibição parcial (74%) sobre o

crescimento de uma cepa padrão de *S. aureus* (Figura 14). Os resultados obtidos por outros autores com respeito a atividade do extrato da casca sobre o microrganismo *S. aureus* são significativos. Al-Zoreky (2009) verificou que com 2 mg/mL de extrato metanólico foi possível inibir completamente o crescimento de uma cepa padrão, enquanto Michelin et al. (2005) não observaram nenhuma inibição sobre o crescimento desta mesma cepa até a concentração de 100 mg/mL do extrato hidroalcoólico. Ensaio recentes com cepas resistentes de *S. aureus* determinaram atividade antimicrobiana para o extrato aquoso da casca da espécie *P. granatum*, com concentração inibitória mínima variando entre 12,5 a 25 mg/mL (GOULD et al., 2009). Djipa et al., 2000 sugerem que a atividade antimicrobiana está relacionada com a alta quantidade de taninos presentes neste vegetal, já que a eliminação destes suprimiu esta propriedade. Em 2002, Machado et al. mostraram especificamente que o tanino punicalagina é a substância responsável por esta atividade.

O crescimento da bactéria *S. aureus* também foi diminuído em 70% na presença de 2 mg/mL de extrato hidroalcoólico das folhas da espécie *S. cumini* (Figura 15), o que corrobora com trabalhos anteriores que verificaram sensibilidade desta bactéria a extratos desta planta (DURAIPANDIYAN et al., 2006; LOGUERCIO et al., 2005). Oliveira et al. (2007a), no entanto, verificaram 100% de inibição do crescimento com uma concentração dez vezes menor, 0,2 mg/mL. Para cepas resistentes de *S. aureus* foi necessária uma concentração de 300 mg/mL do extrato etanólico da *S. cumini* para promover inibição completa do crescimento microbiano (NASCIMENTO et al., 2000). Assim como nas outras espécies de vegetais estudadas, a atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *S. cumini* parece estar associada à ação de taninos e de outros compostos fenólicos constituintes. Esta espécie de planta é conhecida por ser muito rica em derivados do ácido gálico e elágico (MAHMOUD et al., 2001; CHATTOPADHYAY et al.,

1998). Além disso, estudos fitoquímicos isolaram flavonóides glicosilados, canferol, miricetina e outros polifenóis das folhas de *S. cumini* (TIMBOLA et al., 2002; MAHMOUD et al., 2001).

Considerando que o princípio ativo representa uma pequena porção das substâncias extraídas, muito provavelmente as variações das concentrações necessárias para se obter a melhor atividade microbiana para determinado extrato estão relacionadas ao protocolo experimental diversificado. É comprovado que a quantidade das substâncias químicas presentes nas folhas das plantas varia sazonalmente e que a porcentagem da solução hidroalcoólica, bem como a desidratação ou não das folhas também influencia no processo de extração dos princípios ativos. Recentemente, Costa et al. (2009) comprovou a influência sazonal na composição química dos óleos essenciais das folhas de *E. uniflora*. A influência da proporção entre etanol e água de uma solução hidroalcoólica sobre a atividade antimicrobiana foi observada em 2005 pelos ensaios realizados por Sanches et al. sobre as bactérias *S. aureus* e *Bacillus subtilis*. Ainda, um estudo comparativo da atividade bactericida entre extratos obtidos de folhas secas e frescas das espécies *P. guajava* e *Psidium cattleianum* mostraram resultados superiores para os extratos das folhas secas (PRESTES et al., 2008).

Excepcionalmente, no presente estudo foi observado que para as espécies *E. uniflora*, *P. granatum* e *S. cumini* a porcentagem de inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* diminuiu na presença de elevadas concentrações do extrato (Figuras 12, 14 e 15). Estes ensaios foram repetidos e reproduziu-se este mesmo fenômeno, cuja possível explicação seria a ocorrência na mesma planta de substâncias com propriedade antagônicas, dose-dependentes, entre si, uma vez que o extrato bruto pode apresentar vários princípios ativos associados (SIXEL; PECINALLI, 2005).

6.2. Atividade Antimicrobiana da Associação entre os Extratos Hidroalcoólicos

No ano 2000, Nascimento et al. avaliaram o efeito combinado entre extratos vegetais e antimicrobianos mostrando efeitos sinérgicos com esta associação. Este trabalho inovador estimulou novas pesquisas sobre este efeito sinérgico entre drogas conhecidas como agentes antimicrobianos e extratos de plantas nos últimos dez anos (ADWAN; MHANNA 2008; BETONI et al., 2006; AQIL et al., 2005; ABURJAI et al., 2001). Empregando princípios semelhantes, o presente trabalho associou extratos de diferentes espécies de plantas com atividade antimicrobiana comprovada e obteve efeitos inibitórios sinérgicos destacados sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* com a associação entre as espécies *E. uniflora* e *P. guajava* e a associação entre as espécies *E. uniflora* e *P. granatum* (Figuras 22 e 23). A combinação entre estes extratos não só aumentou a porcentagem de inibição sobre o crescimento desta bactéria, mas também diminuiu a concentração do extrato necessária para promover o maior efeito. Este aumento na potência é importante, pois teoricamente quanto menor a concentração necessária menores serão os possíveis efeitos tóxicos promovidos *in vivo*.

Algumas associações entre extratos também modificaram a resposta da bactéria Gram-negativa *E. coli*. Foram observadas mudanças no perfil da resposta para as diferentes concentrações testadas (Figuras 20 e 21), no entanto a magnitude da inibição não foi expressiva uma vez que a maior porcentagem de inibição do crescimento bacteriano foi de 50% com a associação dos extratos das espécies *E. uniflora* e *S. cumini* (Figura 18).

O sinergismo entre drogas antimicrobianas e extrato de plantas medicinais é um conceito novo que vem sendo estudado com sucesso. O sinergismo entre extrato de plantas de diferentes espécies com atividade antimicrobiana proposto e comprovado por este trabalho é inédito e

possibilita um vasto campo de pesquisa utilizando misturas naturais no controle de microrganismos, uma vez que não foi encontrado nenhum trabalho semelhante na literatura.

6.3. Atividade Antimicrobiana do Xilitol e sua Associação com os Extratos Hidroalcoólicos

O xilitol é descrito na literatura com uma substância capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas, como por exemplo, as do gênero *Streptococcus* (GONÇALVES et al., 2001; TAPIAINEN et al., 2001). No entanto, assim como no presente estudo esta inibição é parcial, não se estabelecendo uma concentração inibitória mínima. A máxima inibição em relação ao crescimento normal da bactéria *S. aureus* foi de 48% na presença de 8 mg/mL de xilitol (Figura 28).

O mecanismo pelo qual o xilitol inibe o crescimento bacteriano não está totalmente esclarecido (PEREIRA et al., 2009), porém é parcialmente explicado pela inibição da glicolise, promovida por esta substância, por meio do uso do sistema frutose-fosfotransferase, interferindo no crescimento e metabolismo bacteriano (TRAHAN et al., 1985). No interior da célula bacteriana, a molécula do açúcar é fosforilada, resultando na produção de xilitol-5-fosfato, que não pode ser metabolizada (ASSEV; ROLLA, 1986). O acúmulo deste metabólito resulta na inibição da produção de enzimas glicolíticas e posteriormente, o xilitol-5-fosfato é excretado da célula bacteriana (SÖDERLING; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 1989). Esse processo é responsável por um ciclo que consome energia, mas não produz a energia necessária para manutenção e desenvolvimento das bactérias (ASSEV; ROLLA, 1986).

Os ensaios com a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, no entanto, não mostraram nenhuma ação do xilitol sobre este microrganismo (Tabela 5 e Figura 28). Estes resultados corroboram com os da literatura que também não observaram inibição de bactérias Gram-

negativas na presença desta substância. Exemplo disto foram os resultados obtidos por Moreira et al. (2009), ao avaliarem a atividade *in vitro* de antissépticos bucais contendo xilitol, e Kontiokari et al. (1995), ao avaliarem o efeito *in vitro* do xilitol sobre bactéria da nasofaringe. Em ambos os trabalhos o xilitol não interferiu no crescimento de microrganismos Gram-negativos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*.

Algumas associações entre os extratos das folhas das plantas com o xilitol promoveram efeitos inibitórios sinérgicos tanto sobre a bactéria *S. aureus* (Figuras 29 e 35) quanto para a bactéria *E. coli* (Figuras 32 e 34).

Sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* a associação do xilitol ao extrato da espécie *E. uniflora* ou ao extrato da espécie *S. cumini* promoveu inibições superiores as dos extratos isolados e em concentrações menores (Figuras 29 e 35). Ressalta-se o efeito da associação do xilitol com o extrato da *E. uniflora*, pois foram verificadas inibições superiores a 90% em relação ao crescimento normal da bactéria *S. aureus* para todas as concentrações testadas (Figura 29). Estes resultados estão de acordo com o único trabalho encontrado na literatura cujo objetivo foi verificar o efeito inibitório da associação de um extrato de planta com o xilitol. Nesta pesquisa, Kim et al. (2007) observaram que a atividade bactericida da associação entre xilitol e extrato da planta da espécie *Curcuma xanthorrhiza* sobre as bactérias Gram-positivas *Streptococcus mutans* e *Actinomyces viscosus* foi mais rápida e com concentrações menores, quando comparada com suas atividades isoladas.

As associações entre o xilitol e o extrato das plantas *P. guajava* ou *P. granatum* apresentaram efeitos inibitórios superiores sobre o crescimento da bactéria *E. coli*, quando comparados com seus efeitos isolados (Figuras 32 e 34). No presente trabalho, a maior atividade antibacteriana, 62% de inibição, obtida para esta bactéria Gram-negativa, considerando todos os extratos e

associações testadas, foi com 8 mg/mL da associação entre o xilitol e o extrato da espécie *P. granatum* (Figura 34).

O efeito inibitório sinérgico observado com a associação entre o xilitol e o extrato hidroalcoólico de espécies vegetais sobre o crescimento das bactérias é uma informação nova. No entanto, observações feitas sobre as alterações promovidas pelo xilitol na estrutura bacteriana e no na concentração de sal do local de crescimento destes microrganismos pode, parcialmente explicar este fenômeno, uma vez que facilitariam a entrada na célula de substâncias ativas presentes no extrato. Análises ultra-estruturais das bactérias *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus mutans* expostas ao xilitol mostraram células com cápsulas irregulares, paredes celulares difusas e formações lamelares na membrana plasmática sem, no entanto, alterar a viabilidade das células (TUOMPO et al., 2007; TAPIAINEN et al., 2004). Outros trabalhos mostraram que o xilitol diminui a concentração de sal na superfície das vias aéreas, o que reforça a defesa imunológica inata ao facilitar a ação dos antimicrobianos endógenos (ZABNER et al., 2000). Variações na concentração de sal podem aumentar ou diminuir a susceptibilidade de microrganismos a fármacos antimicrobianos. Exemplo disto foi observado por Medeiros et al. (1971) ao verificarem que o aumento da concentração de sal aumentava a concentração inibitória mínima da gentamicina para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*.

Os resultados do presente estudo sugerem que as associações entre os extratos vegetais e o xilitol promovem um efeito adicional ao inibir o crescimento bacteriano quando comparado com os extratos isolados. Considerando que as substâncias presentes nos extratos das plantas responsáveis pela ação antimicrobiana estão em pequenas quantidades e que possíveis efeitos tóxicos são dependentes das doses, conhecer e investigar a associação destas substâncias com o xilitol revelou-se uma alternativa adicional para potencializar o efeito antimicrobiano.

Diante do exposto, os resultados do presente estudo contribuem na busca de novas alternativas terapêuticas antimicrobianas, uma vez que pode servir de subsídio para novos estudos químicos e farmacológicos a partir de fontes naturais brasileiras. Ainda, a observação dos efeitos sinérgicos de misturas naturais possibilita um vasto campo de pesquisas gerador de novos conhecimentos científicos, considerando as inúmeras possibilidades de interações farmacológicas.

7. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste estudo conclui-se que:

- Os extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava*, *Punica granatum* e *Sizygium cumini* inibiram o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. No entanto, a espécie Gram-positiva *Staphylococcus aureus* mostrou-se mais sensível aos extratos, uma vez que apresentou porcentagens de inibição sobre o crescimento superiores as da espécie Gram-negativa *Escherichia coli*.
- Todas as associações entre os extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade antibacteriana. No entanto, as associações entre os extratos das folhas das espécies *Eugenia uniflora* e *Psidium guajava* e das espécies *Eugenia uniflora* e *Punica granatum* promoveram inibições superiores e em concentrações menores sobre o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* quando comparadas com as inibições promovidas pelos extratos isolados, indicando um efeito antimicrobiano sinérgico entre estes extratos.
- O xilitol inibiu aproximadamente em 50% o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* e não interfere no crescimento da bactéria *Escherichia coli*.
- Todas as associações entre o xilitol e os extratos hidroalcoólicos apresentaram atividade antibacteriana. As associações entre o xilitol e os extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* apresentaram um efeito antimicrobiano sinérgico sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*. As associações entre o xilitol e os extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies *Psidium guajava* e *Punica granatum* apresentaram um efeito antimicrobiano sinérgico sobre a bactéria *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS

- ABURJAI, T.; DARWISH, R. M.; AL-KHALIL, S.; MAHGZAH, A.; AL-ABBDI, A. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Ethnopharmacol.**, v.76, p.39-44, 2001.
- ADEBAJO, A. C.; OLOKE, K. J.; ALADESANMI, A. J. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. **Fitoterapia**, v.60, p.451-55, 1989.
- ADWAN, G.; MHANNA, M. Synergistic Effects of Plant Extracts and Antibiotics on *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v.3, n.3, p.134-139, 2008.
- AGUIRRE-ZERO, O. ; ZERO, T. O.; PROSKIN, M. H. Effect of Chewing Xylitol on Salivary Flow Rate and the Acidogenic Potential of Dental Plaque. **Caries Research**, v.27, p.55-59, 1993.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.678-689, 2006.
- ALICE, C. B.; VARGAS, V. M.; SILVA, G. A.; DE SIQUEIRA, N. C.; SCHAPOVAL, E. E.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J. A.; HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **J Ethnopharmacol.** V.35, p.165-171, 1991.
- ALMEIDA, E. R. **Plantas medicinais Brasileiras**. São Paulo: Ed. Hemus, 1993, 341p.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones S.R.L.; 1998. p.808-810.
- ALTERTHUM, F.; TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2003, 720p.
- ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica do extrato de *P. guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Cândida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. **Ver. Brás. Farmacognosia**, v.16, p.192-196, 2006.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p.367-373, 2000.
- AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, p.244-248, 2009.
- ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. **J Ethnopharmacol.** v.39, n.2, p.119-128, 1993.

ANGELY, J. **Flora analítica do Paraná**. São Paulo: USP, 1965. p.487-491.

ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.**, v.31, n.4, p.244-248, 2004.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev Bras Farmacogn**, v.16, p.517-524, 2006.

AQIL, F.; KHAN, M. S. A.; OWAIS, M.; AHMAD, I. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of β -lactamase producing methicilin resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Basic. Microbiol.**, v.45, n.106-114, 2005.

ASSEV, S.; RÖLLA, G. Further studies on the growth inhibition of *Streptococcus mutans* OMZ 176 by xylitol. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand**, v.94, p.97-102, 1986.

AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Lat. Am. J. Pharm**, v.26, n.1, p.76-81, 2007.

AVIRAM, M.; DORNFELD, L.; ROSENBLAT, M.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; COLEMAN, R.; HAYEK, T.; PRESSER, D.; FUHRMAN, B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.71, n.5, p.1062-1076, 2000.

BANDONI, A. L.; MENDIONDO, M. E.; RONDINA, R. V.; COUSSIO, J. D. Survey of Argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. **Lloydia**, v.35, p.69-80, 1972.

BAYDAR, H.; SADDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, p.169-172, 2004.

BEGUM, S.; HASSAN, S. I.; ALI, S. N.; SIDDIQUI, B. S. Chemical constituents from the leaves of *Psidium guajava*. **Nat Prod Res**, v.18, n.2, p.135-140, 2004.

BENERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. *In vitro* study os antoxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, n.4, p.727-733, 2005.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3/4, 2005.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, n.4, p.387-390, June, 2006.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. **Food Chem**, v.85, p.415-421, 2004.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CARCERES, A.; FLETES, L.; AGUILAR, O.; RAMIREZ, L.; FIGUEROA, A.; TARACENA, B. J. **Ethnopharmacol.** v.33, p.277-283, 1991.

CARVALHO, A. A. T.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; MELO, F. M.; SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A.; HIGINO, J. S. Atividade Antimicrobiana *in vitro*, de Extratos Hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre Bactérias Gram-Negativas. **Acta Farm. Bonaerense**. v.21, n.4, p.255-258, 2002.

CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, M. A.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, n.5, p.541-544, 2004.

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

CHATTOPADHYAY, D.; SINHA, B. K.; VAID, L.K. Antibacterial activity of *Syzygium* species. **Fitoterapia**, v.69, p.356-367, 1998.

CHAUDIHURI, A. K. N.; PAL, S.; BHATTACHARYA, G.; BHATTACHARYA, S. Antiinflammatory and related actions of *Syzygium cumini* seed extract. **Phytotherapy Research**, v.4, n.1, p.5-10, 1990.

CHOI, J. G.; KANG, O. H.; LEE, Y. S.; CHAE, H. S.; OH, Y. C.; BRICE, O. O.; KIM, M. S.; SOHN, D. H.; KIM, H. S.; PARK, H.; SHIN, D. W.; RHO, J. R.; KWON, D. Y. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of *Punica granatum* peel ethanol extract against *Salmonella*. **eCAM**, August, p.1-8, 2009.

CHOMNAWANG, M. T.; SURASSMO, S.; WONGSARIYA, K.; BUNYAPRAPHATSARA, N. Antibacterial activity of Thai Medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**, v.80, p.102-104, 2009.

COELHO, A. M. S. P.; SILVA, G. A.; VIEIRA, O. M. C.; CHAVASCO, J. K. Atividade antimicrobiana de *Bixa orellana* L. (Urucum). **Revista Lecta**, v.21, n.1/2, p.47-54, 2003.

CONSOLINI, A. E.; BALDINI, O. A.; AMAT, A. G. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **J Ethnopharmacol**, v.66, p.33-91, 1999.

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. **J Ethnopharmacol**, v.81, p.57-63, 2002.

COSTA, D. P.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. Seasonal variability of essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.20, n.7, p.1287-1293, 2009.

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

DANADIO, L. C.; NACHTIGAL, J. C.; SACRAMENTO C. K. **Frutas exóticas**. Jaboticabal: Funep, 1998, p.119-120.

DANISCO, P. P. **Comparing extraction by traditional solvents with supercritical extraction from an economic and environmental standpoint**. ISASF-CD-Rom. Versailles, France, 2001.

DAS, A. K.; MANDAL, S. C.; BANERJEE, S. K.; SINHA, S.; SAHA, B. P.; PAL, M. Studies on the hypoglycemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. **Phytotherapy Research**, v.15, n.7, p.628-629, 2001.

DESMARCHELIER, C.; LISBOA ROMÃO, R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol**, v.67, p.69-77, 1999.

DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). **J Ethnopharmacol**, v.71, p.307-313, 2000.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.14, n.1, p.06-08, 2004.

DUFFY, C. F.; POWER, R. F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **Int J Antimicrob Agents**, v.17, p.527-529, 2001.

DURAI PANDIYAN, V.; AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, Índia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.6, n.35, 2006.

EMODI, A. Xylitol: its properties and food applications. **Food Technology**. p.28-32, Jan., 1978.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, s.p. 1988-2003.

FERREIRA, A.B.H. **Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa**. 3^a ed. Curitiba: Positivo, 2004. 2120p.

FESSENDEN, R. J. **Organic chemistry**. Boston: Willard Grant Pres, 1982.

FIÚZA, T. S.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F.; PIMENTA, F. C. Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, V.29, n.3, p.245-250, 2008.

GBOLADE, A. A.; ILESANMI, O. R.; ALADESANMI, A. J.; The contractile effects of the extracts of *Eugenia uniflora* on isolated rat duodenum. **Phytother. Res.**, v.10, p.613-615, 1996.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GONÇALVES, N. C. L. A. V.; VALSECKI JÚNIOR, A.; SALVADOR, S. L. S.; BERGAMO, G. C. Efeito de soluções fluoretadas contendo xilitol e sorbitol no número de estreptococos do grupo mutans na saliva de seres humanos. **Pan Am J Public Health**, v.9, n.1, 2001.

GOULD, S. W. J.; FIELDER, M. D.; KELLY, A. F.; NAUGHTON D. P. Anti-microbial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by cupric sulphate against clinical isolates of *S. aureus*, MRSA and PVL positive CA-MSSA. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.9, n.23, 2009.

GROPPO, F. C.; RAMACCIATO, J. C.; SIMÕES, R. P.; FLÓRIO, F. M.; SARTORATTO, A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **Int Dent J**, v.52, p.433-437, 2002.

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S. Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p.461-470, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicines: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v.59, p.205-215, 1996.

HERNANDÉZ, N. M. R.; AGUILERA, M. M.; ÁLVAREZ, B. R. Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav. **Rev. Cubana Plant Med**, Cuba, v.9, n.2, 2004.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C. P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R. M. *Qualea grandiflora*, a Brazilian "Cerrado" medicinal plant presents an important antiulcer activity. **J Ethnopharmacol.**, v.104, p.207-214, 2006.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **J Essent Oil Res**, v.15, p.428-433, 2003.

HUI, Y.H. **Handbook of food products manufacturing**. New York, John W. & Sons Publication, 2007.

IHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.387-393, 2008.

JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P.; SURIYAWONG, P.; SUMAL-SARAYA, M. L.; RUANGSOMBOON, O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. leaf extract. **J.Ethnopharmacol.**, v.67, p.203-12, 1999.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A.; Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J Ethnopharmacol**, v.94, p.93-100, 2004.

KAPOOR, L. D. **Handbook of ayurvedic medicinal plants**. Boca Ranton: CRC, 1990. 416p.

KELAWARA, N. S.; ANANTHANARAYAN, L. Antioxidant activity of selected foodstuffs. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.55, n.6, p.511-516, 2004.

KIM, H. S.; CHOI, C. H.; KWON, H. K.; KIM, B. I. Combined inhibitory effect of *Curcuma xanthorrhiza* extract and Xylitol on *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*. **Key Engineering Materials**, v.342-343, p.861-864, 2007.

KOHLER, T.; PECHERE, J. C.; PLESIAT, P. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. **Cell Mol Life Sci**, v.56, p.771-778, 1999.

KOHNO, H.; SUZUKI, R.; YASUI, Y.; HOSOKAWA, M.; MIYASHITA, K.; TANAKA, T. Pomegranate seed oil rich in conjugated linoleic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. **Cancer Science**, v.95, n.6, p.481-486, 2004.

KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; KOSKELA, M. Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria *in-vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.39, p.1820-1823, 1995.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? **British of Medicine Journal**, v.321, n.4, p.1153-1154, 2000.

- LANGMEAD, L.; RAMPTON, D. S. Review article: herbal treatment in gastrointestinal and liver disease – benefits and dangers. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.15, p.1239-1252, 2001.
- LEE, M. H.; NISHIMOTO, S.; YANG, L. L.; YEN, K. Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, Y. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimmers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**, v.44, p.1343-1349, 1997.
- LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev Bras Farmacogn.**, v.16, p.300-306, 2006.
- LIN, J.; PUCKREE, T.; MVELASE, T.P. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. **J. Ethnopharmacol.**, v.79, p.53-56, 2002.
- LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidroalcolico de folhas de Jambolão (*Syzygium cumini*). **Ciência rural**, Santa Maria, v.35, n.2, 2005.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992. p.269.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. p.350-351.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil** – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3^a ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001. 1088p.
- LOURENÇO, M. V. Biotecnologia de plantas medicinais: produção de biomoléculas. **Biológico**, v.65, n.1/2, p.63-65, 2003.
- LOZOYA, X.; REYES-MORALES, H.; CHÁVEZ-SOTO, M. A.; MATÍNEZ-GARCÍA, M. C.; SOTO-GONZÁLEZ, Y.; DOUBOVA, S. V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **J.Ethnopharmacol.**, v.83, p.19-24, 2002.
- LUTTERODT, G. D.; MALEQUE, A. Effects on mice locomotor-activity of a narcotic-like principle from *Psidium guajava* leaves. **J.Ethnopharmacol.**, v.24, n.2/3, p.219-31, 1988.
- LYNCH, H.; MILGRON, P. Xylitol and dental caries: An overview for clinicians. **J Calif Dent Assoc.**, v.31, p.205-209, 2003.
- MACHADO, T. B.; LEAL I. C. R.; AMARAL A. C. F.; SANTOS K. R. N.; SILVA M. G.; KUSTER R. M. Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.13, n.5, p.606-610, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos interdisciplinares. **Química Nova**, v.25, p.429-438, 2002.

MACIEL, M. C. G.; FARIAS, J. C.; MALUF, M. J.; GOMES, E. A.; PEREIRA, P. V. S.; ARAGÃO-FILHO, W. C.; FRAZÃO, J. B.; COSTA, G. C.; SOUSA, S. M.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M. M.; RUSSO, M.; GUERRA, R. N. M.; NASCIMENTO, F. R. F. *Syzygium jambolanum* treatment improves survival in lethal sepsis induced in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.8, n.57, 2008.

MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI JR., A.; SIMIONATTO, E.L.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **J. Nat. Med.**, v.63, p.345-350, 2009.

MAHMOUD, I. I.; MARZOUK, M. S. A.; MOHARRAM, F. A.; EL-GINDI, M. R.; HASSAN, A. M. K. Acylated flavonol glycosides from *Eugenia jambolana* leaves. **Phytochemistry**, v.58, p.1239-1244, 2001.

MÁKINEN, K.K. Can the pentitol-hexitol theory explains the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses** , v.54, n.4, p.603-613, 2000.

MANOSROI, J.; DHUMTANOM, P.; MANOSROI, A. Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. **Cancer Lett.**, p.1-7, 2005.

MARCHIORI, J. N.; SOBRAL, M. **Dendrologia das angiospermas: myrtales**. Santa Maria : UFSM, 1997. 304p.

MARTIN, M. J.; LA-CASA, C.; ALARCON-DE-LA-LASTRA, C.; CABEZA, J.; VILLEGAS, I.; MOTILVA, V. Anti-oxidant mechanisms involved in gastroprotective effects of quercetin. **J. Bioscience**, v.53, n.1/2, p.82-88, 1998.

MATSUMURA, T.; KASAI, M.; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y.; ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y. a-Glucosidase inhibitors from Paraguayan natural medicine, Nangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*. **Pharm Biol**, v.38, p.302–307, 2000.

MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; CECIM, M. Estudo da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais diabéticos. **Ciência Rural**, v.33, n.6, p.1062-1065, 2003.

MEDEIROS, A. A.; O'BRIEU, T. F.; WACKER, W. E. C.; YULUG, N. F. Effect of salt concentration on the apparent *in vitro* susceptibility of *Pseudomonas* and other Gram-negative Bacilli to Gentamicin. **The Journal of Infectious Diseases**, v.124, 1971.

MENDONÇA-FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S. Estudo da utilização de plantas medicinais pela população da Ilha Grande-RJ. **Rev Bras Farmacogn**, v.13, p.55-58, 2003.

- 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. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.4, p.316-320, 2005.
- MIGLIATO, K. F.; BABY A. R.; ZAGUE, V.; VELASCO, M. V. R.; CORRÊA, M. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; SALGADO, H. R. N. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Acta Farm. Bonaerense** v.25, n.2, p.310-304, 2006.
- MORALES, M. A.; LOZOYA, X. Calcium-antagonist effects of quercetin on aortic smooth-muscle. **Planta Med.**, v. 60, n. 4, p.313-317, 1994.
- MOREIRA, A. C. A.; PEREIRA, M. H. Q.; PORTO, M. R.; ROCHA, L. A. P.; NASCIMENTO, B. C.; ANDRADE, P. M. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Ci. Med. Biol.** v.8, n.2, p.153-161, 2009.
- MORI-OKAMOTO, J.; OTAWARA-HAMAMOTO, Y.; YAMATO, H.; YOSHIMURA, H. Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, n.1, p.93-101, 2004.
- MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S. C.; PAL, M.; SAHA, B. P. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plants extracts of a specific region of West Bengal, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v.60, n.1, p.85-89, 1998.
- MURTHY, C. K. N.; REDDY, V.; VEIGAS, J.; MURTHY, U. Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. **Journal of Medicinal Food**, v.7, n.2, p.256-259, 2004.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.38, n.4, p.401-413, 2002.
- NAABER, P.; LETHO, E.; SALMINEN, S.; MIKELSAAR, M. Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** , v.14, p.205-209, 1996.
- NAIR, R. & CHANDA, S. In-vitroantimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strain. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38, p.452-458, 2007.
- NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol.**, v.31, p.247-256, 2000.
- NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

NAVARRO, V.; VILLARREAL, M. L.; ROJAS, G.; LOZOYA, X. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p.143-147, 1996.

O'KENNEDY, R.; THORNES, R. D. **Coumarins**: biology, applications and mode of action. New York: John Wiley, 1997.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **Inter J Aromather**, v.15 p.147-52, 2005.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev Bras Farmacogn.**, v.16, p.510-516, 2006.

OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; FILHO, A. A. S.; MARTINS, C. H. G.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.381-384, 2007.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA-FILHO, R. N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. **Rev Bras Farmacogn** v.17, p.186-190. 2007a.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas Tóxicas**: conhecimento para a prevenção de acidentes. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2003. v.1, 64 p.

PALOMBO, E. A.; SEMPLE, S. J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **J Ethnopharmacol.**, v.77, p.151-157, 2001.

PEPATO, M. T.; FOLGADO, V. B. B.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia Jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.34, p.389-395, 2001.

PEPPER, T.; OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, v.42, p.98-106, 1988.

PEREIRA, A. F. F.; SILVA, T. C.; CALDANA, M. L.; MACHADO, M. A. A. M.; BUZALAF, M. A. R. Literature Review: Use of Xylitol for Prevention of Acute Otitis Media. **Intl. Arch. Otorhinolaryngol.**, v.13, n.1, p.87-92, 2009.

PRESTES, L. S.; OYARZABAL, M.; HARTWIG, C.; COIMBRA, H.; MOTA, F. V.; SCHUCH, L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. Atividade Antimicrobiana de Extratos de Folhas de Goiabeira,

Araçazeiro e Pitangueira. In: **CONBRAVET**, **35**, 2008, Gramado. Anais do 35° CONBRAVET, 2008.

PRINCE, P. S. M.; MENON, V. P.; PARI, L. Effect of *Syzygium cumini* extracts on hepatic hexokinase and glucose-6-phosphatase in experimental diabetes. **Phytotherapy Research**, v.11, n.7, p.529-531, 1998.

RAMIREZ, R. O.; ROA JUNIOR, C. C. The gastroprotective effect of tannins extracted from duhat (*Syzygium cumini* Skeels) bark on HCl/ethanol induced gastric mucosal injury in *Sprague-Dewley* rats. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v.29, p.253-261, 2003.

ROMERO, C. D.; CHOPIN, S. F.; BUCK, G.; MARTINEZ, E.; GARCIA, M.; BIXBY, L. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. **J Ethnopharmacol**, Texas, v.99, n.2, p.253-257, Jun, 2005.

SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAVJEE, S. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: Inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xilitol. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 23, p. 1382-1391, 2004.

SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; SCHIAVINI, M. S.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.3, p.429-436, 2005.

SATO, J. K.; GOTO, F.; NANJO, S.; KAWAI; MURATA, K. Antifungal activity of plant extracts against *Arthrrium sacchari* and *Chaetomium funicola*. **J. Biosci. Boeng.** v.90, p.442-446, 2000.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Flavonoids from *Calycorectes*, *Campomanesia*, *Eugenia* and *Hexachlamys* species. **Fitoterapia**, v.64, p.373-374, 1995.

SHARMA, S. B.; NASIR, A.; PRABHU, K. M.; MURTHY, P. S., DEV, G. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxaninduced diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v.85, p.201-206, 2003.

SIANI, C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica**. Rio de Janeiro, Scriptório: 2003.

SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. S. V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. Over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p.209-212, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002, 1374p.

SILVA, S. P. **Frutas no Brasil**. São Paulo: Nobel, 2001. p.117-118.

SILVA, S. S.; AFSHAR, A. S. Microbial production of xylitol from D-xylose using *Candida tropicalis*. **Bioprocess Engineering**, v.11, p.129-134, 1994.

SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, C. M.; LOURENÇO, M. C. S.; NEVES JUNIOR, I.; MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.2, p.143-148, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

SINGH, K. V.; SHUKLA, N. P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v.55, p.313-315, 1984.

SINTES, J. L.; BONETA, A. E.; STEWART, B.; VOLPE, A. R. Anticaries efficacy of a sodium monofluorophosphate dentifrice containing xylitol in a dicalcium phosphate dihydrate base. A 30 month caries clinical study in Costa Rica. **Am J Dent.**, v.15, p.215-219, 2002.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**. v.16, n.13-14, p.74-77, 2005.

SÖDERLING, E.; PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. Uptake and expulsion of ¹⁴C-xylitol by xylitol-cultured *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro*. **Scand J Dent Res**, v.97, p.511-519, 1989.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **JEthnopharmacol.** v.90, p.135-143, 2004.

SOUZA, M. P. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, 1991.

SRIDHAR, S. B.; SHEETAL, U. D., PAI, M. R. S. M.; SHASTRI, M. S. Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed powder in streptozotocindabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.3, p.463-468, 2005.

STERN, J. L.; HAGERMAN, A. E.; STEINBERG, P. D.; MASON, P. K. Phlorotannin-protein interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v.22, p.1887-1899, 1996.

TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; SAMMALKIVI, L.; HEIMO, I. I.; KOSKELA, M.; UHARI, M. Effect of Xylitol on Growth of *Streptococcus pneumoniae* in the Presence of Fructose and Sorbitol. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v.45, n.1, p.166-169, 2001.

TAPIAINEN, T.; RENKO, M.; KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; LUOTONEN, L. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**, v.109, n.E19, 2002.

TAPIAINEN, T.; SORMUNEN, R.; KAIJALAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; IKAHEIMO, I.; UHARI, M. Ultrastructure of *Streptococcus pneumonia* afeter exposure to xylitol. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.1, p.225-228, 2004.

TAVARES, W. **Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico**. São Paulo: Atheneu, 2006, 615p.

TEIXEIRA, C. C.; WEINERT, L. S.; BARBOSA, D. C.; RICKEN, C.; ESTEVES, J. F.; FUCHS, F. D. *Syzygium cumini* (L.) Skeels in the Treatment of Type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.27, n.12, p.3019-3020, 2004.

TERRAS, F. R. G.; SCHOOF, H. M. E.; THEVISSSEN, H. M. E.; BROEKAERT, W. F. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v.103, p.1311-1319, 1993.

THEODULOZ, C.; FRANCO, L.; FERRO, E.; SCHEMEDA-HIRSCHMANN, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of Paraguayan Myrtaceae. **J. Ethnopharmacol.**, v.24, p.179-183, 1988.

TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v.73, p.174-176, 2002.

TÔRRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Rev Bras Farmacogn.**, v.15, p.373-380, 2005.

TORSSEL, B. G. **Natural product chemistry**. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. New York: John Wiley, 1989. 401p.

TRAHAN, L.; BAREIL, M.; GAUTHIER, L.; VADEBONCOEUR, C. Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, v.19, p.53-63, 1985.

TUOMPO, H.; MEURMAN, J. H.; LOUNATMAA, K.; LINKOLA, J. Effect of xylitol and other carbon sources on the cell wall of *Streptococcus mutans*. **European Journal of Oral Sciences**, v.91, n.1, p.17-25, 2007.

USHIMARU, P. I.; SILVA, M. T. N.; DI STASI, L. C.; BARBOSA, L.; JUNIOR, A. F. Antibacterial activity of medicinal plant extracts. **Brasilian Journal of Microbiology**. v.38, p. 717-719, 2007.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev Bras Farmacogn.**, v.15, p.361-372, 2005.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite in plants. **Cur. Opinion in Biotech.**, v.13, p.181-187, 2002.

VERPOORTE, R.; VANDER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Res.**, v.9, p.323-343, 2000.

VIEIRA, O. M. C.; SANTOS M. H.; SILVA G. A.; SIQUEIRA A. M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de passarinho). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.15, n.2, p.149-154, 2005.

VIKRANT, V.; GROVER, J. K.; TENDON, N.; RATHI, S. S.; GUPTA, N. Tratament with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. **Journal of Ethnopharmacology**, p.76, p.139-143, 2001.

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

WERKMAN, C.; GRANATO, D. C.; KERBAUY, W. D.; SAMPAIO, F. C.; BRANDÃO, A. A. H.; RODE, S. M. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã), **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.10, n.3, p.104-111, 2008.

WEYERSTAHL, P.; MARSCHALL-WEYERSTAHL, H.; CHRISTIANSEN, C.; OGUNTINEIN, B. O.; ADEOYE, A. O. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. **Planta Med.** v.54, p.546-549, 1988.

WINKELHAUSEN, E.; KUSMANNOVA, S. Microbial conversion of D-Xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.1, p.1-14, 1998.

WOODMAN, O. L.; CHAN, E. C. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.**, v.31, n.11, p.786-790, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Global strategy for containment of antimicrobial resistance**. Geneva: WHO, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION **Regulatory situation of herbal medicines: a worldwide review**. Geneva: WHO, 1998.

ZABNER, J.; SEILER, M. P.; LAUNSPACH, J. L.; KARP, P. G.; KEARNEY, W. R.; LOOK, D.; SMITH, J. J.; WELSH, M. J. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **PNAS**, v.97, n.21, p.11614-11619, 2000.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. F abatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, v.149, p.59-64, 1997.

ANEXO A

Composição Química em g/L do Ágar Gyp

- Glicose Anidra (Labsynth, Diadema, SP, Brasil): 20 g
- Extrato de Levedura (Labsynth, Diadema, SP, Brasil): 5 g
- Extrato de Malte (HIMEDIA, Mumbai, India): 10 g
- Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (Nuclear, São Paulo, Brasil): 2 g

pH final a 25°C: $7,4 \pm 0,2$

Composição Química em g/L do Caldo BHI (HIMEDIA, Mumbai, India)

- Infusão de cérebro de bezerro: 200 g
- infusão de coração bovino: 250 g
- Protease peptona: 10 g
- Dextrose: 2 g
- Cloreto de sódio: 5 g
- Fosfato disódico: 2,5 g
- Agar: 15 g

pH final a 25°C: $7,4 \pm 0,2$

ANEXO B

Sugestões para Trabalhos Futuros

- Análise comparativa da atividade antibacteriana das diferentes partes anatômicas da espécie *Punica granatum*.
- Análise comparativa da atividade antibacteriana entre fármacos antimicrobianos e os extratos, associações dos extratos e associações dos extratos com o xilitol.
- Avaliação da atividade antimicrobiana das associações entre os extratos e entre os extratos e o xilitol sobre bactérias multiresistentes.
- Triagem fitoquímica por meio da avaliação antimicrobiana de extratos fracionados das plantas *E. uniiflora*, *P. guajava*, *P. granatum* e *S. cumini* obtidos com solventes de polaridades crescentes.

ANEXO C

Fluxograma dos Experimentos Realizados