UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da Atividade Antimicrobiana in vitro de Algumas espécies de Ipomoea.

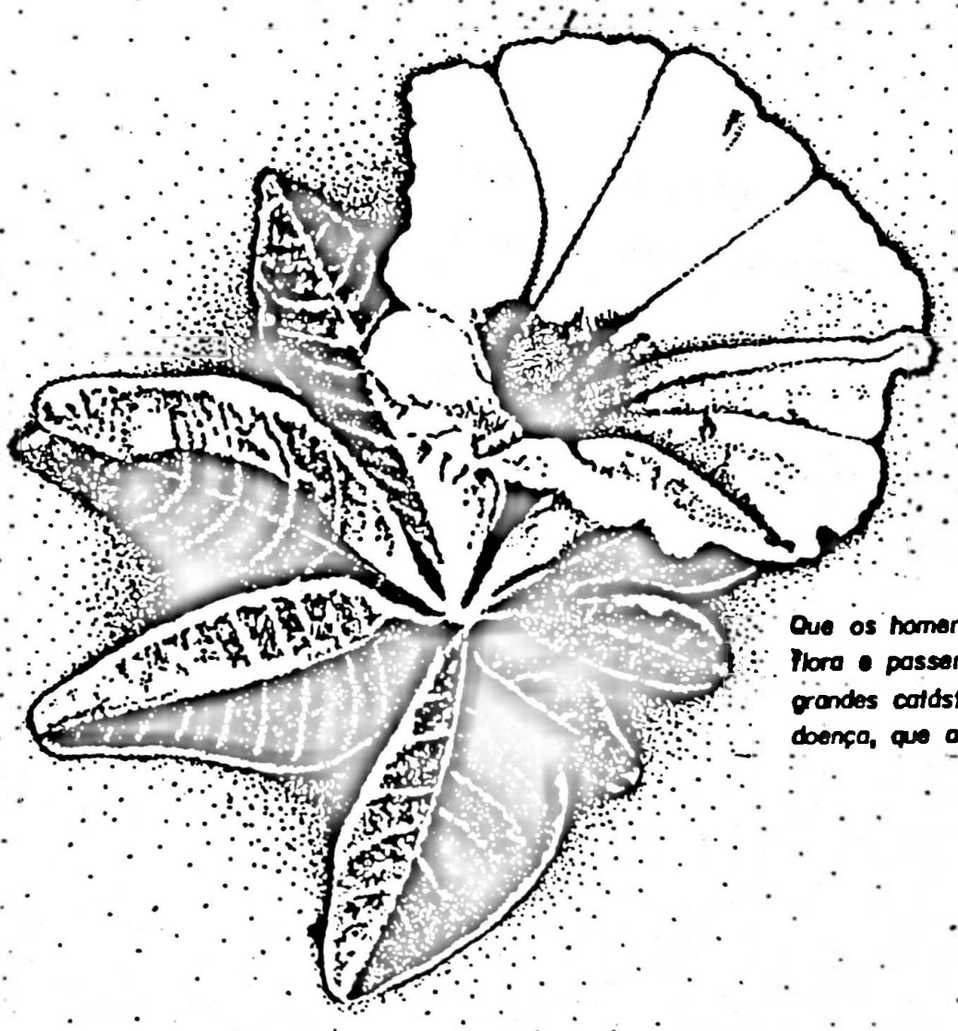
Dissertação de Mestrado Apresentada para Obtenção do Título de Mestre em Fármacos e Medicamentos, Área de Concentração Química e Biologia.

SOLANGE CRISTINA DA SILVA

Orientador: Silvio José Sarti

Ribeirão Preto

1992



Que os homens deixem de destruir a nossa flora e passem a utilizá-la para evitar as grandes catástrofes: a miséria, a fome e a doença, que afetam a humanidade.

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Damião e Mercês, pelo amor e carinho com que se dedicaram à minha educação e sempre me ensinaram os caminhos da honestidade, humildade, bondade e do amor, os grandes sentimentos que regem a vida dos seres humanos.

Aos meus Irmãos, Sônia, Roberto e Germana pelo estímulo, apoio e pelo amor que nos une.

Aos Pesquisadores Brasileiros, que apesar de todas as dificuldades encontradas e das árduas tarefas continuam lutando por um mundo melhor.

Ao Prof. Dr. Silvio José Sarti, pela orientação, pelos ensinamentos de Botânica, pela amizade e apoio, e que com muita paciência sempre me ajudou nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Prof^{a}. Dr^{a}. Izabel Yoko Ito pela colaboração, sugestões, apoio, pelo constante incentivo que sempre me ofereceu, e que apesar de toda sua ocupação esteve sempre disponível e disposta a dar-me atenção, esclarecendo minhas dúvidas durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. David dos Santos Filho por ter me aceito no Laboratório de Farmacognosia e tornado possível a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos pela colaboração, preciosas sugestões e dedicação que muito contribuírão para a realização deste trabalho e para a minha formação como pesquisadora.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos e atenção que me dedicaram.

À Sonia Aparecida Fazio de Souza e Silva, responsável pelo trabalho datilográfico, pela amizade, carinho e pela atenção que sempre me dedicou.

Aos funcionários Jorge Eduardo de Abreu, Walter Lopes, Ruth Rothschild Gonçalves e Irene Bortolotti Donaires, do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela cooperação, dedicação, amizade, carinho e acolhimento que sempre me ofereceram.

A Vânia, Regina, Natalia, Flor, Cida, Tita, Toninha e Georgius, por estarem sempre dispostos a ajudar e pelo carinho com que me receberam no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À Elisabete Aparecida Turcato Milani e Márcio Aparecido Siena da Seção de Pós-Graduação pela atenção e carinho com que me dedicaram durante este período.

Aos funcionários Diógenes Lopes Guimarães, Izabel Cristina Casanova e Ieda Maria Razaboni Prado pelos espectros fornecidos.

À Virgínia, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, pela obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

À Terezinha Aparecida Rissato e Garcia pela elaboração dos fluxogramas.

As funcionárias Vânia A. Bonani e Aparecida C. de O. Freitas da Biblioteca Central do Campus de Ribeirão Preto pela colaboração bibliográfica deste trabalho.

À Profª Lelis Mariza de Castro Sarti pela revisão do português e pelas suas sugestões.

Aos amigos Adriana, Isabel, Luiz, Márcia, Vera e José Carlos, que em busca dos nossos objetivos nos aproximamos e criamos laços de amizade, partilhando os momentos alegres e tristes vividos durante este período de nossas vidas.

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Acoet - acetato de etila

AE - acetato de etila

AQ - Água

ATCC - American Type Culture Collection

CAC - Cromatografia de Adsorção em Coluna

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CCF - Cromatografia em Coluna Filtrante

$CDCl_3$ - clorofórmio deuterado

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMSO - dimetil-sulfóxido

E - etanol

EM - Espectro de Massa

EtOH - etanol

H - hexano

Hex - hexano

HoAc - ácido acético

is-proH - isopropanol

MHz - Megahertz

NCTC - National Collection of Type Cultures

NCIB - National Collection of Industrial Bacterial

PF - ponto de fusão

RMN ^{+}H - Ressonância Magnética Nuclear protônica

RMN ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

TMS - tetrametilsilano

UFC - Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1.0. INTRODUÇÃO..... 01

1.1. Plantas Antinfecciosas.. 04

1.2. Estudo Botânico do Gênero Ipomoea 10

1.2.1. O Gênero Ipomoea..... 10

1.2.2. Chave para a Determinação das Espécies..... 12

1.2.3. Descrição de Ipomoea cairica..... 15

1.2.4. Sinonímia Vulgar..... 18

1.2.5. Distribuição Geográfica..... 18

2.0. RETROSPECTO DA LITERATURA..... 19

3.0. PROPOSIÇÃO..... 112

4.0. MATERIAL E MÉTODOS..... 114

4.1. Aparelhagem e Materiais Utilizados..... 115

4.1.1. Estufa..... 115

4.1.2. Moinho..... 115

4.1.3. Percolador..... 115

4.1.4. Evaporadores Rotatórios..... 115

4.1.5. Liofilizador..... 116

4.1.6. Placas Cromatográficas, Adsorventes e Reveladores..... 116

4.1.7. Colunas Cromatográficas e Adsorventes..... 118

4.1.8. Espectrofotômetro de Infravermelho..... 119

4.1.9. Espectrofotômetro de Utravioleta..... 119

4.1.10. Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear..... 120

4.1.11. Espectrômetro de Massa..... 120

4.1.12. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 121

4.2. Obtenção dos Produtos Naturais..... 122

4.2.1. Coleta e Identificação dos Vegetais..... 122

4.2.2. Secagem e Moagem dos Vegetais Coletados... 122

4.2.3. Obtenção dos Extratos Brutos..... 122

4.2.3.1. Percolação..... 123

4.2.3.2. Maceração..... 123

4.2.4. Obtenção do Extrato Acetatoetílico de I. cairica..... 123

4.2.5. Partição do Extrato Acetatoetílico de Ipomoea cairica..... 124

4.2.6. Fracionamento da Fração Clorofórmica..... 124

4.2.7. Fracionamento da Fração Diclorometânica por Cromatografia de Adsorção em coluna... 125

4.2.8. Obtenção das Substâncias SP-1 e SP-2 da da Fração 5..... 127

4.2.9. Purificação da Substância SP-2 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.. 130

4.3. Determinação da Atividade Antimicrobiana in vitro 131

4.3.1. Microrganismos Indicadores..... 131

4.3.2. Meios de Cultura..... 133

4.3.2.1. Para Manutenção dos Microrganismos..... 133

4.3.2.2. Para o Preparo dos Inóculos Bacterianos e Fúngicos..... 134

4.3.2.3. Para Avaliação da Atividade Antimicrobiana 136

4.3.3. Preparo das Suspensões Bacterianas para Inóculo 137

4.3.4. Avaliação da Atividade pelo Método de Difusão em Ágar (disco - placa)..... 137

4.3.5. Avaliação da Atividade pelo Método de Difusão em Ágar (cavidade - placa)..... 138

4.3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... 141

5.0. RESULTADOS..... 143

6.0. DISCUSSÃO..... 170

7.0. CONCLUSÃO..... 181

8.0. RESUMO..... 183

9.0. SUMMARY..... 187

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 190

I. INTRODUÇÃO

O uso das plantas no tratamento de diversas enfermidades é conhecido desde a mais remota antiguidade, mesmo antes de se conhecerem suas causas.

Investigações científicas demonstram que, entre os anos 5.000 e 2.800 AC, o homem já amansava e domesticava animais, cultivava cereais e algumas plantas medicinais e descobria signos capazes de perpetuar seus pensamentos e conhecimentos.

Assim, as mais antigas obras sobre medicina e plantas medicinais surgiram na China e no Egito. No livro Pen T'sao-Ching (2.700 AC) e nos Papiros (1.500 AC), bem como na Bíblia, escrita pelos hebreus, encontram-se milhares de citações sobre o emprego de plantas medicinais e preparações à base de produtos do reino vegetal. Teofasto (225 AC) e Dioscórides (20 DC), que por mais de 1.500 anos influenciaram a Farmácia, foram autores de vários e valiosos volumes sobre plantas medicinais. Entretanto, durante a Idade Média, entre os séculos XIV e XV DC, o progresso da ciência empírica foi mínimo, mas graças às escolas árabes, antigos textos foram preservados e os seus conteúdos passados para o ocidente (CASTRO, 1981; SCHER, 1991).

No Brasil, o conhecimento indígena do uso das plantas com propriedades medicinais foi transmitido aos portugueses e escravos africanos quando estes aqui chegaram.

Importantes são as informações de Gabriel Soares de Souza no seu "Tratado Descritivo do Brasil" em 1587 e do Padre João Daniel no seu "Tesouro Descoberto no Rio Amazonas" de 1757-1776 que descrevem os recursos naturais encontrados em terras brasileiras. Outros aspectos mais pormenorizados sobre estes recursos são tratados por Guilherme Piso em "História Natural e Médica da Índia Ocidental" de 1658. Em 1844, Martius publicou "Natureza, Doenças, Medicina e Remédios dos Índios Brasileiros" e Joaquim Monteiro Caminhoá escreveu, em 1877, "Elementos de Botânica Geral e Médica". Pela sua importância como obras de consulta, não se pode deixar de citar a "História das Plantas Medicinais e Utéis do Brasil" de Theodoro Peckolt e Gustavo Peckolt (1888), as "Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais" de F.C. Hoehne de 1939, e o "Dicionário de Plantas Utéis do Brasil e das Exóticas Cultivadas" de M. Pio Corrêa, cujo 6º e último volume só apareceu em 1975, embora iniciado em 1926 (PEREIRA, 1984).

Assim, é possível verificar que as plantas e seus produtos são utilizados mundialmente como meio de prevenir ou curar doenças. Nosso país não foge a regra e a utilização das plantas é amplamente difundida, principalmente entre a população de baixo poder aquisitivo como fonte alternativa para solucionar seus problemas de saúde.

A partir da década de 30, acentuou-se o processo de síntese de substâncias anteriormente extraídas da natureza e a planta medicinal perdeu sua importância.

No entanto, ultimamente têm aparecido sinais inequívocos de que a fitoterapia está voltando e vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo das propriedades antimicrobianas de vegetais superiores, utilizados na medicina popular.

1.1. PLANTAS ANTINFECCIOSAS

As doenças infecciosas de origem bacteriana, fúngica e virótica têm sido tratadas com plantas medicinais e preparações a partir delas, ao longo da história da humanidade, muito antes de se conceituarem e identificarem os agentes etiológicos. Assim, através dos tempos, dentre as várias plantas utilizadas por suas propriedades antimicrobianas são citadas: alho, ginseng, bálsamo, mirra, sanguinária, cravo e acácia, entre outras.

O sucesso deste uso e o fato de que muitos antibióticos de origem microbiana e sintética são de ação limitada, apresentam efeitos colaterais graves e levam à seleção de cepas resistentes, originaram grande interesse na busca de agentes antimicrobianos em plantas superiores utilizadas na medicina popular (RIZVI et al., 1987).

Várias plantas e produtos naturais com atividade antimicrobiana são utilizadas na Odontologia sob a forma de enxaguatórios orais, géis e dentifrícios como agentes anti-sépticos e/ou anti-placa. Recentemente, HORIBA et

al.(1991) demonstraram a ação antibacteriana de chás de ervas japonesas contra bactérias anaeróbias responsáveis pela infecção de canais radiculares e concluíram que essas plantas podem ser utilizadas para o tratamento de tais infecções. Da mesma forma, a comprovação científica do uso da sanguinária e/ou sanguinarina, acácia, glicirrizina e própolis, como agentes anti-placa e contra gengivites, foi apresentada por WALKER (1990); GAZI (1991); GOULTSCHIN et al. (1991) e GRANGE & DAVEY (1990), respectivamente.

Esta atividade antimicrobiana é atribuída a substâncias produzidas pelas plantas. Entre as principais substâncias ativas, encontram-se aquelas pertencentes a diferentes classes de estruturas químicas, tais como: alcalóides, flavonóides, ácidos fenólicos, saponinas e terpenos (VERPOORTE et al., 1982; MITSCHER et al., 1985; MARHUENDA & GARCIA, 1985; JAWAD et al., 1988a).

Dentre os vegetais com atividade antimicrobiana, destacam-se aqueles pertencentes à família Convolvulaceae A.L. Jussiae de ampla distribuição geográfica nas regiões tropicais e temperadas, sendo representada por mais de 50 gêneros e 1.500 espécies, dos quais o gênero Ipomoea, com cerca de 400 espécies, é o mais representativo (CRONQUIST,1981).

Em nosso meio, em especial na região norte e nordeste, as Convolvuláceas e principalmente as do gênero Ipomoea sempre tiveram importantes aplicações na medicina popular (AGRA, 1980), como ilustado na Tabela 1.

TABELA 1 - Algumas espécies de Ipomoea e seus empregos na terapêutica popular.

ESPÉCIE	NOME VERNACULAR	PARTE USADA	USO POPULAR
Ipomoea alba (L.)	Boa noite Mensageira da tarde	Planta inteira	Antiofídica
Ipomoea arborescens	Glória da manhã	Caule	Antiofídica
Ipomoea asarifolia (Desr.) Roem et Sch.	Salsa Batatarana	Folhas	Dermatoses
Ipomoea coccinea (L.)	Primavera Jitirana	Raízes, sementes e folhas	Anti-reumática Dermatoses
Ipomoea digitata (L.)	Glória da manhã	Raízes	Tônica e Afrodisíaca
Ipomoea fistulosa Mart ex Choisy	Canudo de pito Algodão bravo	Folhas	Purgativa e Laxativa
Ipomoea pes-caprae (L.)	Salsa da praia	Raízes	Diurética, Emenagoga e Depurativa
Ipomoea quamoclit (L. et Wildenow)	Flor de Cardeal Primavera	Folhas e Sementes	Antiofídica, Anti-reumática, Pneumonia e Escrófula
Ipomoea stolonifera (Cyr.) Gmelin	Salsa branca Cipó da praia	Raízes e Sementes	Diurética, Emenagoga e Desobstruentes
Ipomoea violacea (L.)	Glória da manhã	Sementes	Alucinógena

Apesar das suas propriedades medicinais, algumas espécies de Ipomoea são consideradas tóxicas. Isto se deve à presença nas folhas e ramos novos, do princípio ativo tóxico, "orizabina" ou "jalapina". Por outro lado, suas sementes também encerram outras substâncias tóxicas. Tais fatos explicariam o envenenamento de bovinos, caprinos e ovinos ocorrido em habitats onde florescem estas espécies vegetais (DÖBEREINER et al.,1960; HOEHNE, 1939; TOKARNIA et al., 1960).

Além dos princípios ativos descritos acima, em algumas espécies do gênero Ipomoea foi evidenciada a presença de antocianinas aciladas, alcalóides do grupo indol (especialmente de ergolina), atropínicos e isoquinoleínico, glicosídeos cianogênicos, cumarinas, ácido caféico, compostos saponíferos e taníferos (CRONQUIST,1981). Destas substâncias, as mais estudadas são os alcalóides do grupo indol, especialmente os alcalóides de ergolina devido às suas propriedades alucinógenas (STANESCU et al., 1973; JIRAWONGSE et al.,1977).

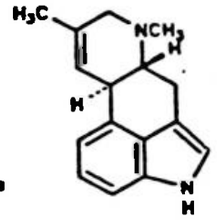
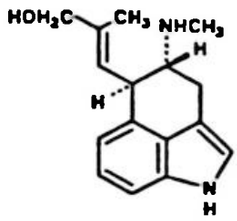
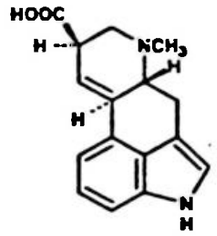
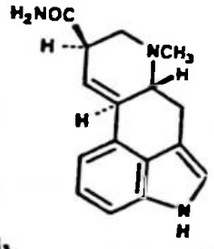
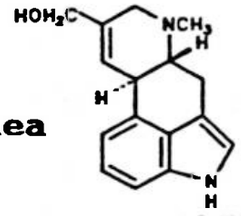
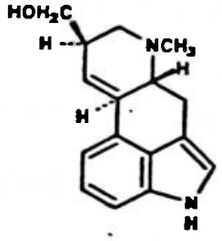
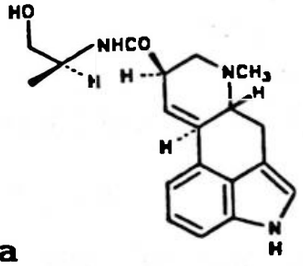
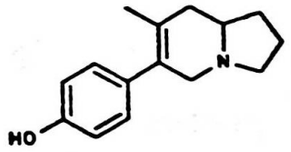
O conhecimento dessas propriedades é bastante antigo uma vez que as sementes de Ipomoea violacea L. (Badoh negro) e de Rivea corymbosa L. Hallier "Ololiuqui", também da família Convolvulaceae, são utilizadas por índios mexicanos em cerimônias religiosas. Assim, em 1651 o espanhol Francisco Hernandez escreveu que "os astecas comiam as sementes de "ololiuqui" para se comunicarem com seus deuses", por acreditarem que essa planta possuía um ingrediente mágico, além de a empregarem como unguento (SCHULTES, 1969, 1973).

Em 1960, Hofmann, investigando a ação alucinógena de sementes de Ipomoea, demonstrou que os constituintes psicomiméticos isolados eram idênticos ou relacionados com os alcalóides do ergot, demonstrando a presença do ácido lisérgico e da clavina em Ipomoea violacea (WITTERS, 1975).

A partir dessas descobertas, vários pesquisadores isolaram alcalóides de ergolina em outras espécies de Ipomoea: elymoclavina, chanoclavina, lysergol, agroclavina, ergosinina, isoergina (LSD) e ergina (Tabela 2), assim como outros tipos de substâncias (GRÖEGER, 1963; TABER et al., 1963; Der MARDEROSIAN et al., 1964; ABOU-CHAAR, 1967; NIWAGUCHI & INOUE, 1969; SMOLENSKI er al., 1972; BANERJEE & BHATNAGAR, 1974; IYER et al., 1974; WILKINSON et al., 1987).

O isolamento dessas substâncias nas espécies de Ipomoea foi de considerável importância, pois esses compostos somente eram encontrados em um limitado número de fungos do gênero Claviceps sp.

TABELA 2 - Alcalóides encontrados em algumas espécies de Ipomoea.

Ipomoea argyrophylla	
Ipomoea leptophylla	
Ipomoea rubro-caerulea	
Ipomoea tricolor	
Ipomoea violaceae	
Ipomoea rubro-caerulea	
Ipomoea rubro-caerulea	
Ipomoea violaceae	
Ipomoea coccinea	
Ipomoea rubro-caerulea	
Ipomoea violaceae	
Ipomoea violaceae	
Ipomoea sp	
Ipomoea alba	
Ipomoea muricata	

1.2. ESTUDO BOTÂNICO DO GÊNERO Ipomoea

1.2.1. O gênero Ipomoea

Posição sistemática segundo o sistema de classificação de Cronquist (1968).

Divisão	-	Angiospermae
Classe	-	Magnoliopsida
Sub-Classe	-	Asteridae
Ordem	-	Tubiflorae
Família	-	Convolvulaceae
Gênero	-	Ipomoea

Ipomoea L. Sp.Pl.159.1973, Gen.Pl.Ed.5.76, 1754.

Pro syn: Quamoclit Moench., Meth.Bot. 453, 1754;
Batatas Choisy,Mem.Soc.Phys.Geneve 6:434,1834;
Pharbitis Choisy.Mem.Soc.Phys.Geneve 6:438,1834;
Calonyction Choisy,Mem.Soc.Phys.Geneve 6:441,1834;
Exogonium Choisy,Mem.Soc.Phys.Geneve 6:443, 1834.

Árvores, arbustos ou trepadeiras volúveis, prostadas, flutuantes ou erectas. Folhas inteiras, lobadas, raramente compostas, glabras ou pilosas. Inflorescência axilar, solitária, em cimeira, dicásio ou panícula; sépalas subiguais, ovais, elípticas, oblongas ou lanceoladas, glabras ou pubescentes; corola infudibuliforme, hipocrateriforme ou tubular, azul, lilás,

purpúrea, rósea, vermelha, amarela ou branca, interplicas bem definidas; estames inclusos ou raramente excertos, filetes filiformes, dilatados ou não, com pilosidade na base e anteras retas; ovário glabro ou piloso, 2-4 locular, estigma 2 globoso, raramente 3. Fruto capsular globoso ou ovóide. Sementes 4-6 ou menos, glabras, pubescentes ou com longo indumento lanoso.

1.2.2. Chave para a Determinação das Espécies (FALCÃO & FALCÃO, 1978).

A. FOLHAS OVAIS

1. Corola estreita, longa (além de 50,0mm de comprimento), alba ou rósea.....Ipomoea alba

2. Inteiras, margens onduladas; cimeira com 2-5 flores .....Ipomoea batatoides

3. Inteiras ou grossamente dentadas, ápice agudo, base cordada; sépalas corniculadas; corola purpúrea..... .....Ipomoea coccinea

4. Ápice bastante acuminado; arbusto de 3,0m de altura; cimeiras multiflorais; corola rósea..... .....Ipomoea fistulosa

5. Inteiras, com 1-3 dentes; corola alva ou rósea com o tubo interior purpúreo.....Ipomoea trifida

6. Levemente acuminadas, pilosas em ambas as faces; cimeiras com 1-3 flores de coloração sanguínea..... .....Ipomoea tubata

B. FOLHAS CORDADAS

1. Trilobadas; sépalas vilosas; corola azul-celeste..... .....Ipomoea acuminata

2. Cimeira com muitas flores róseas.....
.....Ipomoea bahiensis

3. Pilosas, inflorescência em cimeira (umbeliforme), com muitas flores róseas.....Ipomoea seriophyla

4. Ápice emarginado, bilobado, flores roxas.....
.....Ipomoea pes-caprae

5. Face dorsal das folhas novas com coloração arroxeada, inflorescência em cimeira com muitas flores roxa-clara.....Ipomoea phyllomega

C. FOLHAS TRILOBADAS

1. Apresentando pêlos setáceos nos ramos parecendo acúleos e corola lilás.....Ipomoea horrida

2. Corola purpúrea.....Ipomoea pickeli

D. FOLHAS OVAL-AGUDAS

1. Toda planta envolta por um tomento alvo; face dorsal bastante esbranquiçada; flores alvas com tubo interior róseo.....Ipomoea subencana

E. FOLHAS OVALADAS

1. Pedúnculos alongados dicotônicos; corola amarela.....
.....Ipomoea marcellia

F. FOLHAS PINATISSÉCTAS

1. Com 9-19 pares de segmentos alternos ou opostos, lineares; corola sanguínea.....Ipomoea quamoclit

2. Segmentos lanceolados; corola lilás.....
.....Ipomoea sobrevoluta

H. FOLHAS PALMATRIPARTIDAS

1. Segmentos inteiros; corola lilás.....Ipomoea cairica

I. FOLHAS ORBICULARES

1. Base cordada, ápice obtuso, às vezes levemente emarginado; flores róseas.....Ipomoea asarifolia

2. Base obtusa, ápice emarginado; corola alva com tubo interior amarelo.....Ipomoea stolonifera

1.2.3. Descrição de Ipomoea cairica (FALCÃO & FALCÃO, 1978; KINOSHITA-GOUVEA & MACIAS,1985)

Ipomoea cairica (Figura 1)

Pro Syn: Ipomoea cairica (L.) Sweet (Hort.Brit. 287. 1827)

Convolvulus cairicus L. Systs.ed. 10:922.1759

Ipomoea palmata Forks Fl.Aegypt.Arab.43.1775

Colvolvulus tuberculatus Desr. in Lam. Ency.Méth.3:545. 1789

Ipomoea pentaphylla Cav.Ic.Descri.PL.3:39.1797

Ipomoea stipulacea Jacq.Hort.Sch.Syst.Veg.4:208.1819

Ipomoea cavanillesii R. et Sch.Syst.Veg. 4:214.1819

Colvolvulus limphaticus Vell.Fl.Flu.2:70, 1825

Ipomoea rosea Choisy var pluripartita Hassler,Fl.Pilcom. 98.1909

Ipomoea cairica (L.) Sweet var. uniflora (Meissn.) Hoehne,Anec. Mem.Inst.Butantan 1:77.1922

É uma planta anual trepadeira. Apresenta plântula com hipocótilo cilíndrico, glabro e a sua cor arroxeada se deve à forte pigmentação de antocianinas. Folhas cotiledonares bilobadas, verdes, glabras, com 4 nervuras principais, distribuídas 2 para cada lobo; lobos lanceolados, de ápice arredondado, ligados apenas pela porção basal; pecíolo longo, glabro, achatado e superiormente canaliculado. Epicótilo cilíndrico, verde, glabro. Folhas definitivas longo-pecioladas, 5-lobado-palmadas, verde escuras e glabras na face superior e

verde claras na inferior, com nervuras proeminentes e com pêlos simples, curtos e alvo-translúcidos, bordas esparsamente ciliadas por pêlos simples e alvo-translúcidos; lobos laterais largo--lanceolados e o central elítico, maior que os demais.

Inflorescência axilar, pedunculada, com 2 a 5 flores de cálice verde, corola purpurescente e membranáceas; estames 5, com anteras rimosas, ovário súpero, 4-valvar. Fruto capsular.

Semente globosa, com 4, 4-4, 8,0mm de comprimento por 4,9 - 5,1mm de largura. Testa dura, lisa, fosca de coloração castanho enegrecida, apresentando longos pêlos simples e alvo-translúcido por toda a margem da região dorsal. Rafe formando um leve sulco na face dorsal. Hilo basal arredondado de coloração vermelha.

Reproduz-se exclusivamente por sementes, com ciclo de aproximadamente 120 dias.

FIGURA 1 - Flor e ramos de *Ipomoea cairica*

1.2.4. Sinonímia Vulgar (LORENZI, 1982)

- campainha
- corda-de-viola
- carriola

1.2.5. Distribuição Geográfica

O vegetal ocorre indistintamente em todas as regiões do Estado de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pernambuco, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (FALCÃO & FALCÃO, 1978), como ilustrado na figura abaixo.

II. RETROSPECTO DA LITERATURA

Neste retrospecto da literatura, sobre métodos de avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de vegetais superiores, apresentamos alguns trabalhos realizados nas duas últimas décadas.

MITSCHER et al. (1972) avaliaram a atividade antimicrobiana de plantas da flora de Ohio (Columbus, USA), com o objetivo de isolar as substâncias responsáveis pela ação. Assim, 500,0g do pó da planta foram colocados em um percolador e extraídos com 5,0Lts de etanol a 95,0% até completa exaustão. O percolato, assim obtido, foi concentrado sob pressão reduzida à temperatura de 40°C e o resíduo armazenado a 4°C até o uso. Utilizaram como indicadores as seguintes cepas padrão ATCC: Staphylococcus aureus (13709), Escherichia coli (9637), Salmonella gallinarum (9184), Klebsiella pneumoniae (10031), Mycobacterium smegmatis (607) e Candida albicans (10231). Os microrganismos foram mantidos em Ágar Tripticase soja (TSA), semeados em caldo Tripticase soja (TSB) e incubados por 24 horas. Para o Mycobacterium smegmatis, o tempo de incubação foi de 48 horas. No momento do teste, as culturas foram diluídas a 1:100 com solução salina estéril. Os extratos vegetais na concentração de 1.000,0ug/ml foram obtidos utilizando 10,0mg do extrato dissolvido ou suspenso em 2,0ml dos seguintes solventes: água, álcool, acetona ou dimetil--sulfóxido (DMSO), os quais não apresentaram inibição das culturas na concentração de 2,0%. A seguir, 10,0ml de TSA eram vertidos assepticamente nas placas de Petri, contendo as

amostras. Após solidificação do meio de cultura, os microrganismos foram semeados em estria radial sobre a superfície do ágar, e incubadas a 37°C por 24 e 48 horas. As substâncias foram consideradas ativas quando ocorria a inibição completa do crescimento microbiano. Foram isoladas e avaliadas 57 substâncias e apenas 3 foram ativas contra a maioria dos microrganismos indicadores testados. Entretanto, nenhuma delas foi ativa contra a Escherichia coli. Também demonstraram que os alcalóides berberina e bisbenzilisoquinolina, esteroidal e indólico apresentaram fraca atividade.

AL-SHAMMA & MITSCHER (1978) pesquisaram alcalóides e testaram a atividade antibacteriana e antifúngica de 334 extratos alcoólicos obtidos de 327 espécies de plantas do Iraque pertencentes a 221 gêneros de 49 famílias. Os vegetais secos e reduzidos a pó foram submetidos à extração com etanol a 80,0%, à temperatura ambiente, e o solvente removido sob pressão reduzida aquém de 40°C. Determinaram a atividade antimicrobiana pelo método da diluição em ágar nas concentrações de 1.000,0ug/ml e 100,0ug/ml utilizando como microrganismos indicadores as cepas padrão ATCC: Staphylococcus aureus (13709), Escherichia coli (9337), Klebsiella pneumoniae (10031), Mycobacterium smegmatis (607B) e Candida albicans (10231). Os resultados foram registrados por meio de sinais: -, sem ação; ± , ação parcial e +, inibição completa. A pesquisa preliminar para a verificação da presença de alcalóides foi realizada com os

extratos brutos obtidos com HCl a 5,0%; o filtrado obtido foi testado com reagente de Mayer. A outra porção foi alcalinizada com amônia, extraída com clorofórmio e testada em papel de filtro borrifando-o com reagente de Dragendorff. Observaram que 28,4% das plantas apresentaram atividade antimicrobiana, e em 44,6% foi assinalada para a presença de alcalóides. Dos 334 extratos testados, 93 mostraram atividade antimicrobiana na concentração de 1.000,0ug/ml contra pelo menos um dos indicadores. Das espécies vegetais estudadas, 5 plantas (Silene coniflora Otth., Lotus gebelia Vent., Allium dilutum Staph., Linaria kurdica Boiss et Hoh e Peganum harmala L.) apresentaram atividade na concentração de 100,0ug/ml. Setenta e três extratos foram ativos contra somente um microrganismo; dezesseis contra dois microrganismos; e quatro demonstraram um largo espectro de atividade. As espécies Aleuropus lagopoides (L.) Trin, Tamarix macro-carpa (Ehrenb) Bge, foram ativas contra Staphylococcus aureus, Mycobacterium smegmatis e Candida albicans. O extrato de Ammannia baccifera L. apresentou atividade contra Staphylococcus aureus, Salmonella gallinarum, Mycobacterium smegmatis e Candida albicans, enquanto que o extrato de Peganum harmala L. foi ativo contra todos os microrganismos testados. Das 3 espécies do gênero Convolvulus da família Convolvulaceae avaliadas, apenas Colvolvulus stachydifolius Choisy apresentou atividade contra Salmonella gallinarum na concentração de 1.000,0ug/ml (extrato da parte aérea). Observaram que Mycobacterium smegmatis foi o microrganismo mais sensível, inibido pela maioria

dos extratos vegetais, seguido por Candida albicans. Porém, Escherichia coli e Klebsiella pneumoniae foram raramente inibidas. Por outro lado, verificaram que 146 espécies pertencentes a 109 gêneros de 32 famílias apresentaram análises positivas para alcalóides pelos reagentes Mayer e Dragendorff.

KHAN et al. (1980) investigaram a atividade antimicrobiana in vitro de 134 extratos de plantas colhidas na região costeira da Tanzânia pertencentes a 41 famílias e utilizadas pela medicina popular. Assim, 500,0g de cascas, folhas, raízes, caules, cascas da raiz, sementes e frutos foram submetidos a extração contínua em Soxhlet durante 10 horas e concentrados. Efetuaram a triagem microbiológica pelo método de difusão em ágar pela técnica do disco, com emprego do meio Ágar Teste Diagnóstico de Sensibilidade (DST). Utilizaram como microrganismos indicadores: Stahpylococcus aureus (Oxford) e Escherichia coli (055), como representantes das bactérias Gram-positivas e Gram--negativas, respectivamente. Atribuíram escores em cruzes (- a ++++) para denotar a atividade antimicrobiana, dependendo do diâmetro da zona de inibição. Extratos de 59 espécies apresentaram atividade contra Staphylococcus aureus (++++) e 11 contra Escherichia coli (++). Concluíram que Acacia robusta e Harrisonia abyssinica foram os vegetais que apresentaram maior atividade antibacteriana.

KUBO et al. (1980) avaliaram a atividade antimicrobiana e "anti-pasto" de Plumbago capensis (Plumbaginaceae), coletada no campus da Universidade de Nairobi-África. Pulverizaram as raízes secas, e 1.000,0g do pó, assim obtido, foram submetidos à extração com metanol-água a 60,0% por 7 dias à temperatura ambiente. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método da diluição em ágar contra as cepas: Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis, Mucor mucedo, Rhizopus chinensis, Sclerotia libertiana, Aspergillus oryzae, Aspergillus niger e Penicillum cristosum. Determinaram a atividade "anti-pasto" na 3ª fase larval dos insetos africanos Spodoptera exempta e Spodoptera littoralis pelo método disco-folha de Zea mays e Ricinus communis, plantas alimentícias para os insetos. Os discos de 10,0mm de diâmetro das folhas destes vegetais, obtidos com furador de rolhas, foram imersos por 2 segundos nos extratos acetônicos das amostras e secos à temperatura ambiente. Colocaram 5 discos testes e 5 discos controles (metanol-água) em placas de Petri contendo 10 larvas na 3ª fase e, após 2 dias, mensuraram a área remanescente do disco. Verificaram que Saccharomyces cerevisiae e Candida utilis foram completamente inibidos pela plumbagina na concentração de 12,5ug/ml a qual também exibiu potente atividade anti-pasto contra Spodoptera exempla (10ppm) e Spodoptera litoralis (20ppm). Observaram também que o extrato de Plumbago campensis e a plumbagina

apresentaram atividade contra os fungos em forma de levedura: Saccharomyces cerevisiae e Candida albicans, os quais foram totalmente inibidos na concentração de 12,5ug/ml. No entanto, foram fracamente ativas contra o fungo fitopatogênico Sclerotia libertiana.

ROSS et al. (1980) avaliaram a atividade antimicrobiana de 40 óleos essenciais obtidos por arraste a vapor de vegetais frescos, coletados na região de Assuit - Egito, assim como de 32 constituintes essenciais cedidos pela International Flavor & Fragances de New York (EUA). Utilizaram como indicadores as cepas: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Aspergillus aegypticus, Penicillium cyclopium e Trichoderma viride. Empregaram o método de difusão em ágar pela técnica do disco em Ágar nutriente Tween (TNA) e Ágar dextrose batata Tween (TPDA). Observaram que a maioria dos óleos essenciais testados inibiram o crescimento de fungos, enquanto a atividade antimicrobiana era parcial. As bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas. Quanto aos constituintes dos óleos essenciais, notaram que os alcoóis alifáticos apresentaram maior atividade antimicrobiana, enquanto que para os cíclicos ou sesquiterpênicos essa ação era limitada. Os fenóis (timol, carvarol e eugenol) exibiram significante atividade contra os fungos e as bactérias Escherichia coli e Bacillus cereus.

ANDARY et al. (1981) avaliaram a atividade antifúngica do ácido caféico, clorogênico, rosmarínico, verbascosídeo e orobancosídeo contra fungos de ocorrência em alimentos. Os ácidos caféico e clorogênico foram obtidos da Indústria Fluka (Suiça). O ácido rosmarínico foi obtido por cristalização (Pf 178-180°C) a partir de Melissa officinalis L. e verbacosídeo e orobancosídeo também por cristalização a partir de Orobanche rapum -genistae Thuill. Utilizaram como indicadores da ação 25 cepas de fungos responsáveis pela contaminação de alimentos, provenientes da Micoteca do Museu de História Natural de Paris - França. Determinaram a atividade antifúngica pelo método da concentração inibitória mínima (CIM) em meio sólido (Ágar nutriente). Após a semeadura, as placas foram incubadas à temperatura ambiente (20°C ± 2°C) por 10 dias. Constataram que as cepas de Mucor mucedo e Zygorhynchus moelleri foram as mais sensíveis para as substâncias testadas e que a CIM do ácido caféico e verbascosídeo foi de 0,4mg/ml contra Mucor mucedo. Observaram também, que Syncephalastaun racemosun, Cunninghamella elegans e Rhizopus nigricans foram capazes de utilizar as substâncias em estudo como nutrientes e que para Cunninghamella elegans e Rhizopus nigricans o ácido quínico e o ácido caféico apresentaram uma CIM de 10,0 e 2,0mg/ml, respectivamente. Quanto a Syncephalastaun racemosun, notaram que o verbacosídeo estimulava o crescimento somente em doses baixas e que o orobancosídeo diminuía o crescimento das espécies de Fusarium avenaceum, Rhizopus nigricans, Penicillium lilacinum. Entre os fungos pertecentes ao

grupo Adelomyces, as espécies mais sensíveis foram Verticillium albo-atrum e Fusarium avenaceum, enquanto que Alternaria tenuis apresentou resistência para os derivados do ácido caféico e do ácido rosmarínico. Do grupo Endomycetales, observaram que Schizosaccharomyces octosporus foi a espécie mais sensível aos derivados caféicos e Saccharomyces cerevisiae a mais resistente enquanto que Aspergillaces apresentaram resistência somente contra as moléculas polifenólicas. Determinaram a CIM do ácido rosmarínico e orobancosídeo (4,0mg/ml) contra Aspergillus niger e Aspergillus oryzae. Verificaram que Penicillium rubrum não foi sensível aos derivados caféicos, assim como o Aspergillus flavus não foi sensível ao ácido rosmarínico. Constataram, ainda, que o ácido caféico foi eficaz antifúngico contra os representantes dos Pyrenomycetes. Finalmente, determinaram que as substâncias mais ativas foram o ácido rosmarínico e orobancosídeo e, o ácido rosmarínico, na concentração de 10,0mg/ml inibiu o desenvolvimento de 96,0% dos fungos, enquanto que a sua CIM foi de 4,0mg/ml para 76,0% das cepas sensíveis e que, contra os Aspergillaces, o ácido caféico foi mais ativo que o ácido rosmarínico e orobancosídeo, corroborando com a hipótese que a atividade antifúngica é devida ao ácido dihidroxifenilacético. Concluíram que algumas das substâncias testadas foram capazes de inibir o desenvolvimento dos fungos, enquanto que para outros, essas mesmas substâncias podem favorecer o seu desenvolvimento, ou seja, atuando como fatores de crescimento. Assim, o

desenvolvimento de Syncephalastrum recemosum foi favorecido pelos ácidos caféicos, clorogênico e verbascosídeo, enquanto que, o ácido clorogênico estimulou o desenvolvimento de Cunninghamella elegans e Rhizopus nigricans.

BARBAGALLO et al. (1981) verificaram a atividade antimicrobiana in vitro dos diferentes extratos de Astragalus siculus Biv. utilizada na medicina popular italiana como diurético para a dissolução de cálculos renais e biliares. Coletaram a planta à cerca de 1.800m da vertente sul meridional do Etna-Itália. O material, lavado e seco à sombra, foi finamente triturado e mantido seco com pentóxido de fósforo (P_2O_5) até o momento do uso. Desse modo, 10,0g do material foram submetidos à extração por 48 horas com 100,0ml de álcool etílico a 95,0%, álcool butílico, éter etílico, éter de petróleo (60 - 80°C) e acetona. Realizaram também extrações específicas para proteínas, lipídios e saponinas. Avaliaram a atividade antimicrobiana contra 6 cepas de bactérias Gram-negativas: Escherichia coli (2 cepas), Klebsiella pneumoniae (2 cepas), Pseudomonas aeruginosa e Serratia marcescens e 4 cepas de Staphylococcus aureus (Gram--positivas) do Instituto de Microbiologia da Universidade de Messina. As frações foram avaliadas pelo método do cilindro com 20,0ml de Ágar tripticase soja (TSA) a 45°C adicionado de 0,2ml de uma cultura de 18 horas em caldo tripticase soja (TSB) diluída para obter inóculo de cerca de 10^8 cels./ml. Distribuíram os cilindros de porcelana na superfície do meio sólido e

adicionaram os extratos dissolvidos em solução hidroalcoólica (1:10). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e as zonas de inibição mensuradas. Nenhum dos extratos demonstrou atividade contra as 6 bactérias Gram-negativas mas, verificaram que as 4 cepas de Staphylococcus aureus foram inibidas pelos extratos etanólicos, butílico, cetônico e éter etílico; sendo o butílico aquele que apresentou maior atividade, seguido do extrato etílico. Por sua vez, os extratos hidroalcoólicos e o obtido com éter de petróleo não demonstraram atividade antimicrobiana. No tocante às frações protéicas e lipídicas neutras não verificaram nenhuma atividade, porém a fração lipídica total, fosfolipídica e saponínica demonstraram atividade contra as cepas de Staphylococcus aureus sendo esta última a mais ativa.

GUTKIND et al. (1981) avaliaram a atividade antimicrobiana de 46 extratos de plantas pertencentes a 15 famílias, a maioria utilizadas na medicina folclórica da Argentina. As plantas foram coletadas em diferentes regiões da Argentina e Paraguai. Separadamente, maceraram 3,0g de plantas inteiras (folhas, casca de raiz e caule, raiz, partes aéreas, flores e caule), com 30,0ml de etanol a 50,0% durante 24 horas. Em seguida, os extratos foram aquecidos por 10 minutos a 50°C, filtrados e concentrados sob pressão reduzida a 40°C, obtendo-se assim o extrato etanólico seco. Para o teste antimicrobiano utilizaram as cepas padrão ATCC: Bacillus subtilis 6633, Micrococcus luteus 9341,

Staphylococcus aureus 6538-P e Escherichia coli 11105, assim como, de cepas de diferentes origens: Pseudomonas aeruginosa, Aspergillus niger, Candida albicans e Mucor mucedo. Utilizaram, como inóculo, culturas microbianas obtidas após 20 horas de incubação sob agitação rotatória em meio líquido "Antibiotic medium" nº3 (Difco) pH 7,0. As suspensões bacterianas, na concentração de 0,1%, foram então inoculadas a 20,0ml do meio constituído de 10,0ml de meio "Antibiotic medium" nº1 (pH 6,6 Difco) e de 10,0ml de "Antibiotic medium" nº11 (pH 8,0 Difco) mantido a 45°C em banho maria, homogeneizado e vertido em placas de Petri estéreis de 60,0mm de diâmetro. Após a solidificação do meio de cultura, cilindros estéreis, contendo 0,15ml dos extratos, foram distribuídos na superfície do ágar e as placas incubadas a 37°C por 48 horas. Em relação aos fungos filamentosos utilizaram, como inóculo, esporos de Mucor mucedo e Aspergillus niger na concentração de 10^6 cels/ml e blastósporos de Candida albicans obtidos após a semeadura em meio Sabouraud-glicose. Depois de homogeneizadas, seguindo o mesmo procedimento descrito para bactérias, as suspensões foram vertidas em placas de Petri e incubadas a 28°C. Expressaram a inibição como: completa inibição de crescimento microbiano ao redor do cilindro sem efetuar a medida do diâmetro da zona de inibição. Das 45 plantas testadas, apenas 16 apresentaram significante atividade contra os microrganismos utilizados, sendo que as bactérias Gram-positivas foram as mais sensíveis. Verificaram que 4 plantas foram ativas contra Escherichia coli e que nenhum extrato foi ativo contra

Pseudomonas aeruginosa. Concluíram que Prosopis ruscifolia e Usnea campestris foram as espécies mais promissoras. A Prosopis ruscifolia foi ativa contra todas as bactérias Gram-positivas testadas enquanto que contra os Gram-negativos, foi ativa unicamente contra a Escherichia coli. Essa espécie foi também capaz de inibir, em pH 8,0, o crescimento de fungos em forma de levedura e eumicetos (fungos verdadeiros).

MAHMOUD (1981) testou a atividade antimicrobiana de frutos de Maclura pomifera (Raf.) Schneider (Moraceae) árvore indígena dos Estados Unidos. Desse modo, 5,0Kg do pó dos frutos foram extraídos com etanol a 95,0% até exaustão e o percolato concentrado sob pressão reduzida (40°C). Deste extrato, obteve e avaliou a atividade antimicrobiana de frações e substâncias puras, usando a técnica da diluição em ágar, contra as seguintes cepas padrão ATCC: Staphylococcus aureus (13709), Escherichia coli (9637), Salmonella gallinarum (9184), Klebsiella pneumoniae (10031) e Mycobacterium smegmatis (607). Em relação às substâncias puras, considerou como a concentração inibitória mínima (CIM-ug/ml) aquela que resultou na completa supressão de crescimento microbiano após 24 ou 48 horas. Quanto aos extratos, observou que tanto o etanólico do fruto quanto o resíduo clorofórmico foram ativos contra Staphylococcus aureus e Mycobacterium smegmatis na concentração de 1.000,0ug/ml. No entanto, o extrato obtido com clorofórmio-éter de petróleo foi ativo na concentração de 100,0ug/ml para Staphylococcus aureus e

na concentração de 1.000,0ug/ml para Mycobacterium smegmatis. Quanto às frações, nenhuma foi tão potente quanto àquelas ricas em pokiferina e em osajina, ativas contra Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae (25,0ug/ml) e Mycobacterium smegmatis (6,25ug/ml). Em relação à pomifirina (12,5ug/ml), verificou que esta foi mais ativa contra Escherichia coli do que a osajina (25,0ug/ml), porém contra Salmonella gallinarum aosajina foi mais ativa do que a pomifirina (25,0ug/ml).

NAMBA et al. (1981) investigaram a atividade de extratos de plantas utilizadas na medicina tradicional da China e do Japão. Os vegetais obtidos de Dõng xìn màoyì gõngsí (Hong Kong), Nam--seeng (Daegu, Coréia), Won-chang (Jinzu, Coréia) e da Companhia Tochimoto Tenkaido (Osaka, Japão), foram pulverizados, pesados e 5,0g de cada planta extraídas. Como indicadores, cedidos pela Universidade de Osaka-Japão, usaram cepas pertencentes a diferentes espécies sorológicas: Streptococcus mutans E49 (Sorotipo a), Streptococcus mutans BHT (Sorotipo b), Streptococcus mutans MT 5091 (Sorotipo c), Streptococcus mutans OMZ 176 (Sorotipo d), Streptococcus mutans MT 703 R (Sorotipo e), Streptococcus mutans MT 557 (Sorotipo f) e Streptococcus mutans 6715 (Sorotipo g). Na avaliação da atividade, empregaram o método de difusão em ágar (disco-placa) com 40,0ml de Ágar infusão cérebro e coração (BHI) semeada em superfície com 0,6ml da cultura em caldo BHI (turbidez da suspensão: DO 0,07). Após a aplicação dos discos de papel (8,0mm de diâmetro e 1,6mm

de espessura) contendo várias concentrações de extratos brutos, incubaram as placas a 37°C por 15-18 horas. A atividade antibacteriana foi também avaliada na presença de sacarose, ou seja, cultivando as cepas em caldo BHI com 5,0% de sacarose como inóculo e semeado em ágar BHI também com 5,0% de sacarose. Consideraram ativos os extratos que apresentaram zona de inibição maior que 9,0mm. No teste de triagem efetuado com duas cepas de Streptococcus mutans sorotipo c (MT 509) e sorotipo d (OMZ 176), notaram que dos extratos avaliados, 23 (grupo 1) apresentaram atividade antibacteriana contra as duas cepas, outros 21 extratos (grupo 2) apresentaram atividade somente contra a cepa do sorotipo d (OMZ 176). Os extratos das 16 plantas restantes não apresentaram nenhuma atividade contra as cepas. Dos 23 extratos do grupo 1, o extrato metanólico de Magnolia officinalis (Rehd et Wils) foi ativo com zona de inibição de 18,5mm de diâmetro contra a cepa MT 509 e de 15,8mm contra OMZ 176 seguido por Coptis japonica (Makino) com 16,5mm e 17,5mm contra as duas cepas, respectivamente. Quanto aos extratos do grupo 2, ativos somente contra sorotipo d (OMZ 176), o mais ativo foi obtido a partir de Nadina domestica (Thumb) com 18,5mm seguido por Citrus unshiu (Mark) com 17,8mm de diâmetro (extrato metanólico). Demonstraram a elevada atividade antibacteriana dos extratos metanólicos e etéreos de Magnoliae cortices e Magnoliae radicus cortex comercial contra todos os sorotipos de Streptococcus mutans, e a ausência de ação do extrato derivado de Machilus thumbergii proveniente da Coréia. Todos os extratos aquosos não

apresentaram atividade antibacteriana, sugerindo que o princípio ativo era pouco solúvel em água. Por outro lado, notaram que, na presença de sacarose a 5,0%, o diâmetro da zona de inibição diminuiu consideravelmente em virtude da proteção da célula pelo glucano sintetizado pela enzima glicosiltransferase.

Na mesma linha de pesquisa, NAMBA et al. (1982) estudaram a ação antibacteriana de Magnolia cortex e Coptis rhizoma adquiridas em Osaka, Japão, contra as bactérias cariogênicas, estreptococos do grupo mutans. Assim, 5,0g do extrato bruto foi extraído com 100,0ml de metanol a 50,0% em água, sob refluxo, durante 3 horas. O extrato quente foi imediatamente filtrado, resfriado à temperatura ambiente e centrifugado a 10.000rpm, durante 10 minutos. Depois de concentrado, a vácuo a temperatura 40°C, o sobrenadante foi liofilizado. Após a semeadura uniforme de 0,6ml da suspensão bacteriana em placas com Ágar BHI, foram aplicados sobre o meio, 6 discos de papel de filtro, contendo respectivamente: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,2mg de extrato bruto e o controle. As placas foram então incubadas a 37°C por 15 - 16 horas. Determinaram a CIM, dissolvendo 1,0mg das substâncias isoladas magnolol e honokiol em uma quantidade mínima de metanol ou água. Adicionaram 0,1ml desta solução a 4,9ml de meio BHI, contendo 10^6cels/ml de Streptococcus mutans e incubaram os tubos a 37°C por 48 horas. Determinaram o tempo requerido para a ação bactericida inoculando 0,1ml de uma cultura prévia de Streptococcus mutans MT5091 ou OMZ 176 a 4,9ml de BHI contendo

magnolol ou hinokiol (70,0ug/ml). A intervalos regulares, 0,1ml da suspensão bacteriana era transferido para 5,0ml do meio de cultura BHI e, após incubação a 25°C por 48 horas, o crescimento bacteriano era verificado turbidimetricamente a 550nm. A concentração inibitória mínima do magnolol e honokiol foi determinada pelo método da diluição em série, com 4,0ml de tampão fosfato (0,05M pH 6,8) contendo, as seguintes concentrações: 0,25; 50,0; 75,0; 100,0; 125,0; 150,0; 175,0 e 200,0ug/ml inoculadas com uma suspensão de $4X10^8$ células de Streptococcus mutans. Realizaram o teste de aderência com células tratadas a quente e investigaram o efeito do magnolol ou honokiol sobre a síntese de glucanos. O extrato de Magnolia cortex demonstrou uma potente ação antibacteriana contra todos os sorotipos de Streptococcus mutans, comparável ao extrato de Coptidis rhizoma, uma típica droga antibacteriana. O extrato aquoso de Magnolia cortex foi menos ativo do que os extratos etéreos e metanólicos. Tanto o magnolol, quanto o honokiol demonstraram elevada atividade antiestreptocócica contra todos os sorotipos testados. Verificaram que o diâmetro da zona de inibição era uma função linear do logaritmo da concentração em peso das substâncias aplicadas aos discos. Quanto à CIM, verificaram que inibiram completamente o crescimento de Streptococcus mutans MT 5091 e OMZ 176 na concentração de 6,3ug/ml, porém com a adição de 5,0% de sacarose ao meio de cultura, observaram o aumento da concentração antibacteriana para 13,0ug/ml. As culturas de Streptococcus

mutans MT 5091 e OMZ 176 foram quase que totalmente inibidas quando expostas por 2 minutos às soluções de magnolol ou honokiol e, após 5 minutos de exposição frente às concentrações de 50,0 e 75,0ug/ml, ocorreu a esterilização de ambas as culturas. Observaram ainda que o honokiol e magnolol não interferiram na atividade enzimática da glicosiltransferase responsável pela síntese do polissacáride extracelular (glucano), o qual capacita os estreptococos do grupo mutans a aderirem e a se acumularem sobre as superfícies dos dentes. Concluíram que magnolol e honokiol podem ser usados como anti-sépticos bucais na redução de bactérias formadoras de placa dental, embora não sirvam como agentes inibidores da aderência à superfície lisa dos dentes.

AL-MESHAL et al. (1982) realizaram a triagem fitoquímica e biológica de 41 plantas usadas na medicina popular da Arábia Saudita. Estes vegetais foram coletados em várias regiões daquele país, em diferentes épocas; secas à sombra e reduzidas a pó. Assim, 50,0g de cada planta foram extraídos em aparelho de Soxhlet com éter de petróleo (40 - 60°C), clorofórmio e metanol. Os solventes foram eliminados por destilação sob pressão reduzida e os extratos, assim obtidos, cromatografados em sílica gel G (Merck, tipo 60), utilizando sistemas de solventes de diferentes polaridades. As cromatoplacas foram quimicamente analisadas e as manchas, dos diferentes grupos presentes, identificadas por meio de reações específicas.

Avaliaram a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar e determinaram a CIM dos extratos ativos. Utilizaram como microrganismos indicadores cepas padrão de NCTC: Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa e cepas locais de Salmonella sp e Candida albicans. Para a determinação da CIM, dissolveram os extratos em dimetil-sulfóxido (DMSO) a uma concentração de 20,0mg/ml. A seguir, 2.000,0; 1.000,0; 500,0 e 250,0ug/ml, destas soluções, foram trasferidos para frascos contendo caldo nutriente adicionado de glicose a 1,0%. Como controle, utilizaram um frasco com o meio acima descrito sem a adição dos extratos. Cada um dos frascos foi então inoculado com uma gota padronizada, proveniente das culturas de 18 horas de cada um dos microrganismos indicadores e incubados a 37°C por uma noite. Os constituintes mais comuns encontrados foram triterpenos, esteróides, cumarinas, alcalóides, taninos e bases voláteis. Os flavonóides foram detectados em mais de 60,0% das espécies examinadas; saponinas e óleos voláteis em 40,0% e antraquinonas e glicosídeos cardíacos em quase 25,0% das espécies. Observaram que 6 plantas eram desprovidas de atividade antimicrobiana, porém, 13 espécies apresentaram amplo espectro de atividade. Os extratos de 8 plantas apresentaram ação contra as bactérias Gram-positivas e 3 contra as Gram-negativas e 11 com atividade intermediária. Dentre os 13 extratos com largo espectro de atividade, observaram que Escherichia coli foi o menos sensível (2,0mg/ml), enquanto que Staphylococcus aureus foi o mais

sensível (0,25mg/ml). Notaram também que outros 2 extratos apresentaram alta atividade contra Pseudomonas aeruginosa (0,5mg/ml) e Candida albicans (0,25mg/ml), respectivamente.

LAURENS et al. (1982) avaliaram a atividade dos extratos obtidos de Anacardium occidentale L., planta utilizada na medicina tradicional como agente antidiarréico. As cascas e as folhas desse vegetal foram coletadas na Ilha de Cabo Verde, África. As cascas foram esgotadas com álcool e depois com éter de petróleo em aparelho de Soxhlet, e os extratos obtidos, concentrados sob pressão reduzida. As folhas foram maceradas com água e a solução extratora liofilizada. Determinaram o espectro de atividade dos extratos frente a diferentes microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. A partir de uma cultura de 18 horas em caldo, o inóculo na concentração de 1:1000 era semeado na superfície de meio sólido Ágar Müller-Hinton. Após a secagem das placas, aplicaram cilindros de aço sobre a superfície do meio e neles adicionaram 0,1ml dos extratos em solução tampão fosfato pH 7,0. As placas foram então incubadas durante 18 horas a 37°C. Determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica das diluições em meio sólido. Uma gota padrão com 10^5 bactérias/ml, proveniente de uma cultura de 18 horas, foi depositada em pontos sobre a superfície do Ágar Müller-Hinton, contendo concentrações crescentes do extrato (0,1; 1,0 e 10,0mg/ml). Concentrações maiores não foram utilizadas devido à presença de taninos nos extratos que impediam a solidificação do

meio de cultura. O extrato das cascas foi ativo contra todos os microrganismos testados, principalmente sobre Staphylococcus aureus. O extrato das folhas também apresentou ação antimicrobiana, porém em concentrações maiores do que o das cascas. Staphylococcus aureus e Sarcina lutea foram mais sensíveis do que as demais espécies, com CIM de 3,3mg/ml para as cascas e de 77,0mg/ml para as folhas. O tanino, isolado das folhas, apresentou uma CIM de 1,0mg/ml contra esses dois microrganismos, enquanto que para Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens e Salmonella typhi as CIMs foram maiores. Observaram que a ação inibitória se manifestava de maneira comparável à ação de anti-sépticos. Sugeriram que o efeito antidiarréico era devido à presença de taninos, mais por sua ação adstringente sobre as mucosas intestinais do que pela ação antibacteriana. Salientaram, porém, que os taninos ao se fixarem às proteínas das mucosas, acumulam-se na luz intestinal, exercendo assim, ação antidiarréica concomitante: adstringente e antibacteriana.

LORENTI et al. (1982) avaliaram a atividade antimicrobiana de algumas espécies de plantas utilizadas na Argentina: plantas inteiras das espécies Gomphrena martiana Moquim (Amaranthaceae) coletadas em Guemes (Província de Salta) e Nierembergia hippomanica Miers (Solanaceae) coletadas em Chacharramendi (Província dos Pampas); partes aéreas de Wedelia buphthalmiflora Lorentz (Compositae) obtidas em Padre Buodo (Ultracan, Província

dos Pampas) e folhas de Bauhinia candicans Benth (Leguminosae) coletadas em Buenos Aires. As plantas foram secas, trituradas e extraídas, em aparelho de Soxhlet, com éter de petróleo (60 - 80°C) e etanol. O resíduo de Nierembergia hippomanica foi extraído também com água quente. O extrato etanólico de Gomphrena martiana foi subseqüentemente lavado com clorofórmio e n-butanol. Cada um dos extratos e frações foi diluído com dimetil--sulfóxido a fim de se obter concentrações finais de 4.000,0; 2.000,0; 1.000,0; 500,0; 250,0 e 125,0ug/ml no meio de cultura. Determinaram a CIM dos extratos contra as cepas padrão de ATCC: Staphylococcus aureus (12600), Streptococcus faecalis (19433), Escherichia coli (23226), Mycobacterium phlei (11758) e cepas locais de Salmonella newport, Salmonella oranienburg, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans e Aspergillus niger. As bactérias foram mantidas em Ágar tripticase soja, repicadas em caldo tripticase soja por 18 horas e finalmente diluídas 1:2000 em solução salina, com exceção de Mycobacterium phlei que foi diluída para 1:100. Semearam os microrganismos indicadores sobre a superfície do ágar com diferentes concentrações dos extratos vegetais e incubaram as placas a 37°C por 24 horas. Culturas de 48 horas mantidas em Ágar Sabouraud para Candida albicans e Ágar dextrose batata para Saccharomyces cerevisiae e Aspergillus niger foram utilizadas para preparar as suspensões finais em solução salina, contendo Tween 80 (0,025%). Assim os tubos contendo 5,0ml de meio semi-sólido foram adicionados com as diferentes diluições dos extratos e inoculados com 0,05ml da suspensão dos

fungos filamentosos e das leveduras e incubadas a 30°C até o crescimento positivo do tubo controle. Observaram que nenhum dos extratos testados apresentou atividade contra as bactérias Gram-negativas. O extrato etanólico de Gomphrena martiana foi ativo à concentração de 250,0ug/ml contra Mycobacterium phlei, Saccharomyces cerevisiae e Candida albicans, enquanto que o extrato etéreo apresentou atividade contra o Staphylococcus aureus (500,0ug/ml) e Mycobacterium phlei (250,0ug/ml). O extrato de Bauhinia candicans, obtido com éter de petróleo, foi ativo contra Mycobacterium phlei (500,0ug/ml) e Aspergillus niger (250,0ug/ml). Notaram que o extrato etéreo de Nierembergia hippomanica não apresentou atividade contra os microrganismos Gram-negativos, porém foi ativo contra os fungos, bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) e Staphylococcus aureus, ação semelhante ao do extrato etanólico que só não foi ativo contra Staphylococcus aureus. Verificaram que o extrato aquoso a quente não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana. Quanto à Wedelia buphtalmiflora, o extrato etanólico mostrou atividade, em concentração elevada, contra os BAAR e fungos e nenhuma atividade contra as bactérias Gram-negativas. Em relação ao extrato etéreo e ao etanólico de Gomhrena martiana, verificaram que os mesmos foram ativos contra os dois Gram-positivos testados: Staphylococcus aureus e Streptococcus faecalis. Inferiram que a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de Gomhrena martiana era devido à presença de betaina e a atividade do extrato etéreo devido ao flavonóide - aglicona.

VERPOORTE et al. (1982) reportaram a atividade antimicrobiana de 52 plantas utilizadas no Suriname para o tratamento de diferentes infecções tais como: diarréias, furunculose, conjuntivites, feridas infeccionadas, faringites, etc. As plantas, coletadas entre dezembro de 1979 a janeiro de 1980, nos arredores de Paramaribo, após secagem e pulverização, foram extraídas, em percolador com etanol a 95,0% (na proporção de 10,0ml de etanol para cada grama da planta). Os extratos etanólicos, assim obtidos, foram concentrados sob pressão reduzida à temperatura de 40°C e dos resíduos obtidos preparam 4 diluições com água destilada nas concentrações de 50,0; 25,0; 12,5 e 5,0mg/ml. Avaliaram a atividade antimicrobiana, utilizando como organismos indicadores cepas padrão de ATCC: Bacillus subtilis (6633), Staphylococcus aureus (6538), Pseudomonas aeruginosa (9027), Escherichia coli (8739), Aspergillus niger (16904) e Candida albicans (10235). As bactérias e a levedura Candida albicans foram semeadas em caldo tripticase soja (TSB) - Merck e incubadas respectivamente a 37°C e 27°C por 48 horas. As culturas de Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli foram diluídas com solução salina (1:1.000), para obter uma suspensão de 10^8 cels./ml, sendo que 0,1ml dessa suspensão foi semeada sobre a superfície de 15,0ml de Ágar Tripticase soja (TSA) em placas de 100,0mm de diâmetro. As suspensões de Candida albicans e Aspergillus niger em solução salina contendo 10^8 cels./ml, foram semeadas sobre Ágar extrato de malte (MB). A

seguir, foram confeccionados 4 poços em cada placa, aos quais adicionaram 0,1ml das soluções testes. A leitura foi realizada após a incubação a 37°C por 24 horas (bactérias) e a 27°C por 3 - 4 dias (fungos filamentosos e leveduras). Das 52 plantas testadas, 32 mostraram atividade contra Bacillus subtilis e 28 contra Staphylococcus aureus, e algumas espécies mostraram atividade em concentrações mais baixas. Por outro lado, nenhum dos extratos demonstrou atividade contra as bactérias Gram--negativas e fungos. Os extratos mais ativos foram aqueles obtidos das espécies de Aspidospermas, provavelmente devido à presença de alcalóides.

CHESNE et al. (1983) relizaram um estudo comparativo dos métodos de isolamento de uma substância antifúngica de Polygala vulgaris L. Para tal finalidade utilizaram três solventes: etanol, metanol e água-metanol (30:70) em 30 extrações consecutivas e avaliaram a atividade antifúngica do primeiro, décimo e trigésimo extrato. Avaliaram a atividade antifúngica pelo método da inibição do crescimento miceliano de Ceratocystis ulmi à distância de acordo com a técnica descrita por CHESNE et al. (1984). Observaram que o trigésimo extrato metanólico era isento de atividade antifúngica, ao contrário dos outros extratos obtidos com outros solventes (etanol e água/metanol). Assim, escolheram o metanol para a extração do princípio ativo. Utilizaram 960,0g das partes aéreas de Polygala vulgaris que foram extraídos com 9.600,0ml de metanol que, após a evaporação,

proporcionou a obtenção de 107,0g de resíduo. Esse resíduo foi extraído com butanol e a fração metanólica foi lavada com éter etílico. Constataram que a porção etérea era ativa e, por isso mesmo, foi submetida a cromatografia em sílica e os cromatogramas revelados, quimicamente, fisicamente e biologicamente. Verificaram que a atividade antifúngica estava presente na fração com Rf 0,4 na qual evidenciaram a presença de saponinas.

COSAR et al. (1983) na Turquia, avaliaram a atividade antimicrobiana das espécies: Berberis crataegina DC., Berberis cretica L., Berberis vulgaris L., Epimedium pubigerum Morr. e Leontice leontopetalum L., pertencentes à família Berberidaceae. As plantas secas foram extraídas por maceração com etanol a 95,0% e o solvente removido a vácuo à temperatura aquém de 40°C. De cada extrato foram prepararadas duas diluições 1.000,0 e 100,0ug/ml, as quais foram testadas sobre 37 cepas de microrganismos indicadores, isolados a partir de diferentes materiais clínicos. Os inóculos bacterianos foram obtidos pela semeadura das cepas em caldo por 24 horas a 37°C. Para o preparo dos inóculos fúngicos utilizaram o caldo Sabouraud e incubados a 26°C por 48horas. Depois de diluídas a 1:100 as suspensões microbianas foram semeadas respectivamente, em placas de Ágar Teste Diagnóstico de Sensibilidade (DST) e Ágar Sabouraud. Entre os extratos testados, somente aqueles, preparados a partir das partes subterrâneas das espécies de Berberis, mostraram atividade

contra as espécies de estafilococos. Essa atividade foi atribuída principalmente à presença de berberina. Nenhuma atividade foi observada nas partes aéreas onde não havia alcalóides. Por outro lado, os alcalóides, assim como os extratos, não demonstraram atividade contra as bactérias Gram-negativas. Os extratos obtidos das partes aéreas e subterrâneas de Leontice leotopetalum e aqueles obtidos a partir das partes subterrâneas de Bongardia chysogonum foram ativos apenas contra 7, entre os 20 fungos testados. Nos testes de atividade, utilizando as substâncias puras, observaram que alcalóides do tipo berberina e três flavonóides foram ativos contra alguns fungos. No entanto, os extratos de bulbos de Bongardia e Leontice foram ativos contra Saccharomyces logos, Candida lipolytica e Trichosporon pullulans os quais não foram sensíveis aos flavonóides isolados de Bongardia e Leontice.

FAROUK et al. (1983) efetuaram a determinação da atividade antimicrobiana de 76 extratos, obtidos a partir de 31 plantas, utilizadas popularmente para diferentes finalidades. Os vegetais foram coletados na Província de Nilo Branco - Sudão, no mês de novembro. Como microrganismos indicadores utilizaram as seguintes cepas padrão de NCTC: Stahylococcus aureus 6447, Bacillus subtilis 8236, Escherichia coli 8196 e Pseudomonas aeruginosa 6750. Cerca de 10,0g da planta, depois de grosseiramente pulverizada, foram extraídos sucessivamente com clorofórmio e metanol, durante 24 horas, usando o extrator de

Soxhlet. Os extratos foram evaporados separadamente a vácuo e cada resíduo foi dissolvido ou ressuspenso em 10,0ml do mesmo solvente extrator, e armazenados em refrigerador até o momento do uso. Utilizaram a técnica de difusão em ágar de camada dupla pelo método de GROVE & RANDALL (1955) modificado, ou seja, utilizando 15,0ml de Ágar nutriente (Oxoid) para formação da camada base em placas de 95,0mm de diâmetro. O inóculo, na concentração de cerca de 1,0 x 10^8 cels./ml, depois de vigorosamente agitado, era adicionado ao Ágar nutriente à cerca de 45°C. Após a homogeneização, era distribuído em volumes de 10,0ml sobre a camada base solidificada para formação da camada seed. Após a solidificação, confeccionaram 5 poços de 8,0mm de diâmetro com um furador de rolha estéril. Volumes de 0,2ml de cada extrato, na concentração de 1,0g/ml, foram adicionados a cada um dos poços e mantidos à temperatura ambiente por 2 horas para a pré-difusão. As placas foram então incubadas a 37°C durante 18 horas e o diâmetro dos halos de inibição medidos em milímetros. Dos 76 extratos testados, 64 (84%) exibiram efeito inibitório contra pelo menos um dos microrganismos utilizados. Dentre estes, 7 apresentaram significante inibição.

CHESNE et al. (1984) avaliaram a atividade antimicrobiana de 49 plantas indígenas coletadas nos arredores de Rennes - França, contra 10 grupos de fungos fitopatogênicos. Os órgãos vegetais foram lavados, secos, cortados, moídos e a seguir, 100,0g, extraídos com 800,0ml de etanol a 95,0% sob refluxo. Os extratos

foram filtrados e lavados com etanol a 95,0% e o solvente, evaporado sob pressão reduzida. O resíduo obtido foi solubilizado em água destilada em quantidade suficiente para 1,0ml, correspondendo a 1,0g da planta fresca. Avaliaram a atividade antifúngica contra 11 cepas de fungos fitopatogênicos do Laboratório de Patologia Vegetal de INRA de Rennes. Utilizaram placas de Petri com 9,0mm de diâmetro, contendo 15,0ml de meio de cultura e inoculados com blocos de 3,0mm, aplicados no centro da placa e incubados por 2 a 4 dias até atingir o crescimento de cerca de 30,0mm de diâmetro. Foram então feitos 4 poços com 4,0mm de diâmetro à cerca de 10,0mm da borda do crescimento e os orifícios preenchidos com 0,1ml dos extratos. As placas eram examinadas diariamente durante 2 a 3 dias, quando era efetuada a medida da zona de inibição, sendo considerados positivos quando estes eram superiores a 2,0mm. Das 49 plantas testadas, apenas 11 apresentaram atividade antifúngica. Hedera helix L., Solanum dulcamera L. e Polygala vulgaris L. foram ativas contra uma ou mais de uma espécie fúngica testada. Destes vegetais, a Polygala vulgaris foi ativa contra 7 fungos, e a sua ação foi devida não somente à presença de saponosídeos como também à de outros princípios ativos. Corylus avellana L. (avelã) foi a mais ativa, apresentando um largo espectro de atividade antifúngica, ou seja, atuando contra 9 fungos fitopatogênicos. Segundo os autores, essa ação poderia ser devida à elevada acidez dos extratos (pH 3,0 - 4,0) em virtude da presença de ácidos fenólicos.

GUÉRIN & RÉVEILLÉRE (1984) determinaram a atividade antifúngica de 41 extratos aquosos e hidroalcoólicos, obtidos do Laboratório de Vermin (Tiltrox) Nantes - França, de plantas utilizadas com finalidade terapêutica, contra as seguintes espécies de fungos: Saccharomyces pastorianus, Candida albicans, Rhizopus nigricans, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Botrytis cinerva, Penicillium digitatum, Fusarium oxys, Fusarium porum e Trichophyton mentagrophytes. Para a verificação da atividade antifúngica utilizaram o método da diluição em caldo Sabouraud. Adicionaram 500,0mg de cada um dos extratos a 6,0ml do meio de cultura inoculados com 10^6 esporos dos microrganismos indicadores. Os tubos eram então incubados a 25°C por 3 dias. O desenvolvimento das culturas, nos tubos que continham os extratos, foi comparado com os dos tubos controle. Assim, dos 41 extratos vegetais, 25 apresentaram atividade antifúngica, ou seja, inibiram a germinação dos esporos de uma ou mais espécies fúngicas. Piper methysticum (KAWA-KAWA) inibiu o desenvolvimento de todos os fungos testados e os extratos de Ruscus aculeatus, Illicium verum, Hibicus sabdariffa, Rhamnus frangula e Tamarindus indica inibiram a germinação dos esporos de muitas das espécies utilizadas. Os extratos de Eschscholtzia californica, Zingiber e Tilia cordata apresentaram um espectro de ação mais restrito, enquanto que o extrato de Viola tricolor foi ativo somente contra Trichophyton mentagrophytes.

LIMA & MAIA (1984) verificaram a atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso de Waltheria viscosissima, arbusto de ampla distribuição geográfica, conhecida como malva branca e utilizada na medicina popular brasileira contra bronquite, tosse, tumores, lesões ulcerosas, furúnculos e contra várias espécies de bactérias e fungos. Utilizaram como indicadores cepas de: Staphylococcus aureus, Sarcina lutea, Bacillus subtilis, Aerobacter aerogenes, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Actinomyces israelii, Actinomyces bovis, Cryptococcus neoformans, Candida albicans, Microsporum canis, Trichophyton rubrum, Histoplasma capsulatum, Paracoccidioides brasiliensis e Aspergillus flavus. Realizaram os ensaios, em meio líquido, pelo método de diluição seriada e, em meio sólido, pela técnica de poço através da difusão do extrato. Inocularam os microrganismos em tubos de caldo nutriente (bactérias) e de caldo Sabouraud (fungos) adicionados dos extratos nas concentrações de 800 a 3,3ug/ml. Incubaram a 37°C durante 48 horas para bactérias e leveduras, e à temperatura ambiente durante 7 - 14 dias para os bolores. Para o ensaio em meio sólido, utilizaram o Ágar nutriente e Ágar Sabouraud, respectivamente, para bactérias e fungos, aos quais inocularam as suspensões dos microrganismos pela técnica de pour plate. Perfuraram os meios de cultura com cânulas de vidro de 8,0mm de diâmetro e, a seguir, adicionaram às cavidades três concentrações do extrato. Observaram que o extrato aquoso foi ativo contra a maioria dos microrganismos, com exceção de

Candida albicans e de Aspergillus flavus, na concentação de 800,0ug/ml. Ainda, em relação aos fungos, verificaram que, pela técnica do poço, o extrato não apresentou atividade contra Candida albicans quando utilizada na concentração de 800,0ug/ml. Por outro lado, o extrato sólido (fase em acetato de etila) apresentou atividade contra todos os microrganismos, exceto contra Aspergillus flavus na concentração mais elevada. Concluíram que os resultados foram excelentes e proveitosos.

AJAO et al. (1985) investigaram a atividade antimicrobiana de Euphorbia hirta tradicionalmente usada pela medicina popular em várias partes da África. Na Nigéria, o extrato das folhas é usado para o tratamento de gonorréia, disenteria e dores, e o látex, no tratamento de conjuntivites, feridas e queimaduras. Com algumas modificações, obtiveram os extratos de folhas e caule de maneira similar ao método utilizado na medicina nativa. Assim, 200,0g de folhas secas e caule de Euphorbia hirta foram triturados em pilão ou liquidificador, espremidos, os sucos foram centrifugados a 400rpm por 20 minutos e os sobrenadantes, coletados em Becker estéreis. Denominou-se extrato "A" o extrato obtido das folhas (70,0ml), e de extrato "B" o obtido do caule (80,0ml). Após a trituração, uma outra alíquota de 200,0g de folhas foi submetida à fervura por 3 horas com 500,0ml de água destilada e mantida em um frasco cônico coberto e o volume final ajustado com água destilada estéril e denominado de extrato "C". Para a triagem, utilizaram como microrganismos

indicadores, 7 cepas isoladas a partir de diferentes materiais clínicos e duas cepas padrão NCIB. Adotaram a técnica de difusão em ágar, utilizando o meio de cultura Ágar Teste Diagnóstico de Sensibilidade (DST) semeado com um inóculo, previamente padronizado de acordo com Ajao et al. (1984). Aplicaram três gotas de cada um dos extratos A, B e C, nos orifícios e, após a difusão das substâncias, incubaram as placas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram mensuradas em milímetros. Determinaram a concentração inibitória mínima (CIM), utilizando o método da diluição em ágar. Os extratos brutos das folhas e do caule de Euphorbia hirta apresentaram atividade antibacteriana de largo espectro, uma vez que inibiram tanto as bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas. As CIMs de extratos A, B e C contra a cepa padrão Micrococcus luteus (NICB-196) foram, respectivamente, 12,5; 6,25 e 6,25mg/ml, enquanto que para Bacillus subtilis (NICB-36100) foram de 25,0; 12,5 e 25,0mg/ml. Em virtude da ação antibacteriana, acharam justificável a utilização de Euphorbia hirta.

ALMAGBOUL et al. (1985a) realizaram a triagem de 198 extratos de plantas do Sudão , usadas na medicina popular, representando 40 espécies pertencentes a 18 famílias. As plantas foram coletadas em Nilo Azul (nov. 1967), Montanha Nuba (nov. 1975), Nilo Branco (nov. 1978), Kordofan do Norte (nov. 1979), bem como no Noroeste do Nilo superior (nov. 1981). Assim, 10,0g

do pó das plantas secas foram extraídos sucessivamente com clorofórmio e metanol em aparelho de Soxhlet e os solventes, evaporados sob pressão reduzida. Os extratos foram testados contra duas bactérias Gram-positivas (Staphylococcus aureus e Bacillus subtilis), e contra duas bactérias Gram-negativas (Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa). Empregaram o método de difusão em ágar segundo GROVE & RANDALL (1955) com algumas modificações. Após a solidificação do meio, foram feitos 5 poços de 10,0mm de diâmetro com o auxílio de um furador de rolha estéril e, em cada um dos poços, adicionaram 0,1ml dos extratos. Com a finalidade de pré-difusão, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 2 horas, sendo a seguir, incubadas a 37°C por 18 horas. Consideraram ativos os extratos que apresentaram uma zona de inibição maior ou igual a 15,0mm contra um ou mais microrganismos. Dos 198 extratos testados, 134(68%) mostraram significante atividade antibacteriana. Destes, 25,0% apresentaram atividade contra Bacillus subtilis; 33% contra Staphylococcus aureus; 45,0% contra Escherichia coli e 58,0% contra Pseudomonas aeruginosa. As duas bactérias Gram-negativas demostraram maior sensibilidade aos extratos, quando comparadas às bactérias Gram-positivas. Dos vegetais testados, 60,0% dos extratos obtidos de folhas, 71,0% dos obtidos de caules e 77,0% dos obtidos, utilizando as plantas inteiras foram ativos contra um ou mais microrganismos. Quanto aos extratos obtidos das raízes, verificaram que todos foram ativos. Esses resultados demostraram que a atividade não

foi restrita a uma parte específica da planta. Das 40 plantas pertencente a 18 famílias, os extratos de 29 (73,0%) foram ativos contra as bactérias Gram-negativas. Destas 29, 15 foram ativas contra Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa e 16 foram ativas contra Bacillus subtilis e/ou Staphylococcus aureus, 5 contra Bacillus subtilis e 7 contra Staphylococcus aureus. Dos 46 extratos mais ativos, os extratos clorofórmicos exibiram uma pronunciada atividade antibacteriana (57,0%) quando comparados aos extratos metanólicos (33,0%) e aos extratos aquosos (11,0%). Isso indicou que os extratos obtidos pela técnica de maceração foram menos ativos. Observaram que Cleome viscosa, Stylochiton kerensis e Guizotia scalra apresentaram elevado efeito antimicrobiano.

Dando continuidade aos seus trabalhos, ALMAGBOUL et al. (1985b) investigaram a atividade antimicrobiana de 135 extratos obtidos de 31 plantas pertencentes a 15 famílias, contra os mesmos microrganismos indicadores, ou seja, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli. As plantas foram coletadas em diferentes províncias do Sudão e, de cada um dos vegetais, foram preparados extratos clorofórmicos, metanólicos e aquosos. Os microrganismos foram cultivados em caldo nutriente (Oxoid) a 37°C por 18 horas e semeados em placas de Petri. Os extratos foram testados contra os microrganismos e a zona de inibição mensurada como no trabalho anterior. Dos 135 extratos testados, 101 (75,0%) demonstraram

atividade antibacteriana. Desses, 61,0% mostraram atividade significante contra Bacillus subtilis, 58,0% contra Staphylococcus aureus, e 55,0% contra Pseudomonas aeruginosa. Quanto ao espectro de ação dos extratos, os autores verificaram que os microganismos Gram-positivos foram mais sensíveis quando comparados aos Gram-negativos. Notaram, como no estudo anterior, que a atividade não foi restrita a alguma parte morfológica específica da planta. Dos 31 vegetais utilizados, 5 mostraram alta atividade contra os 4 indicadores. Os extratos de 17 plantas (55,0%) foram ativos contra os microrganismos Gram-negativos. Desses, 6 foram ativos contra ambas as espécies, enquanto 6 extratos o foram exclusivamente a Escherichia coli, e 6 unicamente contra Pseudomonas aeruginosa. Por outro lado, os extratos de 19 plantas foram ativos contra as bactérias Gram--positivas e, desses, 7 foram ativos tanto contra Bacillus subtilis quanto sobre Staphylococcus aureus. Por sua vez 5 extratos apresentaram atividade contra Staphylococcus aureus e 7 foram ativos contra Bacillus subtilis. Dos 52 extratos mais ativos, os extratos clorofórmicos exibiram uma pronunciada atividade antibacteriana (44,0%), seguida pelos metanólicos (40,0%) e aquosos (15,0%). Observaram que todas as plantas apresentavam esteróis e/ou triterpenos, porém, não continham alcalóides, antraquinonas e glicosídeos cianogênicos. As plantas mais ativas foram: Cymbopogon nevatus, que também continha saponinas e flavonóides, Entada africana, Euphorbia scordifolia (flavonóide e/ou tanino), Acacia mellifera e Abrus schimperi que

apresentaram saponinas e/ou taninos.

Nessa mesma linha de pesquisa, ALMAGBOUL et al. (1985c), investigaram a atividade antibacteriana de 126 extratos de 24 plantas pertencentes a 21 famílias contra os microrganismos Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa. Como nos trabalhos anteriores, dos vegetais coletados em diferentes províncias do Sudão, foram obtidos extratos metanólicos, clorofórmicos e aquosos. Os extratos foram testados contra os microrganismos indicadores e a zona de inibição mensurada como nos trabalhos anteriores. Observaram que dos 126 extratos estudados, 97 (77,0%) demostraram significante atividade, e que as bactérias Gram--negativas foram mais sensíveis do que as Gram-positivas. Assim, 64,0% dos extratos foram ativos contra Bacillus subtilis, 76,0% contra Staphylococcus aureus, 76,0% contra Escherichia coli e 84,0% contra Pseudomonas aeruginosa. Das 24 plantas testadas, 14 apresentaram atividade contra todos os microrganismos testados. Os extratos de 7 plantas foram ativos contra os 2 microrganismos Gram-negativos (28,0%), desses, 3 foram ativos contra ambos os microrganismos, enquanto que 3 mostraram atividade apenas sobre a Pseudomonas aeruginosa e somente uma foi ativa contra Escherichia coli. Por outro lado, os extratos de 5 plantas foram ativos tanto contra Bacillus subtilis quanto sobre Staphylococcus aureus. Desses extratos, apenas um foi ativo contra ambos os

microrganismos, enquanto que 3 exerceram a atividade somente sobre Staphylococcus aureus e apenas um extrato foi ativo sobre Bacillus subtilis. Dos 46 extratos mais ativos, os extratos metanólicos exibiram pronunciada atividade antibacteriana (43,0%), seguida pelos clorofórmicos (39,0%) e extratos aquosos (17,0%). Das 24 plantas testadas, 8 exibiram uma significante atividade antibacteriana contra Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa. As plantas mais ativas foram: Plecosepalus acaciae, Grewia tenax, Nymphea lotus, Gnidia kraussiana, Cyperus rotundus, Momordica tuberosa, Vahila dichotona e Vigna fragrans. Em todos os vegetais testados, foi demonstrada a presença de esteróis e/ou triterpenos. As 5 plantas mais ativas continham alcalóides, flavonóides e taninos, 6 plantas continham flavonóides e alcalóides. Quanto aos taninos e flavonóides, estes estavam presentes em um mesmo número de plantas. Não encontraram antraquinonas e saponinas em nenhuma das plantas estudadas. Relataram que a planta mais ativa, Plicosepalus acaciae era rica em flavonóides, taninos, esteróis e/ou triterpenos e com traços de glicosídeos cianogênicos.

GUÉRIN & RÉVEILLÉRE (1985) avaliaram a atividade antifúngica de 40 extratos aquosos e alcoólicos cedidos pelo laboratório Vernin (Titrex)-França, contra as seguintes espécies de fungos: Saccharomyces pastorianus, Candida albicans, Rhizopus nigricans, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Penicillium digitatum, Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum e Trichophyton

mentagrophytes. Determinaram a atividade antifúngica pelo método de diluição em ágar sabouraud de acordo com GUÉRIN & RÉVEILLÉRE (1984). Dos 40 extratos testados, 27 apresentaram atividade e, desses, 5 foram mais ativos contra todos os fungos testados, que são ricos em óleos essenciais. O extrato de Orthosiphon stamineus L. é constituído por saponosides, que são responsáveis pela atividade antifúngica, inibindo a germinação e o desenvolvimento de 6 fungos testados e retardou o crescimento de outras 3 espécies.

JIMENEZ-VALERA et al. (1985) investigaram a presença de substâncias com atividade antimicrobiana em vegetais superiores contra a bactéria Yersinia enterocolitica TP 134 (sorotipo 0:3) cedidas pelo Instituto Pasteur - Paris, França. Analisaram 179 espécies vegetais conhecidas na província de Granada - Espanha, pertencentes a 39 famílias. Utilizaram as partes aéreas das plantas previamente lavadas e secas, trituradas em mixer Sorwall, com o líquido extrator, na proporção de 25,0g/100ml do líquido. O pó das espécies foi extraído por maceração com água e etanol a 96,0% durante 18 horas a 4°C e filtrados em papel de filtro. Após a semeadura do microrganismo em Ágar Tripticase soja (TSA) e incubação a 22°C durante 24 horas, avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos pela técnica de Bauer e cols. Os discos, impregnados com 10ul dos extratos, depois de secos, foram distribuídos assepticamente sobre a superfície de Ágar Müller-Hinton em placas e incubadas a

22°C. Das 179 espécies testadas, 17 apresentaram atividade antimicrobiana contra Yersinia enterocolitica em pelo menos um extrato. Determinaram que 3 espécies que apresentaram atividade duvidosa foram coletadas em épocas diferentes. A atividade antimicrobiana das espécies estudadas contra Yersinia enterocolitica foi classificada em ampla, pois das 39 famílias estudadas, 13 (33,0%) apresentaram atividade em um dos extratos. Verificaram também que os extratos etanólicos foram mais ativos (88,0%) do que os aquosos (64,0%).

LAURENS et al. (1985) efetuaram a triagem de 43 espécies de plantas medicinais, tradicionalmente utilizadas para tratamento de infecções, e vendidas no mercado de Dakar-Senegal. Os extratos foram obtidos por maceração em metanol a 10,0% por 24 horas e concentrados sob pressão reduzida à temperatura de 40°C. Utilizaram como indicadores biológicos 11 cepas bacterianas: Sarcina lutea ATCC 9341, Staphylococcus aureus IPP 7625, Escherichia coli IPP 7624, Pseudomonas aeruginosa IPP 7610, Serratia marcescens IPP 412, Streptococcus agalactiae FMD 164, Listeria monocytogenes FMD 1140, Corynebacterium diphtheriae FMD 2690, Salmonella typhi FMD 714, Klebsiella pneumoniae FMD 36 e Shigella dysenteriae FMD26. Empregaram a técnica de difusão em ágar, tendo como meio de cultura, Ágar Müller-Hinton semeado em superfície, com as suspensões a 1,0% dos microrganismos indicadores, previamente cultivados em caldo por 18 hs. Após a aplicação dos cilindros, adicionaram 0,1ml dos extratos na

concentração de 15,0mg/ml em PBS pH 7,0. Efetuaram a leitura do diâmetro da zona de inibição após a incubação de 18 hs a 37°C. O espectro de atividade dos extratos secos, na concentração de 10,0mg/ml, foi determinado, em meio Müller-Hinton, após a semeadura em spot de uma cultura de 18hs contendo 10^5 bactérias/ml. Os extratos brutos de 24 espécies demonstraram atividade contra Sarcina lutea ou Escherichia coli. Quanto ao espectro antimicrobiano, as 13 espécies vegetais mostraram concentração inibitória mínima (CIM) abaixo de 10,0mg/ml contra algumas das espécies testadas, porém 11 apresentaram CIM superior a 10,0mg/ml. Concluíram que das 43 espécies testadas, 24 demonstraram atividade antimicrobiana na concentração de 10,0mg/ml.

MARHUENDA & GARCIA (1985) determinaram a atividade antimicrobiana de extratos aquosos das partes aéreas de Ononis matrix L. obtidos por diferentes métodos. As flores, coletadas em junho (época de floração), nos arredores de Sevilha - Espanha, foram desidratadas em temperatura ao redor de 25°C e pulverizadas. Efetuando a triagem fitoquímica, constataram que Ononis matrix L. apresentava lactonas pentagonais, saponinas, substâncias nitrogenadas, taninos em grande quantidade, esteróides, triterpenos, flavonóides e resinas dos ácidos fenólicos. Utilizaram como microrganismos indicadores as cepas padrão ATCC: Bacillus subtilis (6633), Staphylococcus aureus 25923, Escherichia coli 25922 e Pseudomonas aeruginosa 25619.

Efetuaram a determinação da atividade antimicrobiana pelo método do disco, em Ágar MÜller-Hinton, impregnados com os extratos. Utilizaram tanto os discos já secos como discos úmidos (recém-impregnados). Observaram que todos os extratos brutos macerados, infusos e decoctos-extratos apresentaram atividade contra os Gram-positivos Bacillus subtilis e Staphylococcus aureus, porém sem nenhuma atividade contra os Gram-negativos (Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli). Quanto à influência dos solventes utilizados na extração, demonstraram que o éter não apresentava efeito inibitório tanto para os Gram-positivos quanto para os Gram-negativos, porém, tanto clorofórmio como álcool-água a 96,0% apresentavam ação inibitória, comprovada pelo emprego dos discos secos e disco úmido (sem evaporação de solvente), para ambos os tipos de bactérias. No tocante ao pH, demonstraram que o mesmo não influiu no processo de extração com éter de petróleo, contudo influiu com o extrato com clorofórmio e álcool-água a 96,0%. Os extratos obtidos em pH 9,5 (básico) não apresentaram atividade inibitória, porém os de pH ácido 1,5 e neutro 7,0 apresentaram ação antibacteriana, sendo o pH 1,5 melhor para o extrato clorofórmico e o pH 7,0 melhor para o hidroalcoólico. Quanto ao extrato fenólico, a partir do qual foi isolado o ácido ferrúlico, notaram que foi mais ativo contra Staphylococcus aureus na concentração de 100,0 e 250,0ug/disco, do que para Bacillus subtilis. Efetuando o teste, com outros microrganismos Gram-positivos, demonstraram que Bacillus cereus foi inibido com 500,0ug enquanto que Staphylococcus epidermidis somente o

foi na concentração de 1.500,0ug/disco. Concluíram que a atividade antimicrobiana de Ononis matrix era decorrente da presença do ácido ferrúlico.

MITSCHER et al. (1985) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos da raiz e de 5 substâncias isoladas de Karwinskia humboldtiana (Rhamnaceae), contra as cepas padrão ATCC: Staphylococcus aureus 13709, Escherichia coli 9637, Salmonella gallinarum 9814, Klebsiella pneumoniae 10031, Mycobacterium smegmatis 607, Candida albicans 10231 e Pseudomonas aeruginosa 27853, pelo método de diluição em ágar. A partir de 450,0g de raízes, extraídas exaustivamente com diclorometano e etanol a 95,0% em aparelho de Soxhlet, obtiveram o extrato bruto que foi adicionado ao meio de cultura nas concentrações de 1.000,0 e 100,0ug/ml. As 5 substâncias isoladas foram submetidas a diluição seriada a partir de 100,0ug/ml. Mycobacterium smegmatis foi inibido por todos os componentes testados e Staphylococcus aureus pelas substâncias eleutrin e metoxieleutrin, enquanto que os outros indicadores foram resistentes à ação de todos os componentes. O karwinaphthol A (12,5ug/ml) e karwinaphthol B (50,0ug/ml) foram mais ativos do que os produtos oxidados eleutrin e metoxieleutrin (100,0ug/ml) contra Mycobaterium smegmatis.

MOUREY et al. (1985) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de Ginkgo biloba frente a 44 cepas de microrganismos: 13 bactérias (7 Gram-positivas e 6 Gram-negativas) e 31 fungos (5

em forma de levedura e 26 filamentosos - 5 Zygomycetes, 1 Ascomycete e 20 Deuteromycetes). As folhas de Ginkgo biloba L., coletadas no outono e primavera, foram extraídas com acetona--água 50,0%, em um balão munido de um sistema de refrigeração, aquecido até a ebulição a 105°C durante 30 minutos. Após resfriamento, a mistura com pH 4,0 foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Determinaram a atividade antibacteriana em Ágar Müller-Hinton (Biolabmerieu) e a atividade antifúngica em Ágar malte (formulado no laboratório) distribuídos em volumes de 15,0ml em placas de Petri de 90,0mm de diâmetro. Os fungos filamentosos foram depositados em diferentes pontos da superfície do meio. Utilizaram a técnica da difusão em ágar com cilindros de aço inoxidável esterilizados. A cada cilindro colocaram 0,6ml do extrato e 0,6ml de tampão fosfato (50mM) pH 4,0. As placas assim preparadas, foram então incubadas a 22°C por 24-48 horas para as bactérias, e por 4 dias para os fungos em forma de levedura e uma semana para os fungos filamentosos. O extrato hidroacetônico foi ativo contra as bactérias Gram-positivas, sendo mais ativos contra o gênero Bacillus sp e Staphylococcus sp. As bactérias Gram-negativas mostraram ser menos sensíveis, uma vez que o extrato foi ativo somente contra Pseudomonas fluorescens, enquanto que os microrganismos da família Enterobacteriaceae foram totalmente insensíveis. Por outro lado, observaram que o extrato não apresentou nenhuma atividade sobre os fungos em forma de levedura. Quanto aos filamentosos, verificaram que aqueles, pertencentes à classe dos

Deuteromycetes, foram resistentes, com exceção aos gêneros Spiniger e Ulocladium. Entretanto, os fungos filamentosos da classe Zygomicetes e Ascomycetes foram bastante sensíveis. Constataram também que os extratos das folhas, colhidas no outono, foram mais ativos do que os obtidos a partir das colhidas na primavera.

NAQVI et al. (1985) determinaram a atividade antibacteriana de 100 diferentes espécies de plantas medicinais do Pakistão. Estas plantas, pertencentes a várias famílias e gêneros, usadas na medicina folclórica oriental, foram testadas contra 18 microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. As diferentes partes das plantas, coletadas em diferentes regiões do país, foram separadas, lavadas, secas e 500,0g de cada uma delas, moídos mecanicamente e extraídos por percolação com álcool etílico a 50,0%. Concentraram os extratos sob pressão reduzida, aquém de 40°C, e os resíduos foram dissolvidos em água destilada (5,0mg/ml). Avaliaram a atividade antimicrobiana em meio Ágar Tripticase soja (TSA), semeados com 0,1ml dos microrganismos indicadores cultivados em caldo Tripticase soja (TSB), por 24 horas a 37°C, diluídos a 1,0% em salina e vazados em placas de 10,0 X 100mm. Confeccionaram poços de 6,0mm de diâmetro aos quais adicionaram os extratos a 50,0%, e como controle o etanol a 50,0% em água, incubaram as placas a 37°C durante 24 horas, e a zona de inibição registrada em milímetros. Vinte e nove extratos das plantas testadas mostraram largo espectro, ou seja,

atividade antibacteriana tanto contra as bactérias Gram-negativas como para as Gram-positivas, enquanto que 31 exibiram pequeno espectro de atividade.

BOILY & van PUYVELDE (1986) testaram a atividade antimicrobiana de 100 vegetais inteiros ou partidos, separadamente (282 amostras) contra os seguintes microrganismos padrão ATCC: Bacillus subtilis (6633), Candida albicans (10281), Mycobacterium smegmatis (607), Pseudomonas aeruginosa (15442), Salmonella gallinarum (9184) e Staphylococcus aureus (13709) utilizando o método da diluição em ágar e semeadura em estria, conforme MITCHER et al. (1972). Coletaram todas as plantas no distrito de Butare (Sudeste da Ruanda-África) a uma altitude média de 1.700m, exceto Thalictrum rhynchocarpum (Plantaginaceae) que foi coletada no distrito de Cyangugu (sudeste, montanha florestal, acima de 1.800m) e Vernonia kirungae (Asteraceae), coletada no distrito de Gisenyi (nordeste, montanha florestal, acima de 1.800m). As partes das plantas eram secas, pulverizadas e cerca de 20,0g do pó extraídos em um percolador com metanol até a exaustão e evaporado a vácuo a uma temperatura de 40°C. Determinaram a atividade antimicrobiana dos extratos por meio do método da diluição em ágar, incorporando 0,2ml do extrato afim de obter uma concentração de 1.000,0ug/ml. As cepas eram semeadas em estria radial em triplicata e as leituras efetuadas após 24-48 horas de incubação a 37°C. Das 100 plantas medicinais testadas, 32 apresentaram atividade contra um

ou mais microrganismos. Quanto aos extratos obtidos, das partes das plantas, verificaram que 30 inibiram Bacillus subtilis; 29, Staphylococcus aureus; 27, Mycobacterium smegmatis; 22, Candida albicans e 1, Salmonella gallinarum. Verificaram que, das 64 plantas usadas na medicina nativa, para o tratamento de doenças infecciosas, 24(37,0%) apresentaram atividade contra um ou mais microrganismos. Das 36 plantas usadas para outras finalidades, somente 8(22,0%) apresentaram atividade antimicrobiana. Notaram que algumas plantas que não demonstraram atividade nessa triagem inibiram outros microrganismos, entre os quais Neisseria gonorrhoeae. Incluindo esses últimos resultados, observaram que pelo menos 32(50,0%) das plantas utilizadas na medicina nativa, para tratar de doenças infecçiosas, apresentaram atividade antimicrobiana. Consideraram essa percentagem elevada, pelo fato de que não testaram outros microrganismos contra os quais as plantas medicinais são usadas. Os autores também salientaram que os Ruandenses tradicionais preferem uma combinação de várias plantas para o tratamento das doenças. Essa combinação de vegetais poderia resultar em alguma atividade antimicrobiana, muito embora os constituintes isolados ou cada planta individualmente não tenha apresentado atividade.

BURAS et al. (1986) estudaram a ação antibacteriana dos extratos de Siphocampylus verticillatus (Cham.) G.Don, conhecida pelo nome popular de jaratataca, coletada em Araucária - Paraná, na epóca da floração (dezembro - março). Pesquisaram o

vegetal recém-coletado e seco, dividido em duas amostras. A primeira amostra era constituída de caules, folhas e flores lavados com água destilada, cortados em pequenos pedaços, conservados em cartuchos plásticos e mantidos em congelador a -18°C. A segunda amostra era constituída pelos mesmos órgãos vegetais, secos em estufa à temperatura de 38°C durante 24 horas, reduzidos a pó e conservados em recipientes fechados. Empregaram várias técnicas para a extração dos princípios ativos, entre elas: maceração, percolação e a contínua em aparelho de Soxhlet. Testaram também algumas técnicas de extração utilizando apenas folhas secas do material em estudo, entre elas: maceração com etanol a 70,0%, e hexano, percolação com etanol a 80,0% e hexano e finalmente, extração contínua em aparelho de Soxhlet com etanol e hexano. Empregaram as seguintes bactérias para os ensaios bacteriológicos: Escherichia coli (0127:K63), (086:K61), (0111:K58); (0128:K67); (0119:K69); (0125:K70); (0126:K71); Salmonella agona, Salmonella panama, Salmonella typhimurium, Salmonella tyhi, Shigella flexneri , Shigella dysenteriae, Shigella boydii e Shigella sonnei, isoladas do ambiente pediátrico em Curitiba e Escherichia coli (028ac e 0124:K72), cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Avaliaram a ação antimicrobiana dos extratos vegetais pela técnica de Kirby & Bauer (difusão em meio sólido). Semearam o inóculo, com auxílio de zaragotoa esterilizada, na superfície da placa contendo o meio Ágar Müller-Hinton (Difco). Embeberam os discos, de 10,0mm de diâmetro, com extratos vegetais a 20,0%,

assim como com os respectivos solventes, secos em estufa a 37°C e posteriormente aplicados nas placas. Incubaram à temperatura de 37°C, durante 16 a 18 horas, e os halos de inibição medidos com paquímetro. Determinaram a concentração inibitória mínima das frações obtidas, em meio líquido, pela técnica da diluição seriada, com concentração inicial de 100,0ug/ml em 0,5ml de caldo Müller-Hinton (MHB) com volume final de 1,0ml. A concentração das frações e dos solventes variou de 100,0 a 0,39ug/ml. A seguir, os tubos foram incubados a 37°C durante 18 horas. Verificaram que Siphocampylus verticillatus inibiu o crescimento das bactérias: Escherichia coli (11 sorotipos), 4 espécies de Shigella e de Salmonella. Constataram que a melhor técnica de extração foi a contínua em aparelho de Soxhlet com hexano, a qual forneceu extratos capazes de inibir o crescimento de 19 bactérias. Observaram que as folhas, quando comparadas aos outros órgãos, apresentaram no total, diâmetros de inibição maiores, e que os órgãos recém-coletados apresentaram maior atividade do que os órgãos secos.

FRANZBLAU & CROSS (1986) avaliaram a atividade relativa in vitro, dos chás de ervas usados na China contra um largo espectro de microrganismos patogênicos: Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella typhi, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Alcaligenes calcoaceticus, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis e Candida albicans obtidos do Centro Médico de Tucson e Mycobacterium smegmatis, obtido do

Departamento de Microbiologia, Universidade do Arizona. Todas as ervas foram obtidas da Companhia de Ervas Chinesas, São Francisco, em julho de 1983 e armazenadas a 3°C durante 4 meses antes do teste. Colocaram 10,0g da planta em garrafas de vidro de 500,0ml, adicionaram 200,0ml de água destilada, ferveram durante 1 hora, filtraram e liofilizaram. O material liofilizado (320,0mg) foi adicionado a 20,0ml de água destilada estéril, obtendo-se uma solução de 15,0mg/ml. Volumes suficientes dessa solução e água destilada foram adicionados a um volume final de 8,8ml para 80,0ml de Ágar Müller-Hinton (Difco) e fundidos (45 - 50°C), obtendo-se concentrações variando entre 1.600,0 e 100,0ug/ml do liofilizado solúvel em água. Os meios assim preparados foram distribuídos em placas de Petri e inoculados com os microrganismos indicadores, sendo então as placas incubadas a 35°C por 36 horas. Dos 18 extratos aquosos testados nenhum foi ativo contra Escherichia coli, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa e Streptococcus faecalis. No entanto, Huangina e Huangliana foram ativos contra 5 microrganismos, sendo que para a maioria das espécies testadas eram baixos os valores da concentração inibitória mínima (CIM). Klebsiella pneumoniae e Staphylococcus aureus foram os microrganismos mais sensíveis à ação dos chás, sendo inibidos respectivamente por 11 e 9 dos chás testados. Candida albicans foi inibida por dois chás.

GNAN & SHERIHA (1986) avaliaram a atividade antimicrobiana de um alcalóide (+)-tuberina isolado de Haplophyllum tuberculatum (Rutaceae) contra as cepas de Saccharomyces cerevisiae, Bacillus subtilis e Escherichia coli da Universidade de Al-Fateh-Tripoli, Líbia, e Staphylococcus aureus da Universidade de Washington como representantes dos agentes causadores de intoxicação alimentar. Os microrganismos indicadores foram expostos a (+)-tuberina na concentração de 0,1 e 1,0ug/ml preliminarmente, observando-se a inibição completa a 48,0ug/ml. Determinaram a ação da (+)--tuberina pelo método do disco e exposição em caldo com mensuração das respostas pela contagem do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em placas e pela medida turbidimétrica. Empregaram placas de Petri (100,0mm de diâmetro) com 20,0ml de Ágar nutriente (pH 7,0) para o cultivo das bactérias ou Ágar dextrose batata (pH 4,5) para o cultivo das leveduras, inoculadas com 10^7 a 10^8UFC/ml para produzir um crescimento confluente. Após solidificação, discos de papel (10,0mm de diâmetro), mergulhados em metanol (controle negativo), (+)-tuberina (0,1 e 1,0ug/ml), foram distribuídos em quadrantes separados de cada placa. Após incubação a 37°C por 25 e 48 horas, as zonas de inibição foram mensuradas. Para a contagem das culturas, adicionaram 10^7 a 10^8 UFC/ml ao caldo nutriente estéril (bactéria) ou caldo dextrose de batata (levedura) contendo 0,0, 0,1 e 1,0ug/ml de (+) -tuberina/ml, e incubadas a 37°C por 24 horas em incubador de agitação contínua. Para mensuração turbidimétrica, prepararam caldo nutriente ou

dextrose de batata em Erlenmeyer com 0,0, 1,0 e 1,0ug/ml de (+)-tuberina, esterelizado a 121°C por 15 minutos. Adicionaram 0,5ml de uma cultura de 18 a 24 horas dos microrganismos indicadores (10^7 - 10^8 UFC/ml) em cada frasco. Após incubação a 37°C por 12 horas também sob agitação contínua, mediram a absorbância a 520nm, com um espectrofotômetro e calcularam a percentagem de inibição. Observaram que a (+)-tuberina, na concentração de 1,0ug/ml, inibiu completamente Staphylococcus aureus e Bacillus subtilis, moderadamente Saccharomyces cerevisiae e fracamente Escherichia coli. A (+)-tuberina/ml, no ensaio da contagem em placa contendo 1,0ug, apresentou também efeito inibitório sobre Staphylococcus aureus, Saccharomyces cerevisiae e Escherichia coli. Em relação aos ensaios turbidimétricos, os microrganismos indicadores também foram inibidos pela (+)-tuberina, porém, o efeito inibitório observado foi menor para Escherichia coli. Concluíram que (+)-tuberina é relativamente efetiva contra Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus e Saccharomyces cerevisiae.

HATTORI et al. (1986) determinaram a atividade antibacteriana de alguns derivados cumarínicos extraídos de raízes de Glycyrrhiza uralensis, largamente usada na medicina chinesa como expectorante, emoliente, fluidificante do muco, antídoto para envenenamento e analgésico. Empregaram como indicador a cepa de Streptococcus mutans, agente etiológico da cárie dental. Utilizaram as raízes originárias do norte e noroeste da China, provenientes da União Soviética e Afeganistão,

obtidos no comércio. Prepararam os extratos das raízes de Glycyrrhiza uralensis com metanol e particionaram com clorofórmio e n-hexano. Frações ativas foram novamente fracionadas em cromatografia de coluna em sílica gel, obtendo-se 7 substâncias. Estas substâncias foram identificadas pelos métodos espectroscópicos como: glicirol, isoglicirol, glicicoumarina, ácido betulínico, formononetina e ácido gliciretico. Todas as frações, bem como as substâncias puras, foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da diluição em tubo (NAMBA et al., 1982). O glicirol e glicirina demonstraram maior ação antibacteriana com CIM de 6,25ug/ml enquanto que, para o isoglicirol e para a glicicumarina, a CIM foi de 12,5ug/ml. Observaram que as raízes, procedentes do nordeste e noroeste da China, apresentam glicicumarina, glicirol, glicirina e isoglicirol, enquanto que, as provenientes da região de Sinkiang, Afeganistão e Rússia não continham estas substâncias. Atribuíram a variação dos componentes à diferença da fonte botânica. Concluíram que o extrato metanólico, de raízes de anis, apresentava ação antibacteriana potentíssima contra o microrganismo cariogênico Streptococcus mutans e sugeriram que o extrato alcoólico podia ser usado na prevenção da cárie dental, como agente anti-placa.

MOSKALENKO (1986) realizou a triagem da atividade antimicrobiana de 250 espécies de plantas, pertencentes a 70 famílias, usadas na União Soviética. Obteve as informações do uso

popular, com os moradores da zona rural e selecionou e coletou as plantas usadas contra feridas infectadas, angina e infecção intestinal entre outros. Depois de secas a 50°C, as diferentes partes dos vegetais eram finamente moídas (3 - 5mm) e extraídas, por meio de maceração, durante 10 dias a 25°C em etanol a 70,0% na proporção de 1:5, obtendo-se 308 extratos. Discos com 6,0mm de diâmetros foram impregnados com os extratos, secos e pesados. A quantidade de resíduo seco de todas as plantas foi de 400,0ug/disco. Os microrganismos foram obtidos no Departamento de Microbiologia do Instituto Médico de Vladivostok. As espécies usadas foram: Staphylococcus aureus 209, Staphylococcus aureus 617, Shigella sonnei 3c, Escherichia coli 12835 (lac^+), Escherichia crim 2584, Shigella flexneri 2a, Bacillus subtilis 89 e Mycobacterium smegmatis 1b. Utilizaram Ágar extrato de carne--peptona (MPA), pH 7,2 - 7,4, distribuídos em volumes de 20,0ml por placas de Petri estéreis de 100,0mm de diâmetro. As culturas bacterianas foram diluídas com solução salina na concentração de 0,9 X 10^9cel/ml e 1,0ml da suspensão distribuída sobre as placas. Após 30 minutos, foram aplicados, simetricamente sobre a superfície do meio de cultura, 16 discos impregnados com os extratos. A seguir, as placas eram incubadas durante 24 horas a 37°C, e a zona de inibição ao redor do disco mensurada. Os discos impregnados com tintura de calêndula e eucaliptol foram usados como controle. Observou que 168 plantas (67,2%) foram ativas contra as espécies de bactérias indicadoras. As 70 espécies mais ativas (28,0%) eram pertencentes a 11 famílias.

Todas as espécies da família Oleceae Hoffmgg et Link apresentaram atividade, enquanto que todas as da família Peaceae Barnhart testadas foram inativas. Por outro lado, verificou que o efeito antibacteriano era característico de extratos obtidos a partir de vários órgãos da planta, sugerindo que os agentes antibacterianos não eram exclusivos a uma parte da planta ou que os antibióticos específicos, produzidos em determinada parte da planta, eram geralmente ativos contra as espécies bacterianas. Avaliando a atividade de ervas, árvores, arbustos e trepadeiras, notou que as ervas foram mais ativas, enquanto que as árvores e arbustos não eram ativos e as trepadeiras, pouco ativas. Entre os órgãos das plantas, os mais ativos foram as folhas, as cascas do caule de árvores e arbustos, assim como os brotos das ervas. As plantas obtidas principalmente na montanha e na tundra-campina foram as mais ativas.

NADIR et al. (1986) avaliaram a eficácia de 3 métodos de extração dos princípios ativos de 10 vegetais, coletados no período de abril de 1982 a 1983, utilizados na medicina popular do Iraque com atividade antimicrobiana. No método A, utilizaram 10,0g da planta seca agitados 3 vezes com 200,0ml de etanol a 80,0%. Outra amostra de 10,0g foi extraída sucessivamente em Soxhlet, com 500,0ml de éter de petróleo e 500,0ml de clorofórmio e concentrados à pressão reduzida. No método B, suspenderam 10,0g de pó da planta, em quantidade suficiente de água destilada para formar uma fina massa ou pasta fluida. O pH ajustado para

2,0 com HCl a 20,0%, incubados a 37°C por 30 minutos em banho maria sob agitação contínua (100 osc/min.), neutralizados com NaOH a 20,0% e filtrado. O filtrado foi dividido em 2 partes, sendo uma parte evaporada até a secura, e a outra, extraída com etanol e evaporada (fração etanólica). No método C, foi realizada a extração em diferentes pH. Porções de 10,0g de pó das plantas Achillea conforta e Convolvulus arvensis foram suspensas em água destilada, suficiente para obter uma massa fina ou pasta fluida e incubadas a 37°C por 30 minutos, após ajustar o pH para 2,0. A suspensão foi filtrada e o filtrado extraído três vezes com etanol. O pH da camada aquosa foi ajustado para 4,0 e extraído com etanol. Esse procedimento foi repetido após o ajuste do pH do meio aquoso a 6,0 e 8,0, e a fração etanólica evaporada até a secura. Utilizaram, como microrganimos indicadores, as cepas padrão ATCC: Bacillus subtilis 6633, Candida pseudotropicalis 612; padrão NCTC, Staphylococcus aureus 8532, Escherichia coli 10538, Proteus vulgaris 4177, e uma cepa de Candida albicans isolada no Hospital local. Detectaram a atividade antimicrobiana pela técnica de difusão em ágar, utilizando como meio de cultura ágar nutriente (Oxoid) para as bactérias e ágar glicose extrato de levedura para os fungos. Padronizaram a concentração dos extratos obtidos pelos métodos A e B, dissolvendo 6,0mg da fração etérea de Heliotropium ramosissimun em 3,0ml de metanol e todos os outros extratos ajustados para 2,0mg/ml. Demonstraram que a fração etérea do método B apresentava efeito inibitório sobre o crescimento microbiano, porém esse efeito não foi

observado quando a planta foi extraída pelo método A. Isso indicou que o método B foi mais eficiente para extração dos constituintes ativos do que o método A. Notaram que a fração etérea de todas as plantas apresentavam atividade antimicrobiana, porém, variável, exceto a de Prosopis farca, que demonstrou atividade na fração aquosa obtida pelo método B. As plantas mais ativas foram Achillea conforta e Convolvulus arvensis contra as espécies de Candida. Observaram que o pH da extração influenciou sobre a atividade antimicrobiana. A atividade de Convolvulus arvensis foi maior em extratos obtidos em pH 2,0 e menor a medida que se aumentava o pH, indicando que o constituinte ativo foi melhor extraído em pH baixo. Em relação à Achillea conforta, verificaram que atividade foi maior em extratos obtidos em pH 2, sugerindo a existência de mais de um constituinte responsável pela atividade antimicrobiana.

TOMES et al. (1986) determinaram a atividade antimicrobiana de 5 espécies de Gomphrena (G. boliviana, G. perennis, G. haenkiana, G. meyeniana) da família Amaranthaceae, Desfontaínia spinosa (Desfontaniaceae), Vigna luteola (Leguminosae), Erythroxylon argentinum (Erythoxylaceae), Pea huecu (Gramineae), Wedelia glauca e Senecio bonariensis (Compositae). As espécies Gomphrena e Wedelia glauca foram coletadas em Cordoba (Argentina); Pea huecu (planta inteira), coletada em Bariloche e Zapala - Argentina; Senecio pampeanus e Senecio bonariensis, na província de Tucumán-Argentina e Desfontainia spinosa, em Puerto

Blest, província do Rio Negro (Argentina). As espécies foram secas e extraídas sucessivamente, em aparelho de Soxhlet, com éter de petróleo (60 - 80°C), etanol ou metanol. Os extratos foram diluídos com dimetil-sulfóxido (DMSO), de modo a obter concentrações de 4.000,0, 2.000,0, 1.000,0, 500,0, 250,0, 100,0 e 50,0ug/ml do meio ágar Triptone da soja (TSa). Utilizaram como microrganismos indicadores as cepas padrão ATCC: Staphylococcus aureus (12600), Streptococcus faecalis (19433), Escherichia coli (23226), Escherichia coli K12 (10798), Mycobacterium phlei (11758), Proteus vulgaris (CDC 0819) e as cepas locais de Enterobacter aerogenes, Micrococcus luteus, Bacillus subtilis, Salmonella newport, Salmonella oranienburg, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens e Pseudomonas aeruginosa. As placas foram examinadas após 24 e 48 horas de incubação a 37°C e o extrato foi considerado ativo quando inibia completamente o crescimento bacteriano. Testaram também a atividade de ácido kaurênico e atractyligenina isolados de Wedelia glauca. De todos os extratos testados, nenhum apresentou ação contra as bactérias Gram-negativas. Verificaram que Gomphrena boliviana foi a mais ativa na concentração de 50,0ug/ml contra Mycobacterium phlei e a presença de flavonas 5, 6, 7-trisubstituída podia ter sido responsável por esta ação. Os percolatos em clorofórmio das espécies de Senecio foram ativos a 100,0 e 2.500,0ug/ml contra Micrococcus luteus e Mycobacterium phlei, respectivamente. Esta atividade pôde ser atribuída aos alcalóides pirrolizidínicos, principais constituintes desses percolatos. O extrato em éter de

petróleo e metanol da Erythroxylon argentinum foi ativo contra Mycobacterium phlei (2.500ug/ml), devido à presença de triterpenos pentacíclicos e alcalóides tropânicos. Também o extrato etanólico de Poa huecu mostrou atividade contra Mycobacterium phlei (500,0ug/ml) devido provavelmente à ocorrência de cetonas pentacíclicas. O extrato etanólico de Vigna luteola apresentou uma Concentração Inibitória Mínima de 250,0ug/ml contra Micrococcus luteus. O extrato de Wedelia glauca demonstrou atividade contra Streptococcus faecalis (250,0ug/ml), Micrococcus luteus (< 50,0ug/ml), Bacillus subtilis (< 50,0ug/ml) e Mycobacterium phlei (< 50,0ug/ml). Esta atividade foi atribuída à presença principalmente de ácido kaurênico e seus derivados.

TWAIJ et al. (1986) avaliaram a atividade antimicrobiana de Centaurea phyllocephala e Centaurea behen (Compositae) usadas na medicina popular do Iraque, como agente antidiabético e antimicrobiano para o tratamento de feridas. As partes aéreas da planta, coletadas na época de floração, foram submetidas à secagem, pulverizadas, extraídas à temperatura ambiente, com 4x2.000,0ml de metanol e o solvente removido a vácuo. Avaliaram a atividade pelo método do poço contra os seguintes microrganismos indicadores: Escherichia coli, Proteus vulgaris, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Candida utilis, Candida pseudotropicalis e Saccharomyces cerevisiae. As placas foram inoculadas com os microrganismos, afim de se obter uma

concentração final de 10^7cels/ml. Confeccionaram poços com 10,0mm de diâmetro e adicionaram 0,2ml dos extratos diluídos em série. As placas foram incubadas a 30°C por uma noite e os diâmetros da zona de inibição, mensurados em milímetros. Determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) em caldo nutriente e caldo extrato de levedura para fungos em forma de levedura. Volumes de 1,0ml de cada diluição dos extratos foram adicionados a uma concentração final de 10^5cels/ml. Os tubos foram incubados a 37°C e 30°C por uma noite. A menor concentração, em que não se observou turbidez, foi considerada a CIM. Alíquotas de 1,0ml dos tubos testes que não apresentaram crescimento foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar nutriente. A menor concentração que não apresentou crescimento foi considerada como a CBM. Os extratos de Centaurea behen não demonstraram nenhuma atividade na concentração testada, porém os de Centaurea phyllocephala, na concentração de 5,0mg/ml, foram ativos contra Escherichia coli, Proteus vulgaris, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus e Saccharomyces cerevisiae. Entretanto, nenhuma ação foi observada contra as espécies de Candida. Na determinação da CIM e CBM, Centaurea phyllocephala inibiu o crescimento de bactérias e do fungo em forma de levedura, Saccharomyces cerevisiae, porém não inibiu o desenvolvimento das espécies de Candida.

BASTIDE et al. (1987) determinaram a atividade de 3 óleos essenciais de coníferas: Picea abies, Pseudotsuga menziensii e

Pinus sylvestris. Obtiveram os óleos essenciais por meio da destilação a vapor a partir de 20,0k de material seco. As frações dos óleos foram obtidas por cromatografia em coluna de sílica - aluminato de sódio e identificadas por espectrometria de massa (CPV/SM). Avaliaram a atividade antimicrobiana, pelos métodos da diluição e das concentrações, dos óleos e das suas frações contra as seguintes cepas padrão ATCC: Escherichia coli (10536) e Staphylococcus aureus (9144). Os óleos e frações foram diluídos com polissorbato 80 (Tween 80). Utilizando também o Tween 80, obtiveram as emulsões dos óleos de Epicea (50/50), Douglas (80/20) e Pinus silvestris (60/40). A partir das emulsões, assim obtidas, foram feitas diluições a 1/2 em meio Müller-Hinton para o método da diluição. Para o método da concentração, adicionaram quantidades decrescentes da emulsão óleo/Tween 80 em Müller-Hinton. A concentração inibitória mínima (CIM), contra Escherichia coli, do óleo essencial de Douglas, foi de 6,1mg/ml, de Pinus silvestris 64,3mg/ml e de Epicea 125,0mg/ml. As frações I, II e III de Epicea, constituídas essencialmente de monoterpenos, apresentaram atividade nas concentrações de 2,8; 1,8 e 1,8mg/ml respectivamente, enquanto que a fração IV, rica em acetato de bornila, apresentou atividade na concentração de 22,3mg/ml. As frações de óleos essenciais, obtidas a partir de Douglas, compostas de hidrocarbonetos monoterpênicos, apresentaram atividade menor, ou seja, inibiram os microrganismos em concentrações mais elevadas (24,3; 12,15 e 6,08mg/ml. Quanto a Pinus silvestris, observaram que apenas as

frações I e II, constituídas de monoterpenos, apresentaram ação contra Escherichia coli, marcadamente elevada com 0,69 e 1,14 mg/ml respectivamente. Em relação a Staphylococcus aureus, notaram que, tanto para Douglas, quanto para Pinus silvestris, apenas os óleos essenciais brutos foram ativos, respectivamente, nas concentrações de 8,1 e 4,0mg/ml, enquanto que as frações foram inativas. Por outro lado, referiram que de Epicea, foram ativos o óleo bruto e as frações I, II e III, nas concentrações de 2,0; 2,0; 1,7 e 1,4mg/ml. Acharam interessante a diferença da CIM do óleo essencial bruto de Epicea, 125,0 mg/ml para Escherichia coli e 2,0mg/ml para Staphylococcus aureus, enquanto que as atividades das frações I, II e III apresentaram valores similares.

CÁCERES et al. (1987) efetuaram a triagem in vitro da atividade antimicrobiana, pela técnica de difusão em ágar, de 89 plantas entre 200 usadas, popularmente pelo povo de Higland (Guatemala), descendentes diretos dos Maias, para o tratamento de infecções da pele e de mucosas, tais como, conjuntivite, dermatites e vaginites. Prepararam uma tintura macerando 10,0g do material seco e pulverizado com 100,0ml de etanol a 50,0%, à temperatura ambiente, durante 10 dias com agitação diária e filtrada com papel de filtro Whatman nº2. No caso de bulbos e frutas secas, obtiveram os sucos por pressão e a seguir, esterilizados por filtração em membrana (Millipore de 0,45um). Os discos de papel de filtro foram impregnados com 0,03ml da

tintura ou suco, secos em fluxo laminar e armazenados à temperatura ambiente até o momento do uso. Para a triagem da atividade antimicrobiana, utilizaram como indicadores cepas de Candida albicans, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa e Staphylococcus aureus, isolados de casos clínicos do Hospital de Guatemala. Os inóculos eram semeados na superfície do ágar de Müller-Hinton com auxílio de zaragotoa e, após a sua secagem, aplicaram os discos impregnados com as substâncias em pontos eqüidistantes, pressionados levemente para assegurar o contato e incubaram a 35°C por 24 horas. As placas com Candida albicans foram incubadas por 48 horas. A zona de inibição foi medida com régua e interpretados como positivo (+): quando apresentava consistente zona de inibição; intermediário (±): quando a zona de inibição não era muito nítida e negativo (-) sem inibição. O suco do bulbo de Allium sativum e o do fruto de Citrus aurantifolia, apresentou atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados. A tintura de 6 outras plantas (6,7%) também demonstrou atividade frente a mais de um microrganismo, enquanto que 20 (22,5%) inibiram apenas um microrganismo. O microrganismo mais sensível foi Staphylococcus aureus (23,5%) seguido por Escherichia coli (14,1%) e Pseudomonas aeruginosa (7,9%). Demonstraram que a atividade antimicrobiana exercida, no mínimo por 28 (31,5%) das plantas estudadas, frente aos microrganismos responsáveis por infecções dérmicas e mucosas justificava o seu emprego pela população.

CHALCHAT et al. (1987) verificaram a influência do envelhecimento natural e artificial, provocado sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de Pin (Pinus sylvestris), Epicéa (Picea abies) e Douglas (Pseudotsuga menziesii) bem como, de suas frações contra Escherichia coli. Utilizaram árvores de 15 a 20 anos, com tronco de 15,0 a 20,0cm de diâmetro e delas obtiveram, por meio de destilação a vapor, óleos essenciais de 20,0kg do material fresco com 200,0L de solvente. Avaliaram a atividade antibacteriana pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em meio líquido, tanto dos óleos quanto das frações envelhecidas natural ou artificialmente. A CIM dos óleos (P_A, P_B e P_C) de Pinus sylvestris, que sofreram envelhecimento natural, foi inferior a 0,27mg/ml e notaram uma modificação da atividade em função do tempo. O óleo essencial P_A não apresentou variação significante com o envelhecimento, porém, P_B e P_C demonstraram atividade antibacteriana sem modificação até 2 meses, variação abrupta após 2 meses e meio, assim como, após 4 meses e meio. Os valores da CIM de P_B e P_C, após 2 meses e meio e 4 meses e meio, foram 40,8, 33,4 e 18,0mg/ml e 64,3, 64,3 e 7,37mg/ml respectivamente. Em relação à Epicea, verificaram que a fração II foi a mais ativa e que após o processo de envelhecimento natural, tanto a 0°C por 2 meses ou a 25°C por um mês, as frações aumentaram sua atividade. Com o envelhecimento artificial, as frações H_7 e H_{15} apresentaram uma notável atividade antimicrobiana, sem sofrer variações com o decorrer do tempo. A CIM do óleo H_{15} foi comparável com a da

canela, um dos óleos essenciais mais ativos contra Escherichia coli. Em relação aos óleos essenciais de Douglas, assim como suas frações, observaram uma grande variação da atividade. Quanto a fração VI, a mais ativa, observaram que após 6 meses ocorreu pequena variação na atividade contra Escherichia coli, no entanto, as frações III e IV, menos ativas, apresentaram sensível queda na CIM após 7 meses, ou seja, de 6,08 para 0,71 e 0,24mg/ml, respectivamente. Observaram que o aumento de hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados aumentaram a atividade dos óleos essencias contra Escherichia coli. Este aumento foi devido ao oxigênio, o principal responsável pela transformação desses óleos. Por outro lado, verificaram que o aumento da atividade antimicrobiana, em função do tempo, foi decorrente da formação de produtos de foto--oxigenação constituídos principalmente de álcoois e cetonas.

RIZVI et al. (1987) avaliaram a atividade antimicrobiana de 88 extratos de 65 plantas pertencentes a 34 famílias da flora medicinal popular do Paquistão. Selecionaram plantas floridas e frutificadas, cultivadas ou silvestres da região de Karachi, assim como de outras, obtidas no comércio. Obtiveram os extratos brutos a partir de diferentes partes das plantas secas/frescas; com etanol a 90,0% pelo método de percolação e concentrados sob pressão reduzida. Todos os 14 microrganismos indicadores utilizados foram isolados na clínica do Departamento de Microbiologia da Universidade de Karachi. Empregaram o meio de

cultura Ágar nutriente o qual foi vazado em volumes de 25,0ml em placas de Petri de 85,0mm de diâmetro e solidificados à temperatura ambiente. Os inóculos foram semeados, com zaragotoa, na superfície do meio de cultura e, com um furador de rolha estéril, confeccionaram poços de 10,0mm de diâmetro no centro de cada uma das placas. Nos orifícios, assim preparados, foram adicionados, assepticamente, 0,3ml de uma solução a 4,0% de cada extrato bruto em etanol a 90,0%, e em outro poço foi adicionado igual volume de etanol como controle. As placas foram então incubadas a 37°C durante 24 hs, a seguir era feita a medida da zona de inibição. Dos 88 extratos, 23 (26,1%) mostraram um largo espectro de atividade antibacteriana, enquanto que, 19(21,4%) extratos foram inativos contra todos os microrganismos indicadores e os demais demonstraram pouca atividade contra algumas bactérias patogênicas. O extrato, obtido do broto de Convolvulus arvensis L. da família Convolvulaceae, apresentou atividade antimicrobiana contra Streptococcus faecalis e Corynebacterium diphtheriae com diâmetro de inibição variando de 5,0 a 8,5mm. Em relação a: Salmonella typhi, Salmonella parathyphi B, Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Vibrio cholerae Inaba, Vibrio cholerae Eltor e Staphylococcus aureus, as zonas de inibição variaram de 3,0 a 4,9mm. Nenhuma zona de inibição foi verificada contra Diplococcus pneumoniae. Consideraram interessante o fato de que muitas das plantas, cultivadas somente com finalidades

"alimentares", apresentavam propriedades terapêuticas.

SABAHI et al. (1987) avaliaram a atividade antimicrobiana de 106 extratos alcóolicos de plantas Iranianas contra 17 microrganismos indicadores, dos quais, 4 eram cepas padrão da ATCC e os demais, isolados de fezes de pacientes do Hospital do Irã. As plantas foram colhidas de diferentes áreas do sudeste do Irã, secas à sombra, reduzidas a pó e extraídas com metanol, em extrator Soxhlet, durante 24 horas. Após a remoção do solvente, sob pressão reduzida a 45 - 50°C, os extratos brutos resultantes foram utilizados para a triagem. Os extratos, assim otidos (20,0mg), foram dissolvidos em metanol (1,0ml), adicionados a 20,0ml de Ágar Tripticase soja (TSA) à cerca de 50°C e vertidos em placas. Cerca de 4 a 5 colônias dos microrganismos testes foram inoculadas em 3,0ml de caldo Tripticase soja (TSB) e incubadas durante 1 hora a 37°C. A concentração das suspensões, assim obtidas, era padronizada utilizando a escala de McFarland. O crescimento bacteriano foi avaliado após 24 e 48 horas de incubação. Quando ocorria a inibição total das culturas, o extrato era considerado ativo (a) por outro lado, inibição parcial indicava que o extrato era fracamente ativo (fa). Dos 106 extratos de plantas, pertencentes a 34 famílias, 50 mostraram atividade contra pelo menos um microrganismo. Sarcina subflava foi a bactéria mais sensível, sendo inibida totalmente por extratos de 16 plantas e parcialmente por outras 24 plantas. A segunda espécie microbiana mais sensível foi Micrococcus

luteus, que foi totalmente inibido por 5 extratos e fracamente por outros 16. Bacillus subtilis foi inibido por 11 extratos enquanto que Staphylococcus aureus foi inibido por 10. A planta mais ativa foi Sanguisorba minor, a qual inibiu completamente 4 espécies de microrganismos e parcialmente outros 3.

ALARCON DE LA LASTRA et al. (1988) verificaram a atividade antimicrobiana e farmacodinâmica dos ácidos fenólicos, obtidos das flores de Dittrichia viscosa (L.) W. Greuter., coletadas em outubro, em San Juan de Aznalfarache Sevilha, Espanha. Após a sua dessecação, à temperatura de 25°C ± 2°C, foram extraídas por decocção com ácido clorídrico e éter etílico (extrato etéreo), sendo então concentrados. O resíduo, assim obtido, foi dissolvido em álcool a 96°C, e submetido a cromatografia preparativa em celulose com ácido acético a 2,0%. Os ácidos fenólicos foram separados pelo método de Netienn-Lebreton (mod.) e identificados por cromatografia e métodos espectroscópicos (UV e EM). Determinaram as propriedades antibacterianas dos compostos pela técnica de Kirby & Bauer, usando meio de cultura Müller-Hinton. Utilizaram como indicadores cepas padrão ATCC: Bacillus subtilis 6633, Bacillus megaterium 33085, Bacillus cereus 25923, Pseudomonas aeruginosa 27853, Serratia marcescens 8100, Proteus vulgaris 1331, Escherichia coli 100 e Candida albicans SQ 1580. Das flores de Dithichia viscosa, isolaram o ácido caféico, clorogênico e orcinol. Os ácidos fenólicos apresentaram uma elevada atividade contra todos os microrganismos Gram-positivos

testados, na concentração de 100,0ug/ml, e moderada ação contra Candida albicans a nível de 250,0ug/ml. Quanto aos microrganismos Gram-negativos: Pseudomonas aeruginosa e Escherichia coli, os autores verificaram que os mesmos foram inibidos a uma concentração de 1.000,0ug/ml, enquanto que Serratia marcescens e Proteus vulgaris não foram inibidos por nenhuma das concentrações testadas.

ALMAGBOUL et al. (1988) realizaram a triagem da atividade antimicrobiana de 102 extratos obtidos de 15 espécies de plantas pertencentes a 6 famílias e usadas na medicina popular do Sudão. As plantas, coletadas de diferentes províncias do Sudão, foram extraídas com clorofórmio, metanol e água. Empregaram nesta avaliação 4 bactérias: Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa. Observaram que dos 102 extratos testados, 87 (85,0%) mostraram significante atividade contra todos microrganismos. Em relação às diferentes espécies vegetais, verificaram que, das 15 utilizadas, 14 mostraram atividade contra os indicadores, enquanto que apenas uma planta foi ativa contra as bactérias Gram-negativas e Staphylococcus aureus (Gram-positivo). Dentre os extratos mais ativos, verificaram que os metanólicos exibiram uma pronunciada atividade (38,0%), seguido pelos clorofórmicos (36,0%) e aquosos (26,0%). Entre os vegetais, Anogeissus leicarpus, Vernonia adoensis, Acacia nilotica subs. adansonni e subs. nilotica, Dichrostachys cinera, Jussiaea suffruticosa e Vangueria venosa

foram os que apresentaram maior atividade antibacteriana. A triagem fitoquímica dos extratos revelou a presença de esteróis e/ou terpenos, porém, não foi detectada a presença de antraquinonas. Observaram também que cinco das plantas mais ativas eram ricas em taninos e/ou flavonóides. Por outro lado, detectaram alcalóides em 4 plantas, mas somente em uma delas a concentração foi significante. A planta mais ativa Acacia nilotica subs. nilotica era rica em taninos e continha traços de alcalóides e de glicosídeos cianogênicos.

ARAÚJO et al. (1988) efetuaram a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato metanólico de Coutarea hexandra (Quina-Quina, Quina-do-Brasil, Quina de Pernambuco) nativa na América Central e do Sul, utilizada na medicina popular no combate a processos inflamatórios. Isolaram das cascas do caule uma substância, a 4-arilcumarina, instável, denominada de Celotenina, cujo derivado o 5, 7, 2',5'- tetracetoxi - 4 - fenil - cumarina apresentou acentuado efeito dilatador. Submeteram o extrato metanólico, assim como o segundo composto, a testes in vitro para verificar atividade antimicrobiana. Incluíram, entre os microrganismos indicadores, 2 fungos em forma de levedura, 2 fungos filamentosos, da micoteca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFPB, e 3 cepas de bactérias padrão ATCC. O extrato metanólico foi testado na concentração final de 500,0, 250,0ug/ml, e o segundo composto na concentração de 100,0, 50,0, 25,0, 12,5, 6,2 e 3,1ug/ml solubilizados em

0,6ml de dimetil-sulfóxido (DMSO). O ensaio microbiológico foi realizado pelo método das diluições em meio líquido, Sabouraud para fungos e caldo nutritivo para bactérias, aos quais foram inoculados 0,1ml das suspensões de leveduras e bactérias, respectivamente. O ensaio com fungos filamentosos foi realizado com um fragmento de colônia de 14 dias. Incubaram a 37°C durante 48 para bactérias e 7 - 14 dias à temperatura ambiente para fungos filamentosos. Determinaram também, em meio sólido inclinado, a Concentração Fungicida Mínima (CFM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). O extrato metanólico, na concentração de 500,0ug/ml, apresentou atividade sobre a maioria dos microrganismos indicadores exceto sobre Candida albicans. O segundo composto, na concentração de 12,5ug/ml, inibiu completamente o crescimento de Staphylococcus epidermidis, Cryptococcus neoformans, Trichophyton rubrum, Microsporum canis, Staphylococcus aureus e Bordetella bronchiseptica. Concluíram que tanto o extrato metanólico, quanto o composto, obtidos da Quina-Quina apresentavam atividade fungistática/fungicida e bacteriostática/bactericida.

CHIAPPETA et al. (1988) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos de diferentes partes de Solanum viarum Dunal, coletada em Recife-PE. Desse modo, raízes, caules, folhas, frutos e sementes foram extraídos com acetona, etanol, metanol e clorofórmio. Determinaram a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar pela técnica de disco, utilizando ágar em

camada dupla. Empregaram como indicadores da ação, cepas de Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Mycobacterium smegmatis, Candida albicans e Neurospora crassa. Depois de umedecidos com cada um dos extratos, os discos de 5,0mm de diâmetro eram aplicados sobre a superfície do meio de cultura. Após a incubação a 37°C ou 30°C durante 24 ou 48 horas respectivamente para bactérias e fungos, efetuaram a medida das zonas de inibição em milímetros. Os extratos das diferentes partes da planta demonstraram pronunciada atividade antibacteriana e antifúngica. Enquanto que os de frutos e de sementes foram ativos contra as bactérias Gram-positivas, Gram--negativas, álcool ácido-resistentes e fungos, os de folhas e de raízes não demonstraram atividade contra os microrganismos testados. Por outro lado, os extratos alcoólicos do caule inibiram todos os microrganismos testados, exceto a bactéria, álcool ácido-resistente, Mycobacterium smegmatis.

JAFFER et al. (1988) realizaram triagem fitoquímica e biológica de 20 plantas coletadas no Iraque. Nestes vegetais, pertencentes a 13 famílias, assinalaram a presença de alcalóides, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas. Para a avaliação biológica, submeteram 100,0g de pó das plantas em aparelho de Soxhlet, com etanol a 90,0% e o extrato, evaporado até a secura. Utilizaram como indicadores da ação, as seguintes cepas padrão ATCC: Bacillus subtilis 6633, Candida pseudotropicalis 612; NCTC: Proteus vulgaris 4175, Staphylococcus aureus 8532,

Escherichia coli K 12538, Pseudomonas aeruginosa 6750 e Candida albicans (cepa local). Para a determinação da atividade antimicrobiana, utilizaram culturas em caldo inoculadas, respectivamente, aos meios de cultura Ágar nutriente (MAST) e Ágar sabouraund (Oxoid) para bactérias e fungos, vazados em placas de Petri de 350,0 a 250,0mm. Confeccionaram poços de 10,0mm de diâmetro, com furador de rolha, aos quais adicionaram 0,2ml de cada amostra. A seguir, as placas foram incubadas a 37°C durante 18 horas. O etanol e os outros solventes foram utilizados como controle. Observaram que 11 plantas, apresentando lactonas sesquiterpênicas, foram responsáveis pela atividade antimicrobiana contra Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus e Candida albicans. No entanto nenhuma atividade foi evidenciada contra Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli e Proteus vulgaris, indicando que estas lactonas foram ativas somente contra as bactérias Gram-positivas. Consideraram promissora a atividade antifúngica e antibacteriana das lactonas sesquiterpênicas presentes em Francocuria crispa e Mentha logifolia. Quanto aos extratos etanólicos, não verificaram nenhuma atividade significante.

JAWAD et al. (1988a) avaliaram a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos, frações, alcalóides e lactonas sesquiterpênicas isolados de algumas plantas do Iraque. As plantas foram coletadas na região oeste de Bagdá, em abril de 1986, e as suas partes aéreas secas à temperatura ambiente e

reduzidas a pó. Utilizaram 100,0g do pó das plantas que foram extraídos em aparelho de Soxhlet com etanol a 80,0% até a exaustão, e depois de resfriado, foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida a 50°C. Detectaram a presença de lactonas sesquiterpênicas, utilizando espectroscopia de Infravermelho. A outra parte do extrato etanólico foi dissolvida em etanol a 30,0% /água (100,0ml), acidificada a pH 1-2 e, após evaporação do etanol, extraída com clorofórmio. Após a filtração, ajustaram o pH a 8-9 e extraíram com acetato de etila. Determinaram a atividade antimicrobiana, utilizando como microrganismos indicadores o Bacillus subtilis (ATCC 6633), Staphylococcus aureus (NTCC 8532), Escherichia coli (K 12 10538), Pseudomonas aeruginosa (NTCC 6750), Candida pseudotropicalis (ATCC 612) e Candida albicans (cepa local). O inóculo foi preparado a partir de uma cultura de 24 horas, afim de obter uma concentração final de $1X10^6$cel/ml do meio de cultura, sendo então vazado em placas de 350 X 250mm. Com um furador de rolha, confeccionaram poços de 10,0mm de diâmetro aos quais, adicionaram 0,2ml de cada amostra, e em seguida incubaram a 37°C por 18 horas. Verificaram que 80,0% dos extratos etanólicos não exibiram nenhuma ação antimicrobiana contra os microrganismos testados. Por outro lado, observaram que os alcalóides e lactonas sesquiterpênicas, isolados de frações das plantas estudadas, foram ativos contra as bactérias Gram-positivas assim como leveduras do gênero Candida, e inativos contra os microrganismos Gram-negativos. A fração mais ativa contra Gram-positivas e leveduras foi aquela extraída

de Ammi visnaga e Prosopis farcta. Bacillus subtilis foi mais sensível do que Staphylococcus aureus. Observaram que Ammi visnaga e Prosopis farcta foram as que apresentaram maior espectro de ação, atuando inclusive contra Candida albicans e Candida pseudotropicalis. Da família Convolvulaceae, Convolvulus arvensis forneceu os alcalóides que apresentaram atividade contra os dois Gram-positivos testados, enquanto que as suas lactonas sesquiterpênicas foram ativas somente contra Bacillus subtilis.

Prosseguindo com a pesquisa JAWAD et al. (1988b) reportaram a atividade antimicrobiana dos extratos de Xanthium strumarium da família Compositae. Coletaram as partes aéreas da planta nos arredores de Bagdá-Iraque e prepararam extratos aquosos, metanólicos e acetoetílicos, este último, obtido a partir do extrato metanólico, pela diluição em água seguido pela extração em acetato de etila. Empregaram o método de difusão em ágar para o ensaio da atividade antimicrobiana, utilizando como microrganismos indicadores as cepas: Escherichia coli, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Candida albicans e Candida pseudotropicalis. Após a incubação, os halos de inibição foram anotados em milímetros. Verificaram que o extrato metanólico apresentou atividade antimicrobiana contra Staphylococcus aureus e Bacillus subtilis até a concentração de 0,5mg/ml. As leveduras Candida albicans e Candida pseudotropicalis foram inibidas na concentração de

10,0mg/ml, enquanto que Proteus vulgaris, o foi, à 20,0mg/ml. No entanto, contra Escherichia coli e Pseudomonas aeruginosa, o extrato metanólico não apresentou nenhuma atividade. Quanto ao extrato aquoso, também não observaram qualquer atividade. Do extrato acetoetílico isolaram um sesquiterpeno (xanthanol) que apresentou atividade antimicrobiana similar àquela encontrada no extrato metanólico.

Le GRAND et al. (1988) avaliaram a atividade antimicrobiana de 33 espécies de plantas coletadas na região do Casamance, ao sul do Dakar-Senegal, no período de outubro de 1982 a janeiro de 1983. O material foi seco ao sol logo após a coleta e, do total das amostras, cinco foram conservadas de maneira diferente, uma vez que, na medicina tradicional são utilizadas a fresco. O material seco foi extraído em percolador com etanol a 95,0% na proporção de 10,0ml para cada grama da planta. Os extratos obtidos foram liofilizados ou concentrados sob pressão reduzida à temperatura de 30°C. Os resíduos obtidos foram dissolvidos em água destilada em duas concentrações 50,0 e 5,0mg/ml. O extrato de Voacanga africana foi dissolvido em uma mistura de DMSO/H_2O (1:1) nas mesmas concentrações, ou seja 50,0 e 5,0mg/ml. Utilizaram o método de difusão em ágar (cavidade-placa) frente aos microrganismos cepas padrão de ATCC: Bacillus subtilis (6633), Pseudomonas aeruginosa (9027), Staphylococcus aureus (6538), Escherichia coli (8739), Aspergillus niger (16904), Candida albicans (10235) e as cepas de CBS Trichophyton

mentagrophytes (558.66), Tricophyton rubrum (392.58) e Epidermophyton floccagum (108.67). Em placas de Petri, de 100,0mm de diâmetro com 15,0ml de meio de cultura, confeccionaram 4 poços de 10,0mm de diâmetro aos quais foram adicionados 0,1ml das soluções teste, sendo então incubadas respectivamente a 37°C por 24 hs para as bactérias, e a 27°C por 3-4 dias para os fungos. Dos 43 extratos testados, 28 mostraram atividade contra Bacillus subtilis, 22 contra Staphylococcus aureus e 3 contra Aspergillus niger. Os vegetais Cnestis ferruginea e Voacanga africana foram ativos contra Aspergillus niger nas menores concentrações. Quanto aos dermatófitos, Cnestis ferruginea demonstrou uma notável atividade. Por outro lado, nenhuma das amostras testadas apresentou atividade contra os microrganismos Gram-negativos, assim como contra Candida albicans.

SAKAR et al. (1988) reportaram a atividade antimicrobiana de algumas espécies de Hypericum da Turquia. Hypericum salsuginum Robson et Hub-Mor foi coletada nos arredores do lago salgado, localizado na Anatolia Central, enquanto que, Hypericum orizanifolium Willd e Hypericum lanuginosum var. lanuginosum foram coletadas na Província de Afyonkarahisar e na montanha Taurus-Província de Icel. As folhas e flores foram coletadas durante o verão de 1985. Utilizaram 5,0g do material seco pulverizado, que foram extraídos em aparelho de Soxhlet sucessivamente com 200,0ml de clorofórmio (extrato-1), 200,0ml de acetato de etila (extrato-2) e 200,0ml de etanol a 95,0%

(extrato-3). Em um 2º experimento, realizaram a extração com clorofórmio seguido de acetona (extrato-4) e etanol a 95,0% (extrato-5). No 3º experimento, a extração foi feita com acetona (extrato-6), enquanto que no 4º e último experimento, extraíram com etanol (extrato-7). Determinaram a atividade antimicrobiana pelo método do disco, utilizando os meios de cultura Ágar extrato de malte (Difco) para fungos e Ágar nutriente (Difco) para os outros microrganismos. Utilizaram como indicadores as culturas de Candida utilis (LA 991), Mycobacterium smegmatis (NRRLB 612), Micrococcus luteus (La 2971), Staphylococcus aureus (6038p), Bacillus subtilis (La 2114), Escherichia coli, Salmonella typhimurium NRRLB 4420 e Pseudomonas aeruginosa (La 2776). Os discos, com 6,0mm de diâmetro, foram emebebidos com 0,02ml de cada um dos extratos e, depois de secos, foram aplicados sobre a superfície do meio de cultura. Após a incubação das placas a 37°C por 24hs, o halo de inibição era medido em milímetros. Foram considerados ativos os extratos que apresentaram halos de inibição igual ou superior a 8,0mm. Vários extratos de Hypericum salsugineum e Hypericum origanifolium exibiram atividade contra todos os microrganismos utilizados. Os extratos de Hypericum lanuginosum var. lanuginosum demonstraram atividade contra todas as bactérias Gram-positivas assim como contra Mycobacterium smegmatis e Candida utilis. Já a Pseudomonas aeruginosa foi inibida apenas pelo extrato clorofórmico de Hypericum salsuginum assim como pelo extrato acetatoetílico de Hypericum orgiganifolium.

ODELOLA & OKOROSOBO (1988) avaliaram a atividade antimicrobiana in vitro de espécies Nigerianas de Diospyros contra 21 cepas de microrganismos indicadores pertencentes a 8 gêneros, dos quais 19 bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e 2 fungos (um filamentoso e uma levedura). As folhas de Diospyros bateri e de Diospyros monbutensis foram coletadas no Jardim botânico da Universidade de Ibadan (Nigeria), durante a estação de chuva (abril-junho), e depois de secas, foram pulverizadas e extraídas em aparelho de Soxhlet, com água ou metanol. Utilizaram os meios de cultura caldo nutriente nº2 pH 7,4 (Oxoid) e Ágar nutriente pH 7,4 (Mast) para bactérias e ágar Sabouraud dextrose pH 5,4 (Oxoid) para fungos. Com auxílio de um furador de rolha, confeccionaram poços, aos quais preenchiam-se com as amostras. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos após a incubação a 37°C por 24 hs (bactérias) e, a 25°C por 3 dias (fungos). Realizaram testes fitoquímicos nos extratos aquosos para pesquisar açúcares, proteínas, glicosídeos, óleos volatéis, saponinas e taninos. Notaram que o extrato aquoso (pH 4,7) de Diospyros bateri apresentava cor roxa-escura enquanto que Diospyros monbuttensis apresentava pH 5,3 e cor marron--escura. Os extratos metanólicos de Diospyros bateri e Diospyros monbuttensis apresentaram pH 5,9 e 6,1, respectivamente. Observaram que a atividade antimicrobiana de todos os extratos era independentes do pH. O aquoso de Diospyros monbuttensis não mostrou atividade contra os organismos testes, enquanto o metanólico apresentou contra todas as cepas de todos os gêneros

de bactérias e uma das 8 cepas de Pseudomonas aeruginosa. Por outro lado, o extrato aquoso de Diospyros bateri foi ativo para todas as bactérias testadas, inclusive Pseudomanas aeruginosa, enquanto o metanólico não apresentou atividade contra as 8 das cepas de Pseudomonas aeruginosa. Os extratos de Diospyros spp não apresentaram atividade contra a Candida albicans e Aspergillus niger. Demonstraram, então, que a atividade antimicrobiana de Diospyros bateri era maior do que a Diospyros monbuttensis. Verificaram a presença de saponinas e taninos em ambos os extratos e acreditaram que a ocorrência de tanino hidrosolúvel no extrato de Diospyros bateri foi responsável pela elevada atividade antibacteriana, uma vez que o tanino é uma substância fenólica. Observaram também, que a atividade dessas plantas é sazonal, uma vez que os extratos obtidos durante a estação da seca não apresentaram nenhuma ação.

MUBARAK et al. (1988) determinaram a atividade antimicrobiana do extrato de Pteropyrum aucheri (Polygonaceae) usada sob a forma de pasta, pela população iraquiana, para o tratamento de injúrias. Coletaram a planta no distrito de Jezire-Iraque no mês de outubro. Depois de moído, o caule foi extraído com éter de petróleo a 40 - 60°C em aparelho Soxhlet e evaporado. O resíduo foi extraído com água, concentrado, filtrado, evaporado e seco (extrato M). Utilizaram como microrganismos indicadores as cepas padrão de NCTC: Escherichia coli 10418, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis 10900 e Micrococcus luteus 8390. Alíquotas de 1,0ml dos inóculos foram adicionados ao Ágar nutriente à cerca de 55°C e distribuídos em

placas de 90,0mm de diâmetro. Em seguida, confeccionaram poços com 5,0mm de diâmetro, onde foram aplicados os extratos aquosos (M). Determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método da diluição em caldo, adicionando alíquotas de 2,0ml de diluições conhecidas do extrato M a 2,0ml do caldo nutriente em concentração dupla, homogeneizado e inoculado com os microrganismos Escherichia coli e Staphylococcus aureus. Também efetuaram o teste microbiológico pelo método de cilindro, utilizando o extrato M nas concentrações de 7,3, 3,5 e 1,82mg/ml. Verificaram que a concentração inibitória mínima foi de 0,40mg/ml contra Escherichia coli e de 1,2mg/ml contra Staphylococcus aureus, enquanto que, o extrato aquoso apresentou uma significante atividade contra organismos patogênicos, quando a ação antimicrobiana foi verificada pelo método de cilindro. Esses dados sugerem, portanto, que o extrato M contém um potente antimicrobiano.

MAHMOUD et al. (1989) avaliaram a atividade antimicrobiana de Salsola rosmarinus e Adiantum capillus-veneris colhidas, a oeste de Bagdá-Iraque, no mês de abril. Assim, após a secagem e pulverização, 50,0g das partes aéreas de Salsola rosmarinus foram extraídos, com éter de petróleo (40 - 60°C), clorofórmio, etanol a 80,0% e água destilada, consecutivamente, usando aparelho de Soxhlet. Em relação à Adiantum capillus-veneris, utilizaram cerca de 20,0g de pó de suas partes aéreas, que foram extraídos com metanol por 24 horas, usando aparelho de Soxhlet.

Para os ensaios microbiológicos, utilizaram os seguintes microrganismos: Bacillus subtilis ATCC 6633, Escherichia coli K12 NCTC 10538, Pseudomonas aeruginosa NCTC 6750, Proteus vulgaris NCTC 4175, Staphylococcus aureus NCTC 8532, Candida pseudotropicalis ATCC C12 e Candida albicans, isolada de material clínico. Após a inoculação dos microrganismos indicadores em Ágar nutriente, confeccionaram poços de 10,0mm de diâmetro, com auxílio de um furador de rolha estéril. Adicionaram em cada cavidade, alíquotas de 0,2ml de cada amostra e, depois de incubadas a 37°C, durante 18 horas, os resultados foram anotados em milímetros. A concentração inibitória mínima contra Escherichia coli e Staphylococcus aureus, representantes de microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos, foi determinada pelo método de diluição em caldo. O extrato aquoso de Salsola rosmarinus não exibiu nenhuma atividade antimicrobiana. Entretanto, os extratos brutos, obtidos a partir dos diferentes solventes orgânicos, na concentração de 20,0mg/ml, apresentaram atividade contra Bacillus subtilis, Proteus vulgaris e Staphylococcus aureus, enquanto que os demais microrganismos foram resistentes. O extrato metanólico de Adiantum capillus-veneris apresentou atividade, na concentração de 2,0mg/ml, contra todos os indicadores, inclusive contra as duas cepas de fungos. No entanto, na concentração de 1,0mg, foi ativo somente contra Escherichia coli, Bacillus subtilis e Staphylococcus aureus. A concentração inibitória mínima (CIM) de Adiantum capillus-veneris para Escherichia coli foi de 250,0ug/ml

enquanto que para Staphylococcus aureus foi de 300,0ug/ml. Em relação à Salsola rosmarinus, verificaram que para Staphylococcus aureus, a CIM foi de 100,0ug/ml. Com base na atividade exibida pelos extratos vegetais na concentração de 2,0mg/ml, os autores consideraram esses resultados promissores.

SAEKI et al. (1989) verificaram a ação antimicrobiana de 15 substâncias naturais, assim como a do Hinokitiol, lisozima da clara do ovo, extrato de Mosla chinensis e extratos de especiarias e de ervas contra bactérias orais. Empregaram como microrganismos indicadores 27 espécies de bactérias cepas padrão ATCC, normalmente isolados da cavidade bucal. Utilizaram o meio de cultura Ágar tripticase soja (TSA - BBL), adicionado com 5,0ug/ml de hemina, 0,5ug/ml de menadione e 10,0% de sangue desfibrinado de cavalo. Após sua solubilização, em pequena quantidade de etanol, as substâncias naturais foram adicionadas ao meio TSA e vazadas assepticamente em placas de Petri. As cepas de cada uma das espécies microbianas em TSA foram então incubadas em caldo Tripticase soja (TSB) e aplicadas com inoculador múltiplo em placas de TSA, adicionadas com as substâncias naturais. As placas foram incubadas por 4 dias a 37°C em uma atmosfera de 10,0% CO_2, 10,0% H_2 e 80,0% N_2. Quanto ao Hinokitiol e ao extrato de Mosla chinensis, os autores observaram que, quando empregados na concentração de 0,1%, ocorreu a inibição de todos os microrganismos indicadores. Mesmo na concentração de 0,01%, o Hinokitiol inibiu o crescimento de 15

das 27 espécies microbianas testadas. Por sua vez, a lisozima na concentração de 0,1% inibiu o crescimento de Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides sp e Capnocytophaga sp. A saponina de soja e ácido tânico, ambos na concentração de 0,1%, foram responsáveis pela inibição de 4 e 3 espécies de Bacteroides sp, respectivamente. Entretanto, nenhuma ação antimicrobiana foi verificada com flavonóides de chá verde ou de chá preto, clorofila ou protamina a 1,0%. Dos 9 produtos naturais testados, o Hinokitiol apresentou a maior ação inibitória. Entre os extratos de especiarias e ervas, o óleo de canela mostrou elevada ação contra os microrganismos orais. O óleo de hortelã-pimenta inibiu o crescimento de muitas bactérias Gram-positivas na concentração de 0,1%. Na concentração de 0,1% o aldeído cinâmico (canela), cristais de timol, mentol e eugenol também inibiram as bactérias bucais testadas. Concluíram que a atividade antimicrobiana contra as bactérias periodontopatogênicas era relativamente baixa.

UJIKAWA & PURCHIO (1989) determinaram a atividade antimicrobiana dos extratos e frações obtidas das folhas de Agave sisalina (sisal), colhidas no Jardim do Instituto de biociências da USP, SP., contra 6 fungos filamentosos e 4 fungos em forma de levedura. O suco do sisal foi obtido por moenda de cana manual, filtrado em algodão e em seguida submetido à extração com os seguintes solventes: éter de petróleo, éter etílico, clorofórmio, butanol, metanol e água. Utilizaram, como microrganismos

indicadores, as cepas de Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus, Candida albicans, Cryptococcus neoformans, Rodhotorula glutinis, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Crebrothecium ashbyi, Penicillium chrysogenum e Saccharomyces cerevisiae da micoteca do ICB-USP e da FCFA-UNESP. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela técnica de difusão em ágar (métodos do poço e disco), e também determinada a concentração inibitória mínima (CIM). Assim, cerca de 10,0ul de cada extrato, bem como os extratos concentrados a 10,0% foram aplicados em discos de papel de 6,3mm de diâmetro. Verificaram que o n-butanol era um bom solvente da substância ativa, sendo portanto utilizado para a extração. As substâncias foram isoladas por cromatografia em coluna de sílica-gel 70 - 80 mesh e caracterizadas em camada delgada, denominadas de sisalinas B e D - glicosídeos. Notaram que a atividade antimicrobiana do suco das folhas de sisal foi pronunciada contra Cryptococcus neoformans, Crebrothecium ashbyi e Saccharomyces cerevisiae e menos ativa contra Penicillium chrysogenum, Aspergillus flavus e Aspergillus oryzae. Verificaram que a atividade antimicrobiana da planta era devido à presença de sisalamina complexa, constituída de 7 glicosídeos designados por sisalaminas A até G. A CIM de sisalaminas complexas foi apenas 12ppm para Saccharomyces cerevisiae, 50 para Candida albicans, 100 para Aspergillus flavus, Aspergillus oryzae, Aspergillus parasiticus e Rhodotorula glutinis e de 1.600 para Aspergillus niger. Concluíram que a fração B, ou seja, sisalamina B é cerca de 4 vezes mais ativa que

a D na inibição de Saccharomyces cerevisiae e a sua ação em pH neutro, ao contrário de outros fungistáticos de uso corrente que requerem pH ácido.

GRANGE & DAVEY (1990) reportaram as propriedades antimicrobianas do extrato etanólico do própolis frente a 21 espécies bacterianas. Determinaram a concentração bactericida mínima (CBM) pelo método das diluições em caldo nutriente, na diluição de 1:20, acrescido de uma gota das suspensões bacterianas. A CBM do própolis para Mycobacterium tuberculosis foi determinada com uma diluição de 1:20 em Ágar Middebrook-Dubos 7H11. Demonstraram que o própolis foi mais ativo para as bactérias Gram-positivas do que para as Gram-negativas. Observaram que o própolis apresentou uma ação bactericida para Bacillus cereus e cocos Gram-positivos na diluição de 1:160 e 1:320, respectivamente. Em relação a Mycobacterium tuberculosis verificaram que na diluição de 1:320 foi totalmente inibido e parcialmente a 1:640. A natureza dos componetes antimicrobianos do própolis não foi ainda elucidada, havendo entretanto evidências de que sejam flavonóides.

SANTOS Filho et al. (1990) verificaram a atividade antibacteriana de 301 extratos obtidos de 120 espécies vegetais brasileiras pertencentes a 28 famílias, contra Staphylococcus aureus (ATCC 6538p) e Pseudomonas aeruginosa (ATCC 10145) representante dos microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, respectivamente. As plantas foram coletadas em regiões menos

desenvolvidas dos Estados de Minas Gerais, Paraná e São Paulo. Os vegetais, após secos e pulverizados, foram extraídos com solventes orgânicos de diferentes polaridades: hexano, hexano--acetato de etila a 20,0%, acetato de etila, etanol e metanol, sendo depois eliminados sob pressão reduzida. Os microrganismos foram mantidos em Ágar nutriente e o inóculo, obtido em caldo Müller-Hinton (Difco). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método do disco em meio de cultura Ágar Müller-Hinton (Difco). Os discos de 5,0mm de diâmetro foram impregnados com os extratos na concentração de 50,0mg/ml e colocados em estufa ventilada (37°C), até a secagem. Este processo foi repetido por 3 vezes. Em cada placa foram aplicados 6 discos com os extratos e um disco controle com o respectivo solvente. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas e considerados ativos os extratos que apresentaram diâmetro do halo de inibição superior a 7,0mm. Dos 301 extratos vegetais testados, 87 foram ativos contra Staphylococcus aureus, enquanto que apenas 5 inibiram Pseudomonas aeruginosa. Apenas os extratos de Schinus terebinthifolium foram ativos tanto para Staphylococcus aureus quanto Pseudomonas aeruginosa. Dentre os extratos que inibiram o desenvolvimento de Stahylococcus aureus, 50 apresentaram halos iguais ou superiores a 8,0mm de diâmetro. Desses, 19 (38,0%) foram obtidos com acetato de etila, 11 (22,0%) com hexano, 11 (22,0%) com a mistura hexano-acetato de etila 20,0%, 8 (16,0%) com etanol e 1 (2,0%) com metanol. Concluíram que o acetato de etila foi o solvente mais adequado para a obtenção dos extratos.

Por outro lado, verificaram que tanto o extrato etanólico quanto o hexano-acetato de etila a 20,0% das partes aéreas de Jaquemontia velutina (Charsy) não apresentaram nenhuma atividade contra as cepas indicadoras.

HORIBA et al. (1991) investigaram a ação antibacteriana e bactericida de extratos de chá verde japonês e do chá verde normal, obtidos comercialmente, contra 24 espécies microbianas isoladas de canais radiculares infectados, sendo 8 microrganismos facultativos e 16 anaeróbios estritos. As folhas dos chás eram suspensas em salina fosfatada tamponada (PBS) na concentração de 20,0, 10,0 e 5,0% (p/v). As suspensões foram mantidas em banho-maria, a 25°C, durante 3 horas, com agitação constante (60 vezes por minuto) e, depois de filtradas em gaze o pH era ajustado a 7,0 com NaOH 2,5M ou HCl 2,7M. Para avaliação da ação antimicrobiana, utilizaram o meio de cultura Ágar Müller-Hinton (Difco) semeados com 0,1ml de cada uma das bactérias indicadoras. Confeccionaram cavidades com 8,0mm de diâmetro às quais adicionaram 0,1ml dos extratos de chá. As placas, inoculadas com os microrganismos facultativos, foram incubadas a 37°C durante 48 horas enquanto que as dos anaeróbios obrigatórios foram incubadas a 37°C por 5 dias, em jarras de anaerobiose (Labline). A seguir, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado. A ação bactericida foi determinada em meio de cultura para bactérias anaeróbias (ABCM). Para esse fim, volumes de 0,5ml da suspensão bacteriana, em caldo ABCM, em

concentração dupla, eram adicionados a 5,0ml dos extratos dos chás a 20,0% e após a homogeneização, incubados em aerobiose ou anaerobiose a 37°C, durante 24 horas. A seguir, 0,1ml da mistura era inoculado em ágar ABCM e as culturas incubadas a 37°C, respectivamente, por 48 horas para os facultativos e, 5 dias para os anaeróbios, sendo então realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os extratos do chá refinado, normal, grosso e torrado, demonstraram ação antibacteriana contra 12, 10, 8 e 8 das 24 espécies, respectivamente. As espécies de Staphylococcus e Eubacterium testadas demonstraram sensibilidade para todos os quatro extratos de chás, enquanto, as espécies de Actinomyces e Lactobacillus, Streptococcus intermedius, Peptococcus mugnus e Bacteroides intermedius, assim como 2 espécies de Peptostreptococcus não demonstraram nenhuma sensibilidade aos extratos. Todos os extratos apresentaram ação bactericida contra Streptococcus mutans, Lactobacillus casei e Propionibacterium acnes e 8 espécies foram completamente inibidas por todos os chás. O chá refinado, normal, grosso e torrado inibiu completamente o crescimento de Bacteroides intermedius, Eubacterium limosum, Bacteroides intermedius e Eubacterium limosum, respectivamente. Concluíram que os extratos de chá verde japonês poderiam ser utéis no tratamento de canais radiculares infectados.

KUBO & HIMEJIMA (1991) avaliaram a atividade de extratos, frações e substâncias delas isoladas das sementes de Pimpinella anisum. Utilizaram 188,0g de sementes de erva doce, adquiridas em Belém do Pará, Brasil (identificadas por van der Berg do Museu Emilio Goeldi, Belém, Pa - Brasil); extraíram com metanol à temperatura ambiente e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O extrato obtido foi suspenso em água e particionado com hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Utilizaram como indicadores, 13 microrganismos (8 bactérias e 5 fungos) cepas padrão de ATCC. As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente e os fungos, em caldo cérebro e coração, e utilizaram caldo extrato de malte, caldo extrato acrescido de 0,1% de oléo de milho. Realizaram os ensaios, em meio líquido, pelo método de diluição seriada, sendo as substâncias dissolvidas em dimetilformamida e então 30ul adicionados a 3,0ml do meio de cultura e finalmente, 30ul das culturas microbianas. Após 2 a 5 dias, observaram o crescimento microbiano a 660nm. A menor concentração, na qual não houve crescimento, foi considerada como a CIM. Das substâncias isoladas, apenas anethole exibiu atividade contra algumas bactérias e fungos. A CIM para Propionibacterium acnes foi de 100,0ug/ml e de 200,0ug/ml para Streptococcus mutans e Escherichia coli. No que diz respeito a fungos, notaram que a CIM foi de 200,0ug/ml para Candida albicans e Saccharomyces cerevisiae e de 100,0ug/ml para Pityrosporum ovale. Observaram também que, quando associavam anethole a polygodial, aumentava a atividade anticrobiana de anethole (100,0ug/ml) contra Candida

albicans, Saccharomyces cerevisiae e havia pequeno aumento para Pityrosporum ovale. Associaram, anethole com anfotericina B, entretanto, o aumento foi menos significativo do que a associação anethole-polygodial. Concluíram que o aumento da atividade biológica, pela associação de 2 ou mais substâncias, isoladas de condimentos comuns, proporciona novas abordagens no controle de fungos patogênicos oportunistas.

Dando continuidade ao estudo, KUBO et al. (1992) avaliaram a atividade antimicrobiana de 11 componentes voláteis de chá verde. Dos 11, apenas a cafeína foi obtida de folhas de Ilex paraguayensis (chá mate) e o restante, obtidos comercialmente. Utilizaram como indicadores, 13 microrganismos (8 bactérias e 5 fungos), cepas padrão de ATCC. Determinaram a atividade pelo método de diluição seriada em meio líquido de acordo com KUBO & HIMEJIMA (1991). Dos compostos testados, o mais ativo contra Streptococcus mutans foi nerolidol (25,0ug/ml) e o menos ativo linolol (1.600,0ug/ml), enquanto a cafeína não demonstrou nenhuma atividade contra o Streptococcus mutans a 400,0ug/ml. Ao associarem alcoóis terpênicos (linalol, geraniol e nerolidol) ao indol (400,0ug/ml) verificaram que a atividade contra Streptococcus mutans e Propionibacterium acnes não foi significante, ao contrário de δ-cadineno, que diminuiu sua CIM de 800,0 para 6,25ug/ml e cariofileno de > 1.600,0 para 6,25ug/ml. Entre os microrganismos testados, Propionibacterium acnes foi o mais sensível, com CIM entre 3,13 e 400,0ug/ml. Os

compostos mais ativos contra **Propionibacterium acnes** foram δ- cadineno e cariofileno e nenhum aumento significativo na atividade foi observado quando associaram estes compostos ao indol. Quanto aos fungos, observaram que **Trichophyton mentagrophytes** era mais sensível, sendo inibido por nerolidol (12,5ug/ml) e β-ionono ((50,0ug/ml) e os demais componentes entre 50,0 e 200,0ug/ml. Concluíram que os componentes de chá podem ser considerados agentes antimicrobianos em potencial para cosméticos e alimentos.

HEISEY & GORHAM (1992) avaliaram a atividade antimicrobiana de 60 extratos obtidos de 54 vegetais, conhecidos por sua ação inibidora sobre insetos, plantas e outros organismos, assim como, por suas propriedades tóxicas. As plantas foram coletadas em Nova Iorque, Pensilvânia e California, EUA. As partes, raízes, caules, folhas e frutos foram extraídas com uma mistura de metanol/diclorometano (1:1) na proporção de 1:10(g/ml) enquanto que as sementes foram extraídas com metanol/diclorometano e 5,0% em água deionizada, na proporção de 1:5. A atividade antimicrobiana foi detectada pelo método de Kirby & Bauer frente a 16 microrganismos indicadores: 8 bactérias e 8 fungos. Utilizaram como meio de cultura, Ágar Müeller-Hinton, para bactérias, exceto para **Streptococcus mutans** para o qual foi utilizado o Ágar Infusão de Cérebro e Coração. Para os fungos, foi empregado o Ágar extrato de malte. Para tal finalidade, discos de 7,0mm de diâmetro, impregnados com os extratos, secos e

pesados, eram aplicados na superfície das placas e incubados a 37°C e 28°C para bactérias e fungos, respectivamente. Verificaram que dos 60 extratos testados, 15 foram ativos contra um ou mais microrganismos, e que as bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis do que as Gram-negativas. Das espécies fúngicas, Trichophyton rubrum foi o mais sensível, inibido por 4 vegetais, seguido por Candida albicans, inibida por apenas 2 plantas. Juglans nigra foi a espécie mais ativa, sendo inativa apenas contra Streptococcus mutans e Streptococcus salivarius.

III. PROPOSIÇÃO

De acordo com NAQVI et al.(1985), as plantas constituem uma fonte de compostos medicinais de inegável importância para a terapêutica clínica e portanto, o estudo sobre a fitoquímica, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA e farmacológica das plantas é o único desafio para encontrarmos novas fontes de medicamentos.

Assim, levando em conta a necessidade de se pesquisar novas substâncias antimicrobianas, as informações fornecidas pela população usuária de plantas medicinais e considerando a literatura consultada, propomos: avaliar a ação antimicrobiana in vitro dos extratos brutos de algumas espécies de Ipomoea, em em especial a I. cairica, frente a diferentes microrganismos.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. APARELHAGEM E MATERIAIS UTILIZADOS

4.1.1. Estufa

Estufa com corrente de ar quente (60°C) FABBE Mod. 170 para secagem e estabilização do material botânico.

4.1.2. Moinho

Após estabilizados, os vegetais foram triturados até pó fino, em moinho de facas SIEMSEN (3.500 rpm) com 30,0Lts de capacidade.

4.1.3. Percolador

Os vegetais triturados foram extraídos em percoladores de aço inoxidável FABBE com 40,0Lts de capacidade

4.1.4. Evaporadores Rotatórios

Os solventes orgânicos utilizados na obtenção dos extratos foram eliminados com auxílio de evaporador rotatório MARCONI TE 175 com 10,0Lts de capacidade, sob pressão reduzida. Aqueles outros utilizados no fracionamento dos extratos e no isolamento das substâncias foram eliminados em evaporador BÜCHI ROTAVAPOR RE 120, sob pressão reduzida com 2,0Lts de capacidade.

4.1.5. Liofilizador

Para a eliminação da água utilizada na obtenção dos extratos, foi utilizado o liofilizador (Edwards), com unidade de pré-congelamento acoplada, do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

4.1.6. Placas Cromatográficas, Adsorventes e Reveladores

Para as análises cromatográficas em camada delgada comparativa (CCDC), sobre placas de vidro desengorduradas e secas de 5, 10 ou 20 X 20cm, foram aplicadas, por meio de espalhador Desaga, camadas de 0,25mm de espessura de suspensão de sílica gel 60 GF_{254} (Merck) em água destilada na proporção de 1:2 (p/v). Em seguida, as placas eram secas à temperatura ambiente e ativadas em estufa a 105°C durante 2 horas.

Amostras dos extratos, frações e substâncias obtidas foram dissolvidas em solventes orgânicos apropriados e, por meio de tubo capilar, aplicadas às placas em pontos de 1,5cm acima da base inferior, 2,0cm das laterais e 1,0cm entre eles.

As cromatoplacas foram então colocadas em cubas cromatográficas, previamente saturadas com o eluente, e desenvolvidas à temperatura ambiente (25°C). Depois do eluente ter percorrido 15,0cm a partir dos pontos onde as amostras foram aplicadas, as placas eram retiradas das cubas, secas em corrente de ar quente e, em seguida, observadas sob luz

ultravioleta MINERALIGHT Mod. UV GL-25 254/366nm e as manchas assinaladas. Quando necessário, foram reveladas com vapores de iodo ressublimado (Merck) e vapores de ácido fosfórico a 20,0%, seguido de aquecimento da cromatoplaca em chapa a 110°C por cerca de um minuto.

Para a análise cromatográfica de alcalóides, utilizou-se como revelador o Reagente de Moraes & Palma (SANTOS Filho, 1969). Esse reagente era pulverizado nas cromatoplacas e a presença de alcalóides era evidenciada pelo aparecimento de manchas de coloração vermelha.

Para as separações cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP), foi aplicada sobre placas de vidro de 20 X 20cm uma suspensão de sílica gel 60 PF_{254} (Merck), em água destilada na proporção de 1:2 (p/v), por meio de espalhador Desaga, camadas com uma espessura de 1,0mm. Em seguida, as placas eram secas à temperatura ambiente e ativadas a 105°C durante 2 horas.

Em seguida, amostras dos produtos naturais (no máximo 20,0mg), dissolvidas em metanol PA (Merck), foram depositadas por meio de aplicadores, sobre uma linha a 2,0cm da base inferior das cromatoplacas e colocadas em cubas cromatográficas previamente saturadas com eluente apropriado. Depois deste eluente percorrer 15,0cm da linha de partida, as cromatoplacas foram retiradas, secas com corrente de ar quente e observadas.

A revelação das cromatoplacas utilizadas nas diversas análises foi realizada por meio de irradiação com luz UV 254-366nm. As manchas, em forma de faixas horizontais, eram localizadas, demarcadas com estilete e desta maneira, os componentes das misturas eram retirados e separadamente recuperados por eluição com solvente apropriado.

4.1.7. Colunas Cromatográficas e Adsorventes

Para a cromatografia de adsorção em coluna (CAC) foram utilizadas colunas de vidro de várias dimensões, desengorduradas e secas, fixadas na vertical. Na base do cone de vidro, colocava-se um chumaço de algodão, com a finalidade de evitar a passagem do adsorvente para o frasco coletor de frações. O adsorvente, suspenção de sílica gel 60 (70-230 Mesh, Merck) em hexano e em quantidade necessária, era introduzido pelo alto da coluna. O excesso de solvente era retirado e a mistura, a ser fracionada, depositada na superfície superior da coluna de adsorção. As substâncias da mistura foram eluídas por solventes ou misturas de solventes e o eluido recebido em frascos numerados em seqüência, sempre em volume pré-fixado.

Para a cromatografia em coluna filtrante (CCF), sob pressão reduzida, foi utilizada uma coluna de vidro (Millipore), com 300,0ml de capacidade, acoplada a um sistema a vácuo. Como adsorvente utilizou-se sílica gel 60 (230-400 Mesh, Merck).

Para a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram utilizadas colunas cromatográficas analítica e preparativa de Si-60 (10,0um) da Perkin-Elmer.

Os solventes orgânicos, ou mistura destes, empregados como eluentes, eram produtos comerciais destilados ou que apresentavam grau de pureza pró-análise da marca Merck e Reagen.

4.1.8. Espectrofotômetro de Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados em espectrofotômetro Perkin-Elmer Mod. 1420 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. As amostras dos materiais analisados foram misturadas a brometo de potássio (KBr) anidro até a obtenção de pastilhas transparentes, ou sob a forma de filme entre duas placas de cloreto de sódio (NaCl) anidro. Os espectros foram calibrados com filme de poliestireno, utilizando-se banda a 1601,4cm^{-1} como referência.

4.1.9. Espectrofotômetro de Ultravioleta

Os espectros na região do ultravioleta (UV) foram registrados em espectrofotômetro Beckman Mod. DU70.0 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As amostras analisadas foram dissolvidas em metanol (Riedel) grau espectroscópico.

4.1.10. Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear Protônica (RMN ^{+}H) foram registrados em espectrômetro Bruker Ac-80 operando a 80 MHz, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Para obtenção desses espectros, utilizou-se $CDCl_3$ como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos foram apresentados em unidades (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (RMN ^{13}C foram registrados em espectrômetro Bruker Ac-80 operando a 20 MHz, do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Os espectros foram registrados com as amostras dissolvidas em $CDCl_3$.

4.1.11. Espectrômetro de Massa

Os espectros de massa (EM) foram obtidos em espectrômetro HP 5908A por injeção direta da amostra, realizados no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.1.12. Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência

A separação da substância SP-2 em cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada em cromatográfo líquido Perkin-Elmer série 3B, acoplado a detector de UV/vísivel Perkin--Elmer LC 85B e integrador HP 3396A do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.2. OBTENÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS

4.2.1. Coleta e Identificação dos Vegetais

Foram estudadas as seguintes espécies de Convolvulaceae: Ipomoea cairica (L.) Sweet, Ipomoea pes-caprae (L.) Sweet e Ipomoea phyllomega (Vell.) House.

I. pes-caprae e I. phyllomega foram coletadas em abril de 1989, na Ilha do Cardoso, litoral sul do Estado de São Paulo e I. cairica em abril de 1989 e em setembro de 1990, na periferia da cidade de Ribeirão Preto, ao norte do Estado de São Paulo. Foram identificadas no Instituto de Biologia da Universidade de Campinas, UNICAMP, pelo Prof. Dr. Hermógenes de Freitas Leitão Filho e as exsicatas depositadas no Herbário desse Instituto.

4.2.2. Secagem e Moagem dos Vegetais Coletados

As partes aéreas dos vegetais colhidos foram submetidas à secagem em estufa com ar seco circulante a 40°C até peso constante, e pulverizadas em moinho de facas.

4.2.3. Obtenção dos Extratos Brutos

Os pós, assim obtidos, foram extraídos por percolação e maceração segundo BURAS et al. (1986).

4.2.3.1. Percolação

Cerca de 500,0g dos vegetais triturados (I. cairica, I. pes-caprae e I. phyllomega) foram colocados em percoladores e esgotados sucessivamente, à temperatura ambiente, com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e etanol) e água destilada. As soluções obtidas foram filtradas em papel de filtro e os solventes orgânicos, eliminados com o auxílio de evaporador rotatório sob pressão reduzida, enquanto que a água foi eliminada por liofilização.

4.2.3.2. Maceração

Cerca de 500,0g do pó de cada uma das espécies foram divididos em 4 alíquotas, colocados em Erlenmeyer e extraídos com hexano, acetato de etila e etanol à temperatura de 40°C em banho-maria durante 10 minutos. Os macerados foram filtrados com papel de filtro e os solventes, eliminados em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

4.2.4. Obtenção do Extrato Acetatoetílico de Ipomoea cairica

As partes aéreas de Ipomoea cairica foram submetidas à secagem e trituração conforme descrito no ítem 4.2.2. Desse modo, 5,0kg do pó foram colocados em percoladores de aço e submetidos a extrações à temperatura ambiente, com acetato de etila. As soluções foram reunidas, filtradas em papel de

filtro, e o acetato de etila eliminado em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Obtendo-se o extrato bruto acetatoetílico.

4.2.5. Partição do Extrato Acetatoetílico de Ipomoea cairica

Para tal finalidade, 500,0g do extrato acetatoetílico de I. cairica foram ressuspensos em uma solução de metanol - água (19:1) e lavados com hexano e com clorofórmio. Após a eliminação dos solventes em evaporador sob pressão reduzida, obteveram-se as frações: hexânica, clorofórmica e aquosa (Tabela 3).

TABELA 3: Frações obtidas da partição do Extrato Acetatoetílico.

FRAÇÃO	MASSA (g)
Hexânica	170,0
Clorofórmica	86,0
Aquosa	42,0

4.2.6. Fracionamento da Fração Clorofórmica

Para esse objetivo, 86,0g da fração clorofórmica foram submetidos à cromatografia em coluna filtrante sob pressão reduzida (CCF), utilizando-se 100,0g de sílica gel 60 como material filtrante e os seguintes solventes em ordem crescente

de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol como eluente (Tabela 4).

TABELA 4: Frações Obtidas da Cromatografia em Coluna Filtrante (CCFPR) da fração clorofórmica.

FRAÇÃO	MASSA (g)
Hexânica	1,0
Diclorometânica	42,0
Acetato etila	19,0
Etanólica	10,0

4.2.7. Fracionamento da Fração Diclorometânica por Cromatografia de Adsorção em Coluna (CAC)

Em uma coluna cromatográfica, de 1,0m de altura e 0,70cm de diâmetro, introduziu-se uma suspensão de 800,0g de sílica gel 60. A seguir, 42,0g da fração diclorometânica foram depositados sobre a coluna adsorvente e eluídos com solventes e mistura de solventes em ordem crescente de polaridade (Tabela 5).

TABELA 5: Fracões obtidas da Cromatografia de Adsorção em Coluna.

ELUENTE	MISTURA	FRAÇÕES	MASSA(g)
Hex/Acoet	3:7	1(01 - 15)	0,06
Hex/Acoet	3:7	2(16 - 22)	0,09
Hex/Acoet	3:7	3(23 - 28)	0,15
Hex/Acoet	3:7	4(29 - 32)	0,30
Hex/Acoet	3:7	5(33 - 40)	14,50
Hex/Acoet	3:7	6(41 - 52)	12,90
Hex/Acoet	3:7	7(53 - 75)	3,10
Acoet		8(76 - 87)	0,20
Acoet		9(88 - 96)	0,20
Acoet/EtOH	8:2	10(97 - 102)	0,08
Acoet/EtOH	8:2	11(103 - 107)	0,07
EtOH		12(108 - 114)	0,06

Desse modo, recolhemos 114 frações de 50,0ml que foram reunidas em 12 de acordo com indicações obtidas por meio da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando placas de sílica gel 60 como adsorvente, clorofórmio (saturado com água)-acetona a 20,0% como eluente e reveladas primeiramente com luz UV e posteriormente com reagente de Moraes & Palma.

4.2.8. Obtenção das Substâncias SP-1 e SP-2 da Fração 5

Para essa finalidade, utilizou-se uma coluna de vidro de 1,50m de altura e 3,5cm de diâmetro, contendo uma suspensão de 350,0g de sílica gel 60. Foram cromatografados 14,0g da fração nº5, conforme descrito em 4.2.7, usando-se hexano e acetato de etila como eluentes. Assim, foram obtidas 90 frações de 50,0ml que, após a análise cromatográfica em camada delgada comparativa, foram reunidas em 5 frações (Tabela 6).

TABELA 6 : Frações Obtidas da Cromatografia de Adsorção da Fração nº5.

ELUENTE	MISTURA	FRAÇÃO	MASSA(g)
Hex/Acoet	1:1	5.1(01-17)	0,37
Hex/Acoet	1:1	5.2(18-41)	8,60
Hex/Acoet	1:1	5.3(42-46)	0,13
Hex/Acoet	1:1	5.4(47-68)	0,15
Acoet		5.5(69-90)	0,61

A fração 5.2 (86,0g), isenta do eluente, foi dissolvida em pequena quantidade de acetato de etila e, com auxílio de um tubo capilar, aplicada em linha horizontal, à cerca de 2,0cm da base inferior de placas cromatográficas preparativas em camada

delgada. A seguir, o cromatograma foi desenvolvido, utilizando-se como eluente, clorofórmio (saturado com água) - acetona 20,0%. Após a eluição, as cromatoplacas foram retiradas das cubas, secas à temperatura ambiente e observadas sob luz UV. Duas manchas foram localizadas e, demarcadas com auxílio de estilete. As camadas de sílica gel destas regiões foram destacadas das placas, reunidas com outras camadas iguais, obtidas de outras cromatoplacas e eluídas separadamente por meio de filtração a vácuo em filtro de placa porosa, utilizando como solvente extrator acetato de etila e acetona. As substâncias, assim isoladas, foram denominadas de SP-1 e SP-2 (Figura 2). Após análise dos espectros de ^{13}C, verificou-se que as mesmas se encontram em mistura.

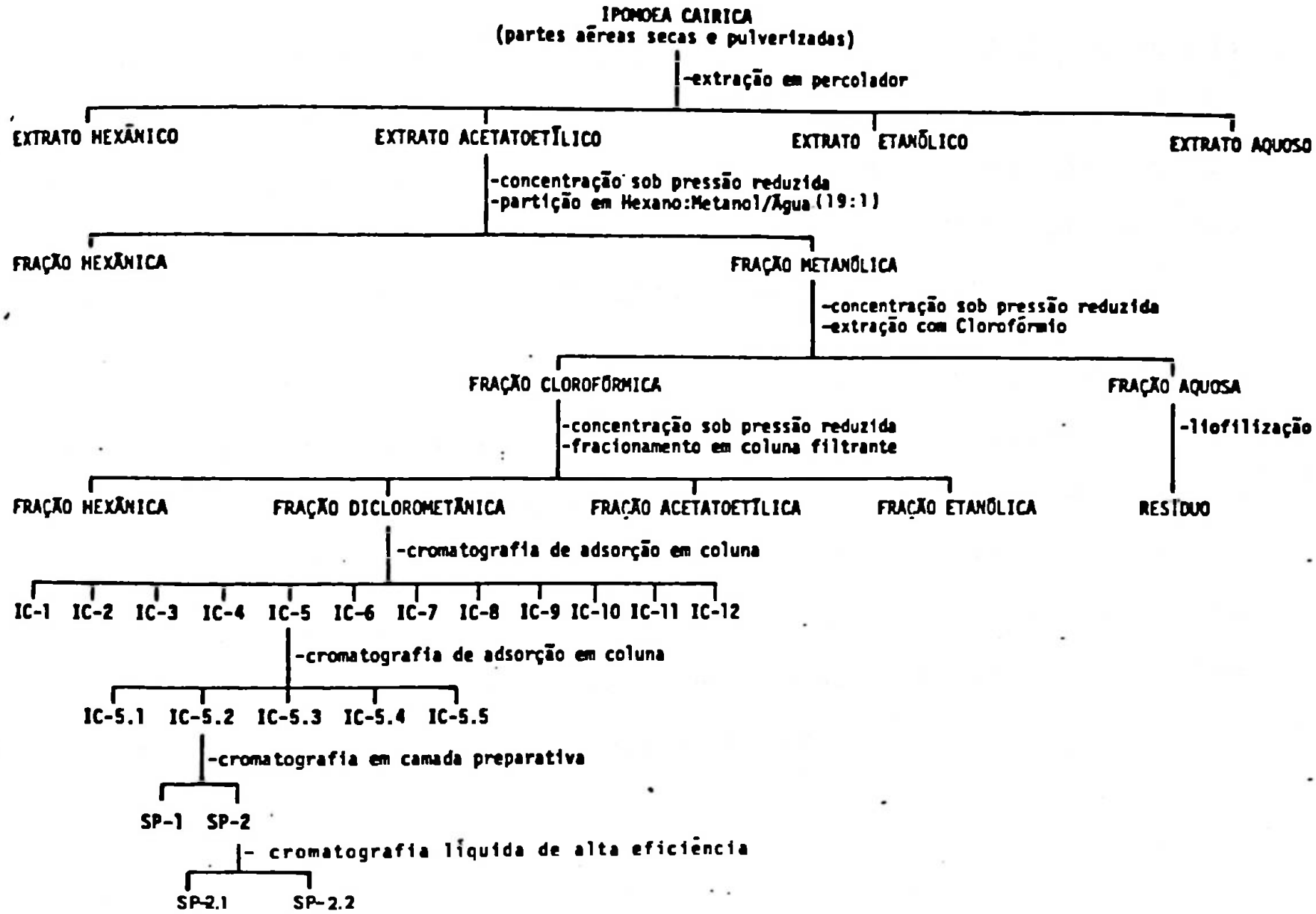


FIGURA 2 - Esquema de Obtenção das Substâncias SP-1 e SP-2 de Ipomoea cairica.

4.2.9. Purificação de SP-2 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A purificação de 140,0mg de SP-2 foi efetuada dissolvendo-os em metanol e injetando-se 0,2ul desta solução em cromatográfo líquido provido de uma coluna de Si-60 analítica de 250 X 4,6mm e uma vazão de 2,0ml/min da mistura Hex/is-ProH/HoAc (90:9,6:0,4) utilizado como eluente.

O registro dos picos foi obtido com detector de UV/Vísivel operando a 280nm e revelou a presença de 2 substâncias que foram separadas, utilizando-se uma coluna preparativa de Si-60 com 250 X 22mm de diâmetro, com uma vazão de 30,0ml/min de Hex/is-ProH/HoAc (90:9,6:0,4). As soluções foram então concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e as substâncias obtidas, codificadas como SP-2.1 e SP-2.2.

4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO

4.3.1. Microrganismos Indicadores da Ação Antimicrobiana

Para a verificação da atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas, utilizou-se as cepas padrão da "American Type Culture Collection" (ATCC), cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz - SP e "cepas de campo" isoladas pelo laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Tabela 7).

Nº	Microrganismos	Procedência	Característica
1	Staphylococcus aureus - Sa	ATCC 6538	Gram positivo
2	Staphylococcus epidermidis - Se	ATCC 12228	Gram positivo
3	Escherichia coli - Ec	ATCC 10538	Gram negativo
4	Micrococcus luteus - Mc	ATCC 9341	Gram positivo
5	Bacillus subtilis - Bs	ATCC 6633	Esporo
6	Pseudomonas aeruginosa - Pa	ATCC 27853	Gram negativo
7	Staphylococcus aureus - Sa	COWAN(UK)	Gram positivo
8	Staphylococcus aureus/pele - Sap 1	campo	Gram positivo
9	Staphylococcus aureus/pele - Sap 2	campo	Gram positivo
10	Escherichia coli / pele - Ecp	campo	Gram negativo
11	Escherichia coli / saliva - Ecs	campo	Gram negativo
12	Enterobacter / saliva - Es	campo	Gram negativo
13	Enterobacter / mucosa - Em	campo	Gram negativo
14	Salmonella typhimurium - St	campo	Gram negativo
15	Staphylococcus aureus/saliva - Sas	campo	Gram positivo
16	Staphylococcus aureus/mucosa - Sam	campo	Gram positivo
17	Pseudomonas aeruginosa/canal - Pac	campo	Gram negativo
18	Pseudomonas aeruginosa/saliva - Pas	campo	Gram negativo
19	Staphylococcus aureus/canal - Sac	campo	Gram positivo
20	Candida albicans/canal - Cac	campo	Levedura
21	Candida albicans/pele - Cap	campo	Levedura
22	Candida parapsilosis/pele - Cp	campo	Levedura
23	Candida guilliermondii/pele - Cg	campo	Levedura
24	Rhodotorula sp - Rd	campo	Levedura
25	Candida krusei - Ck	campo	Levedura

4.3.2. Meios de Cultura

4.3.2.1. Para Manutenção dos Microrganismos Indicadores

Com a finalidade de preservação, as cepas dos microrganismos indicadores, bactérias e fungos em forma de levedura eram repicadas a cada 15 dias, respectivamente, em tubos com Ágar simples (As) e Ágar Sabouraud (Sb) e incubados a 37°C por 24 horas. A seguir, os tubos eram retirados da estufa e mantidos no laboratório à temperatura ambiente, para os estudos subseqüentes.

ÁGAR SIMPLES (As)

- Caldo nutriente (Difco)..... 8,0g
- Ágar-ágar (Difco)..... 15,0g
- Água destilada..... 1.000,0ml

Após a dissolução do primeiro componente em água destilada, o pH era ajustado a 7,5 - 7,7, e o meio era acrescido de ágar--ágar. Após a fusão do ágar, o meio era distribuído em volumes de cerca de 5,0ml em tubos de ensaio de 15 X 125mm tamponados com algodão e esterilizados em autoclave a 120°C, durante 20 minutos. Após a esterilização, os tubos eram mantidos inclinados até a solidificação do meio.

ÁGAR SABOURAUD (Sb)

- Peptona..... 10,0g
- Dextrose..... 40,0g
- Ágar-ágar..... 15,0g
- Água destilada..... 1.000,0ml

Reidratou-se 65,0g do produto Ágar Sabouraud Dextrose (Scott) em 1.000,0ml de água destilada e o pH ajustado para 5,6 e aquecido até a fusão do ágar. A seguir, cerca de 6,0ml eram distribuídos em tubos de ensaio de 18 X 180mm e esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após a autoclavação, os tubos eram mantidos em posição inclinada até a solidificação.

4.3.2.2. Para o Preparo dos Inóculos Bacterianos e Fúngicos

Para a obtenção dos mesmos, as culturas de bactérias e fungos provenientes dos meios de manutenção foram semeadas respectivamente, em caldo Müller-Hinton (Difco) e caldo cérebro e coração (Difco).

CALDO MÜLLER HINTON (MHb)

- Infusão de carne..... 2,0g
- Hidrolisado ácido de caseína..... 17,5g
- Amido solúvel..... 1,5g
- Água destilada..... 1.000,0ml

No preparo desse meio, segundo as indicações do fabricante, eram adicionadas a 21,0g do meio desidratado, 1.000,0ml de água destilada e o pH ajustado a 7,4 e, a seguir, distibuído em volumes de cerca de 5,0ml em tubos de 15 X 125mm, tamponados com algodão e esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos.

CALDO CÉREBRO E CORAÇÃO (BHI)

- Infusão de cérebro bovino..... 200,0g
- Infusão de coração bovino..... 250,0g
- Proteose peptona..... 10,0g
- Dextrose..... 2,0g
- Cloreto de sódio..... 5,0g
- Fosfato dissódico..... 2,5g
- Água destilada..... 1.000,0ml

Segundo as indicações do fabricante, 37,0g do meio foram dissolvidos em 1.000,0ml de água destilada, e o pH ajustado a 7,4. Em seguida, volumes de 5,0ml foram distribuídos em tubos de 15 X 125mm, tamponadas com algodão, e então esterilizados em autoclave a 120°C por 20 minutos.

4.3.2.3. Para Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas, foi utilizado Antibiotic medium nº1 (Difco), que apresentava a seguinte composição:

ANTIBIOTIC MEDIUM Nº1 (AM)

- Extrato de carne..... 1,5g
- Extrato de levedo..... 3,0g
- Casitona..... 4,0g
- Peptona..... 6,0g
- Dextrose..... 1,0g
- Ágar-ágar..... 15,0g

Segundo as instruções do fabricante, 30,5g do meio foram reidratadas com 1.000,0ml de água destilada e o pH ajustado à aproximadamente 6,6. O meio, assim preparado, foi acondicionado em balões de 2.000,0ml, sendo esterilizados em autoclave a 120°C por 15 minutos. Este meio era mantido em banho-maria a aproximadamente 50°C até o momento do uso.

4.3.3. Preparo das Suspensões Bacterianas para Inóculo

Com auxílio de uma alça de platina esterilizada, culturas de 18 horas dos microrganismos indicadores em ágar simples inclinado foram transferidas para tubos contendo 5,0ml de uma solução salina esterilizada e padronizada pela escala de MacFarland (0,5ml de cloreto de bário 0,048M + 99,5ml de ácido sulfúrico a 1,0%). Obteve-se, assim, um inóculo contendo aproximadamente 10^6 células/ml, equivalente à metade da escala 1 de MacFarland, e denominada de "suspensão concentrada", utilizada para a elaboração da camada seed, quando adicionada ao meio de cultura, na proporção de 0,5%.

A suspensão do esporo de Bacillus subtilis foi preparada de acordo com COSTA (1973). Portanto, foi adicionada ao meio de cultura na proporção de 0,5%, correspondente a concentração de 10^6esporos/ml da camada seed.

4.3.4. Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Ágar (Disco-placa)

Para a triagem antimicrobiana dos extratos brutos das espécies de Ipomea, utilizou-se o método do disco de acordo com BAUER et al.(1966). Este método consiste em efetuar o teste no meio de cultura em camada única. Nos ensaios, foram utilizadas placas de Petri previamente esterilizadas de 20 X 100mm de diâmetro com 8,0ml de ágar AM nº1 adicionados de 0,5% da

suspensão dos microrganismos indicadores. Os discos de papel de filtro Whatman nº1 de 5,0mm de diâmetro eram embebidos com os respectivos extratos, até obter uma concentração de 15,0mg/ml. O mesmo procedimento foi realizado para a mistura de DMSO/H_2O (1:1) utilizado como diluente. A seguir, os discos eram aplicados sobre a superfície do meio de cultura com o auxílio de uma pinça esterilizada e pressionados levementes. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas e, decorrido este período de incubação, os halos de inibição foram mensurados com régua milimetrada colocada sob a placa.

4.3.5. Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método de Difusão em Ágar (Cavidade-placa)

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos, frações e substâncias isoladas foi efetuada pelo método de difusão em ágar (Cavidade-placa) de acordo com GROVE & RANDALL (1955). Este método consiste em efetuar o teste no meio de cultura em camada dupla. Para isso foram utilizadas placas de Petri de 20 X 100mm de diâmetro, às quais adicionou-se 20,0ml de ágar AM nº1 para a formação da camada base. Após a solidificação do meio base, eram adicionadas 5,0ml do ágar AM nº1 inoculado com o microrganismo indicador para obtenção da camada seed. A seguir, por meio de um furador de rolha e/ou varetas de vidro esterilizados com 6,0mm de diâmetro, confeccionou-se poços

orientados por um escantilhão construído em cartolina, onde a parede interna da placa era representada no modelo por uma circunferência e círculos de 4,0mm de diâmetro. Os poços eram perfurados em pontos eqüidistantes e suficientemente afastados entre si, como representado na figura 3. O furador era conectado por meio de um tubo de látex a um frasco Kitasato e este, a uma bomba de vácuo, que assim fazia a aspiração do meio de cultura, deixando as cavidades vazias. Adicionou-se, em cada orifício, um volume de 50,0ul dos extratos, fração e substâncias isoladas solubilizados em uma mistura de DMSO/H_2O (1:1), sendo que para cada microrganismo indicador era realizado um controle do diluente (DMSO/H_2O). As placas eram deixadas em repouso durante cerca de 30 minutos para a pré-difusão, e incubadas a 37°C durante 24 horas, após a inserção de papel de filtro entre o fundo e a tampa para a absorção da água de condensação. Decorrido o período de incubação, realizou-se a leitura dos halos de inibição anotando-se o diâmetro em milímetros.

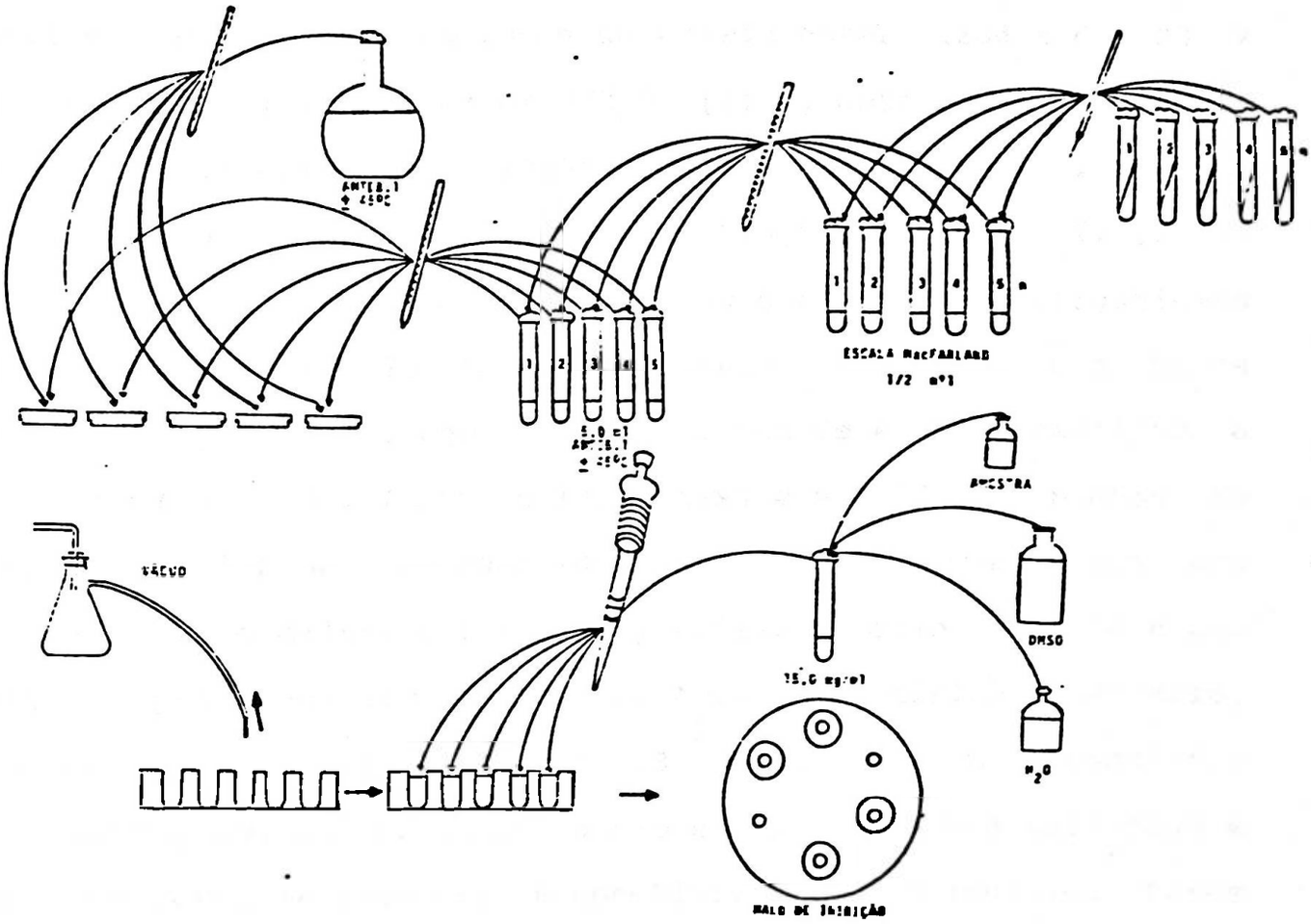


FIGURA 3 - Fluxograma da Técnica de Determinação da Atividade Anticrobiana Avaliada pelo Método de Difusão (cavidade - placa).

4.3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da CIM, o extrato, fração e substâncias isoladas eram pesados em tubos de ensaio esterilizados de 20 X 20mm e solubilizados em DMSO/H_2O (1:1), obtendo-se assim as seguintes concentrações: 20,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 1,25mg/ml para extrato e fração, e 1.000,0; 500,0; 250,0; 125,0 e 62,5ug/ml para as substâncias isoladas contra os microrganismos indicadores (Tabela 7). Em seguida, eram adicionados aos tubos 9,0ml de ágar AM nº1 equilibrado à cerca de 45°C, submetidos a agitação em agitador (Mixtron Troptonix) e vertidos em placas de Petri esterilizadas de 20 X 100mm de diâmetro. Uma placa era preparada com o diluente (DMSO/H_2O) utilizada como controle e uma placa era preparada sem o diluente. Após a solidificação do meio, eram semeadas as culturas de 18 horas dos microrganismos indicadores, cultivados em caldo MHb e caldo BHI para bactérias e fungos em forma de levedura, respectivamente. Os inóculos foram aplicados na superfície do meio em forma de pontos por meio do aparelho de Steer (multiaplicador) conforme a figura 4, e as placas deixadas em repouso à temperatura ambiente para secagem dos inóculos e em seguida incubadas a 37°C, durante 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a leitura das placas.

A menor concentração da solução teste na qual não houve crescimento (manifestado pela presença de colônias) foi considerada a CIM da solução.

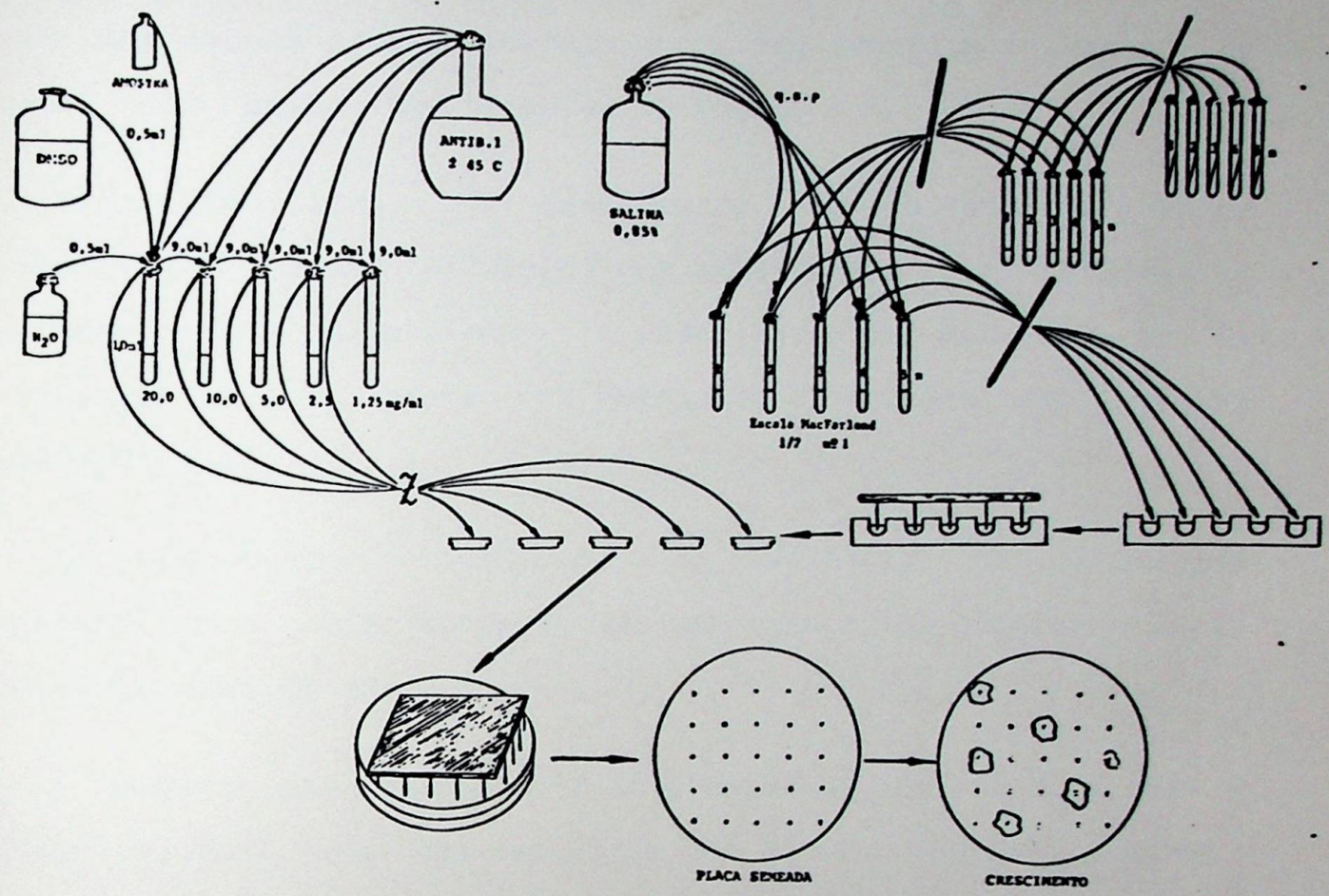


FIGURA 4 - Fluxograma da Técnica de Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

V. RESULTADOS

Para o registro da atividade antimicrobiana dos produtos obtidos das espécies de Ipomoea estudadas, adotou-se o sinal positivo (+) quando os mesmos produziam halos de inibição ao redor dos discos e/ou cavidades, e o sinal negativo (-) quando os mesmos não produziam halos de inibição.

Por outro lado, foi considerado como a CIM a menor concentração (maior diluição) das substâncias que inibiram o desenvolvimento microbiano. A cada ensaio da determinação da atividade antimicrobiana era realizado o controle do solvente DMSO/H_2O (1:1).

Os resultados referentes à avaliação da atividade antimicrobiana estão apresentados nas tabelas de números 8 a 17 e nas figuras de números 5 a 8.

A seguir são apresentadas as figuras de números 9 a 18 e tabela 18, referentes aos espectros das substâncias SP-1 e SP-2.

TABELA 8: Atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos pela percolação de Ipomoea cairica, I. pes-caprae e I. phyllomega determinada pelo método de difusão em ágar (disco-placa) frente a Staphylococcus epidermidis (Se) e Micrococcus luteus (Ml).

ESPÉCIE	EXTRATO (15,0mg/ml)	Se 35°C	Se 37°C	Ml 35°C	Ml 37°C
Ipomoea cairica	H	+	+	+	+
	AE	+	+	+	+
	E	+	+	+	+
	Aq	+	-	+	+
Ipomoea pes-caprae	H	-	-	-	-
	AE	+	+	+	+
	E	+	-	+	+
	Aq	-	-	+	+
Ipomoea phyllomega	H	-	-	+	+
	AE	+	+	+	+
	E	+	+	+	+
	Aq	+	+	+	+

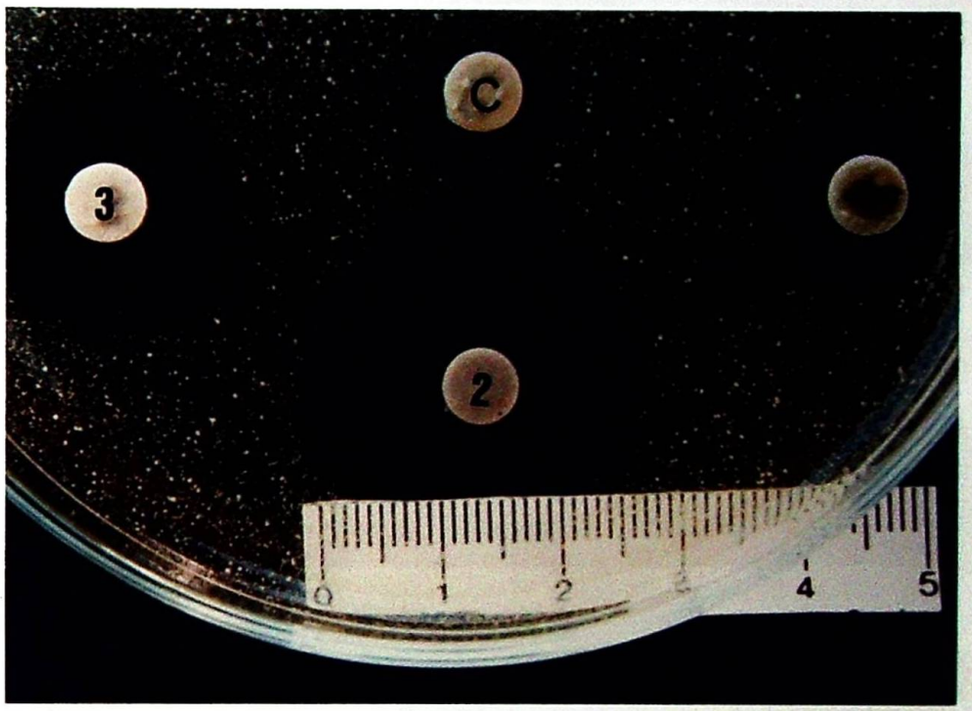


FIGURA 5: Aspecto da Ação de Diferentes Extratos Brutos de Ipomoeas Sobre **Staphylococcus epidermidis** Determinada pelo Método do Disco (1 - H, 2 - AE, 3 - E e C - Controle).

TABELA 9: Atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos pela percolação de Ipomoea cairica, I. pes-caprae e I. phyllomega determinada pelo método de difusão em ágar (Cavidade--placa) frente a Staphylococcus epidermidis (Se) e Micrococcus luteus (Ml).

ESPÉCIE	EXTRATO	Se		Ml	
	(15,0mg/ml)	35°C	37°C	35°C	37°C
	H	-	-	-	-
	AE	+	+	-	+
Ipomoea cairica	E	+	+	-	+
	Ag	-	-	-	-
	H	-	-	-	-
	AE	+	+	-	+
Ipomoea pes-caprae	E	+	+	-	+
	Ag	-	-	-	-
	H	-	+	-	-
	AE	+	+	-	+
Ipomoea phyllomega	E	+	+	-	+
	Ag	-	-	-	-

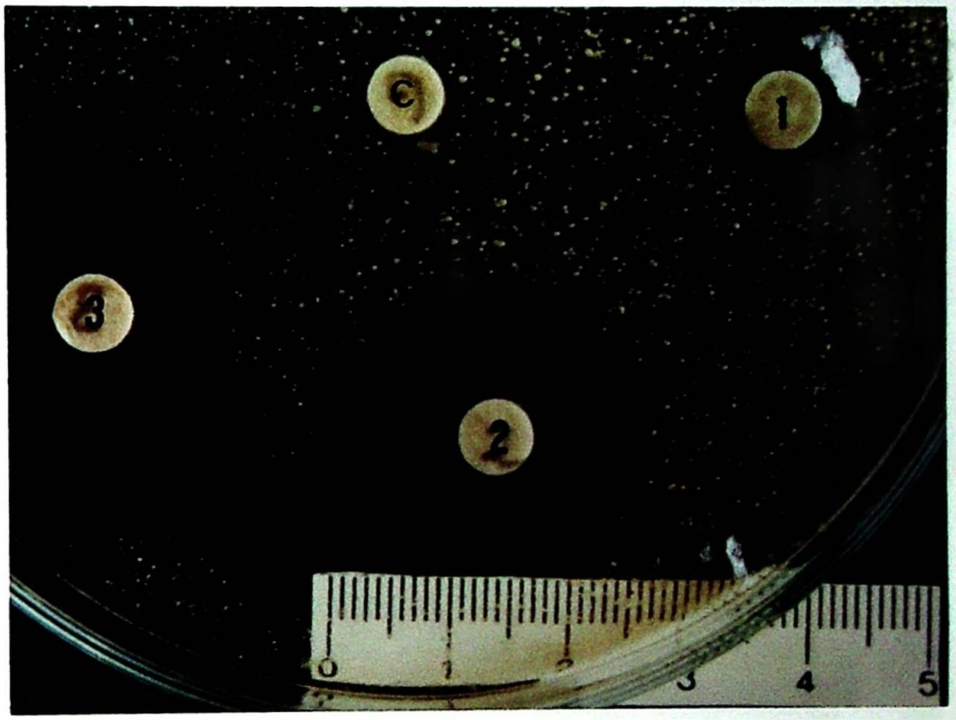


FIGURA 6: Aspecto da Ação de Diferentes Extratos Brutos de Ipomoeas Sobre **Micrococcus luteus** Determinada pelo Método do Disco (1 - H, 2 - AE, 3 - E e C - Controle).

TABELA 10: Atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos pela maceração de Ipomoea cairica, I. pes-caprae e I. phyllomega determinada pelo método de difusão em ágar (disco-placa), frente ao Staphylococcus epidermidis (Se) e Micrococcus luteus (Ml).

ESPÉCIE	EXTRATO	Se		Ml	
	(15,0mg/ml)	35°C	37°C	35°C	37°C
	H	-	-	-	+
Ipomoea cairica	AE	-	-	-	+
	E	+	+	+	+
	H	+	+	-	+
Ipomoea pes-caprae	AE	+	+	+	+
	E	+	+	+	+
	H	-	-	-	+
Ipomoea phyllomega	AE	-	-	-	+
	E	+	+	+	+

TABELA 11: Atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos pela maceração de Ipomoea cairica, I. pes-caprae e I. phyllomega determinada pelo método de difusão em ágar (cavidade-placa) frente a Staphylococcus epidermidis (Se) e Micrococcus luteus (Ml).

ESPÉCIE	EXTRATO	Se		Ml	
	(15,0mg/ml)	35°C	37°C	35°C	37°C
	H	-	-	-	-
Ipomoea cairica	AE	+	+	-	+
	E	-	-	-	-
	H	-	-	-	-
Ipomoea pes-caprae	AE	+	+	-	+
	E	-	-	-	+
	H	-	-	-	-
Ipomoea phyllomega	AE	+	+	-	+
	E	+	-	-	+

FIGURAS 7: Aspecto da Ação de Diferentes Extratos Brutos das Espécies de Ipomoeas Sobre Micrococcus luteus Determinada pelo Método de Cavidade - Placa (1 - H, 2 - AE, 3 - E e C - Controle).

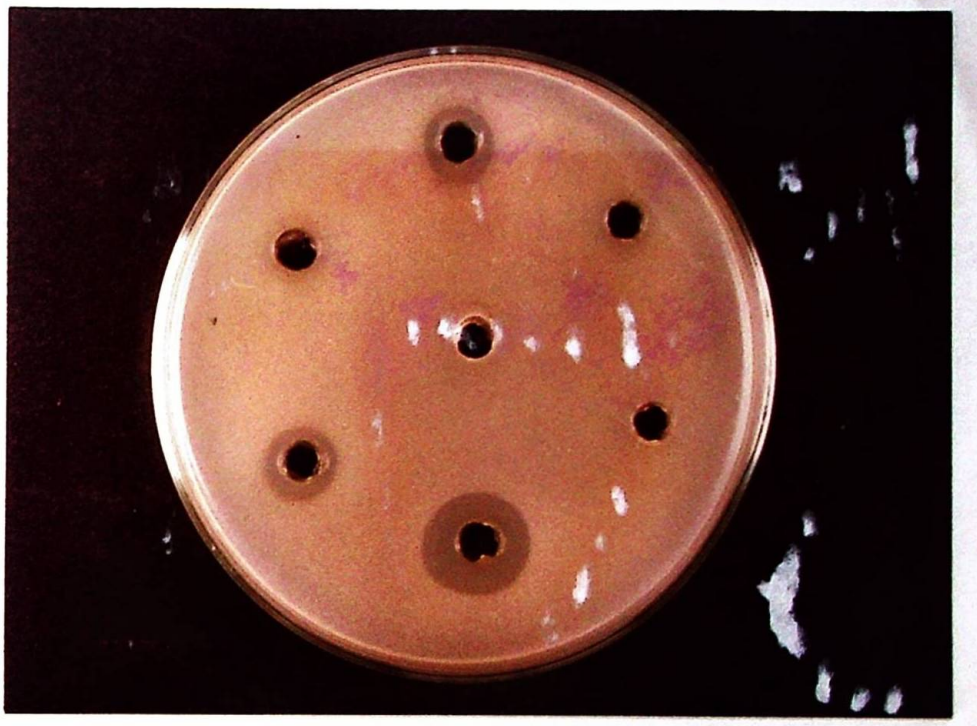


FIGURA 8: Aspecto da Ação de Diferentes Extratos Brutos das Espécies de Ipomoeas Sobre Staphylococcus epidermidis Determinada pelo Método de Cavidade-Placa (1 - H, 2 - AE, 3 - E e C - Controle).

TABELA 12: Atividade antimicrobiana das frações obtidas do extrato acetatoetílico de Ipomoea cairica, frente a diferentes microrganismos.

FRAÇÃO (15,0mg/ml)	MICRORGANISMOS INDICADORES			
	Sa	Se	Ec	Ml
Hexânica	-	-	-	-
Clorofórmica	+	+	+	+
Aquosa	-	-	+	-

TABELA 13: Atividade antimicrobiana das frações obtidas da fração clorofórmica do extrato acetatoetílico, frente a diferentes microrganismos.

FRAÇÃO (15,0mg/ml)	MICRORGANISMOS INDICADORES			
	Sa	Se	Ec	Ml
Hexânica	+	+	+	+
Diclorometânica	+	+	-	+
Acetatoetílica	+	+	-	+
Etanólica	+	-	-	-

TABELA 14: Atividade antimicrobiana das frações cromatográficas da parte diclorometânica, frente a diferentes microrganismos.

FRAÇÃO (15,0mg/ml)	MICRORGANISMOS INDICADORES			
	Sa	Se	Ec	Ml
IC - 1	+	-	-	+
IC - 2	+	-	-	+
IC - 3	+	-	-	+
IC - 4	+	+	+	+
IC - 5	+	+	-	+
IC - 6	+	+	-	+
IC - 7	+	-	-	+
IC - 8	+	-	-	+
IC - 9	+	-	-	+
IC -10	+	-	-	+
IC -11	+	-	-	+
IC -12	+	-	-	+

TABELA 15: Atividade antimicrobiana das frações cromatográficas obtidas da sub-fração IC - 5, frente a diferentes microrganismos.

FRAÇÃO (15,0mg/ml)	MICRORGANISMOS INDICADORES			
	Sa	Se	Ec	Ml
IC - 5.1	+	+	-	+
IC - 5.2	+	+	-	+
IC - 5.3	+	+	-	+
IC - 5.4	+	+	-	+

TABELA 16: Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato acetatoetílico e fração cromatográfica IC - 5 de Ipomoea cairica, frente a diferentes microrganismos.

MICRORGANISMOS	Ex-AcOET (mg/ml)	IC - 5 (mg/ml)
01 - Sa	10	1
02 - Se	10	1
03 - Ec	10	20
04 - Ml	1	1
05 - Bs	10	1
06 - Pa	1	20
07 - Sa	10	20
08 - Sap1	20	20
09 - Sap2	20	20
10 - Ecp	20	20
11 - Ecs	20	20
12 - Es	1	20
13 - Em	20	20
14 - St	20	20
15 - Sas	20	20
16 - Sam	20	20
17 - Pac	20	20
18 - Pas	1	20
19 - Sac	20	10
20 - Cac	20	1
21 - Cap	1	1
22 - Cp	1	1
23 - Cg	1	1
24 - Rd	1	1
25 - Ck	1	20

TABELA 17: Concentração inibitória mínima (CIM) das substâncias isoladas de Ipomoea cairica, frente a diferentes microrganismos.

MICRORGANISMOS	SP - 1 (ug/ml)	SP - 2 (ug/ml)
01 - Sa	> 1.000	> 1.000
02 - Se	> 1.000	> 1.000
03 - Ec	> 1.000	> 1.000
04 - Ml	60	60
05 - Bs	> 1.000	> 1.000
06 - Pa	> 1.000	> 1.000
07 - Sa	> 1.000	> 1.000
08 - Sap 1	> 1.000	> 1.000
09 - Sap 2	> 1.000	> 1.000
10 - Ecp	> 1.000	> 1.000
11 - Ecs	> 1.000	> 1.000
12 - Es	60	60
13 - Em	> 1.000	> 1.000
14 - St	> 1.000	> 1.000
15 - Sas	> 1.000	> 1.000
16 - Sam	> 1.000	> 1.000
17 - Pac	> 1.000	> 1.000
18 - Pas	> 1.000	> 1.000
19 - Sac	> 1.000	> 1.000
20 - Cac	> 1.000	> 1.000
21 - Cap	> 1.000	60
22 - Cp	60	60
23 - Cg	60	60
24 - Rd	60	60
25 - Ck	> 1.000	> 1.000

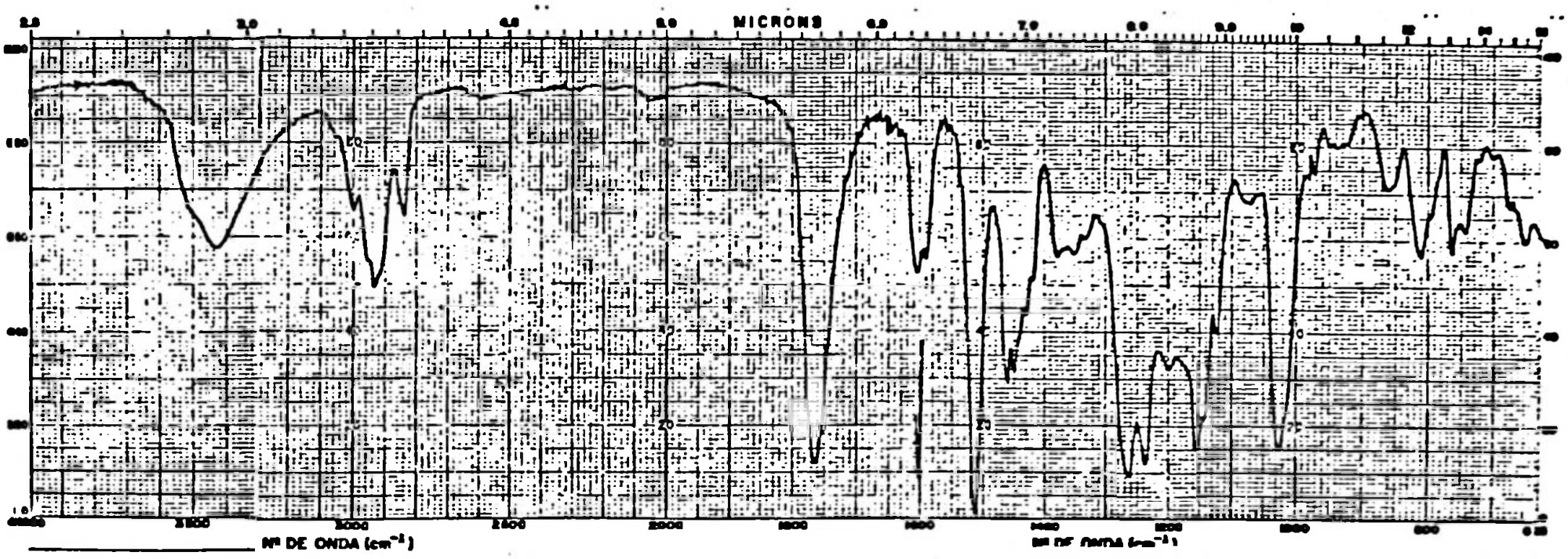


FIGURA 9 - Espectro na região do IV de SP - 1.

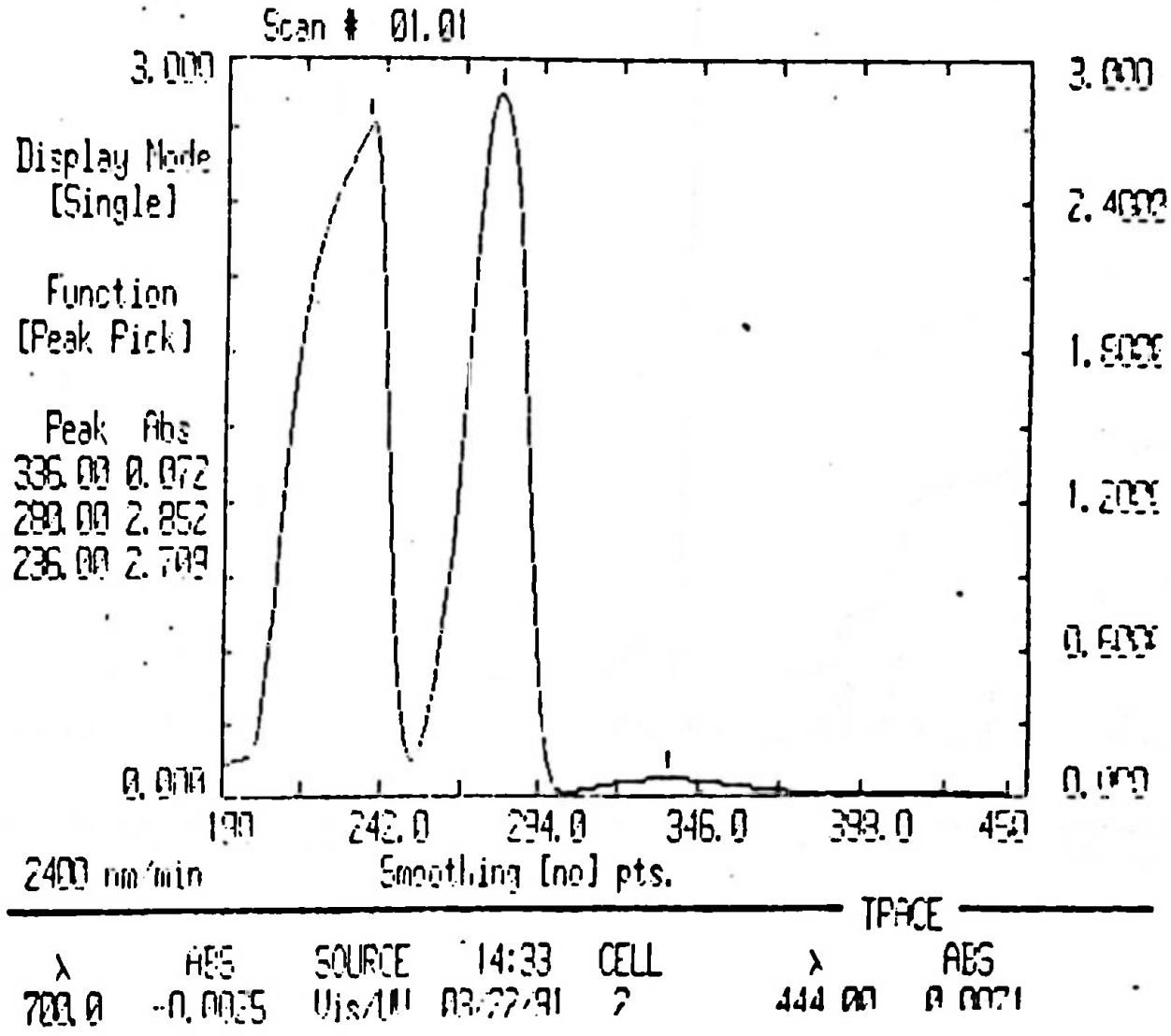


FIGURA 10 - Espectro na região do UV de SP - 1 obtido em metanol.

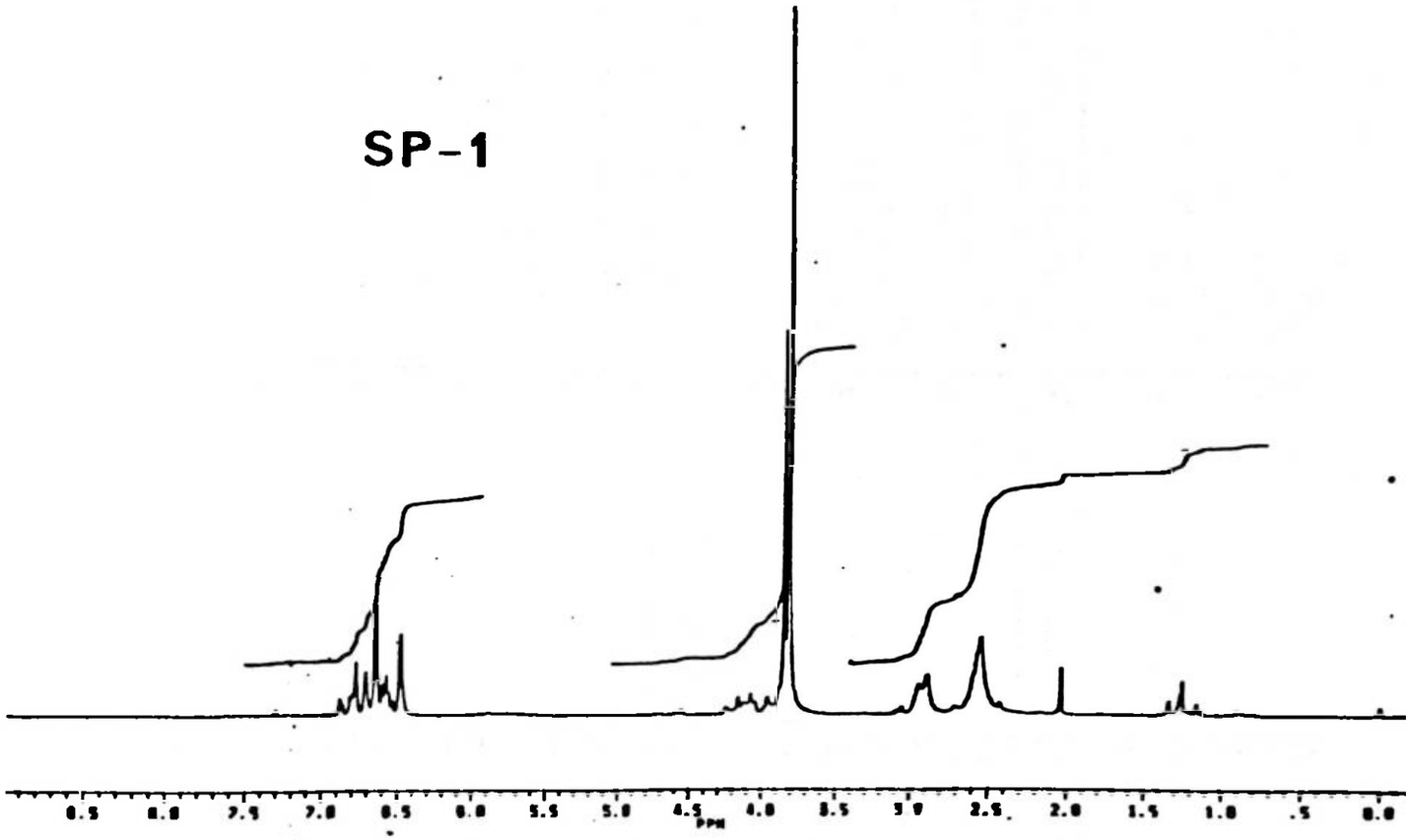


FIGURA 11 - Espectro de RMN ^{+}H a 80 MHz em $CDCl_3$ de SP - 1.

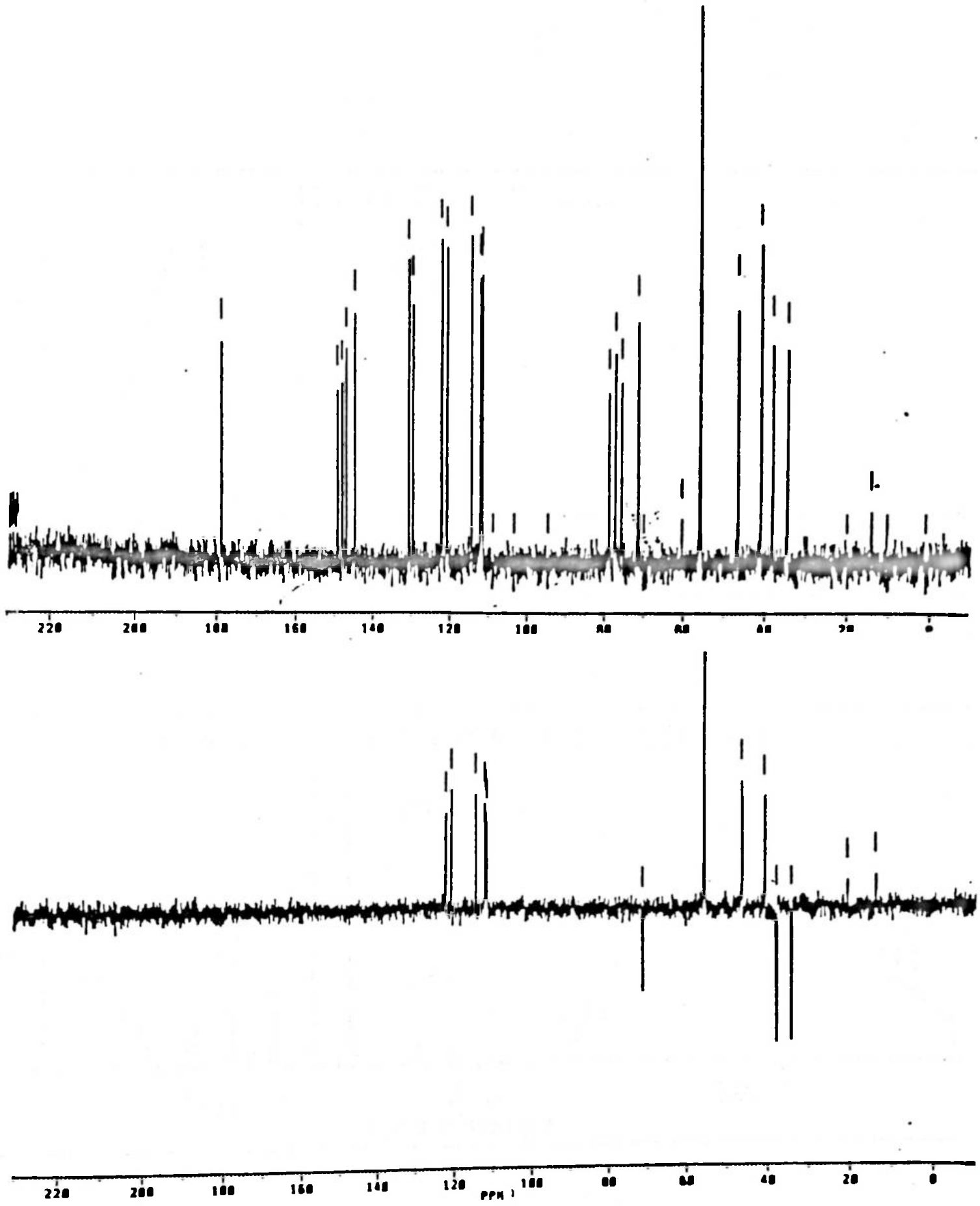
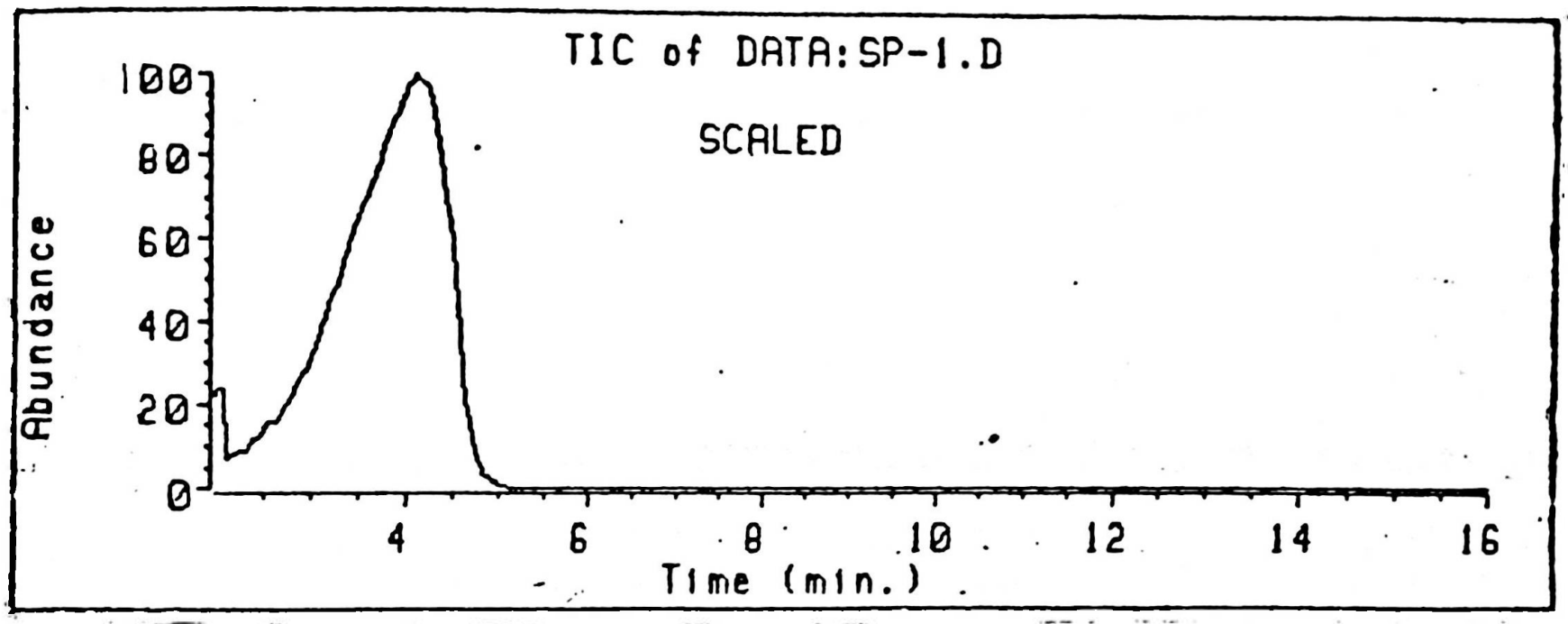


FIGURA 12 - Espectros de RMN ^{13}C a 20 MHz em $CDCl_3$ de SP - 1.



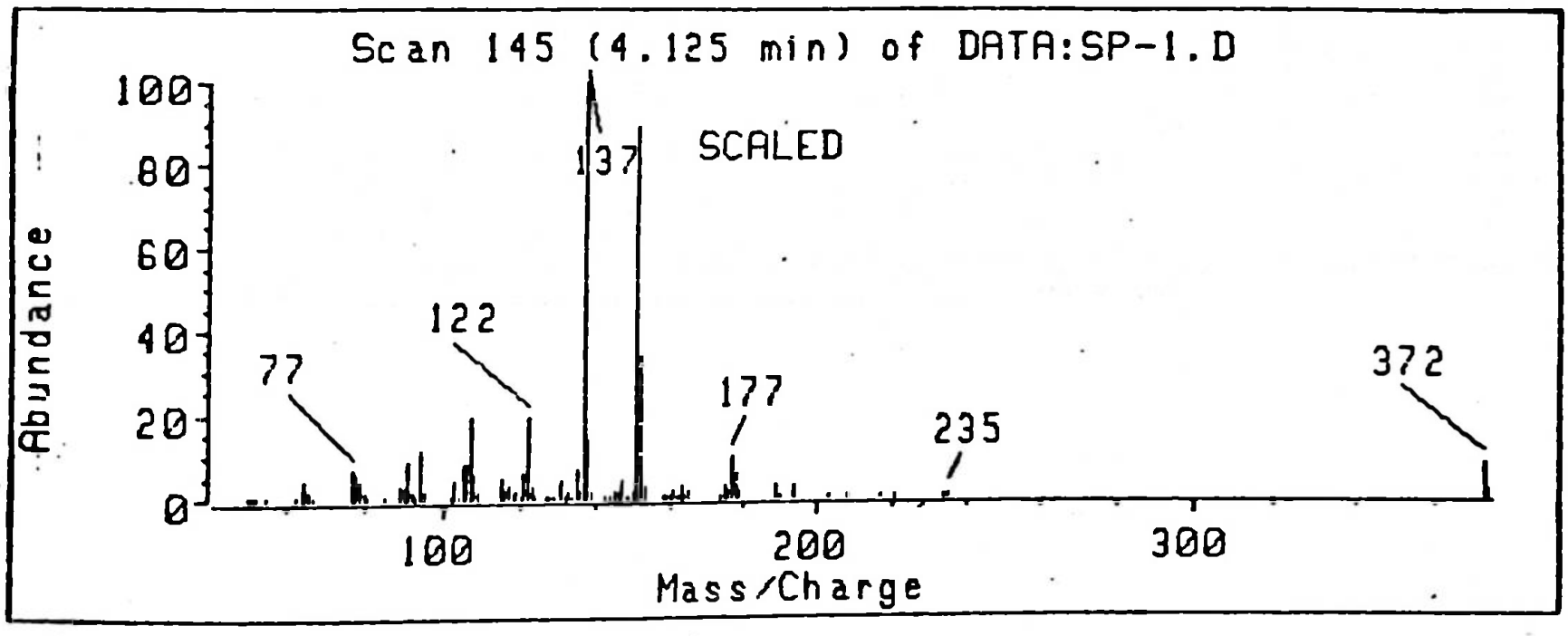


FIGURA 13 - Espectro de Massa de SP - 1.

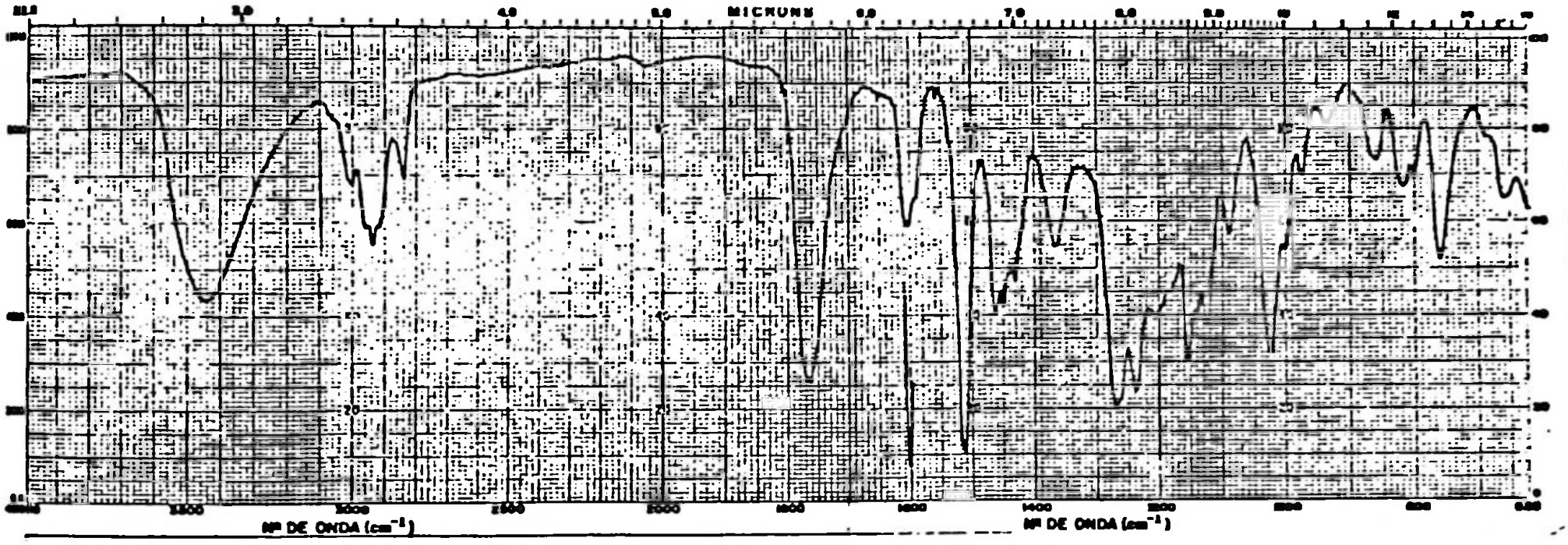


FIGURA 14 - Espectro na região do IV de SP - 2.

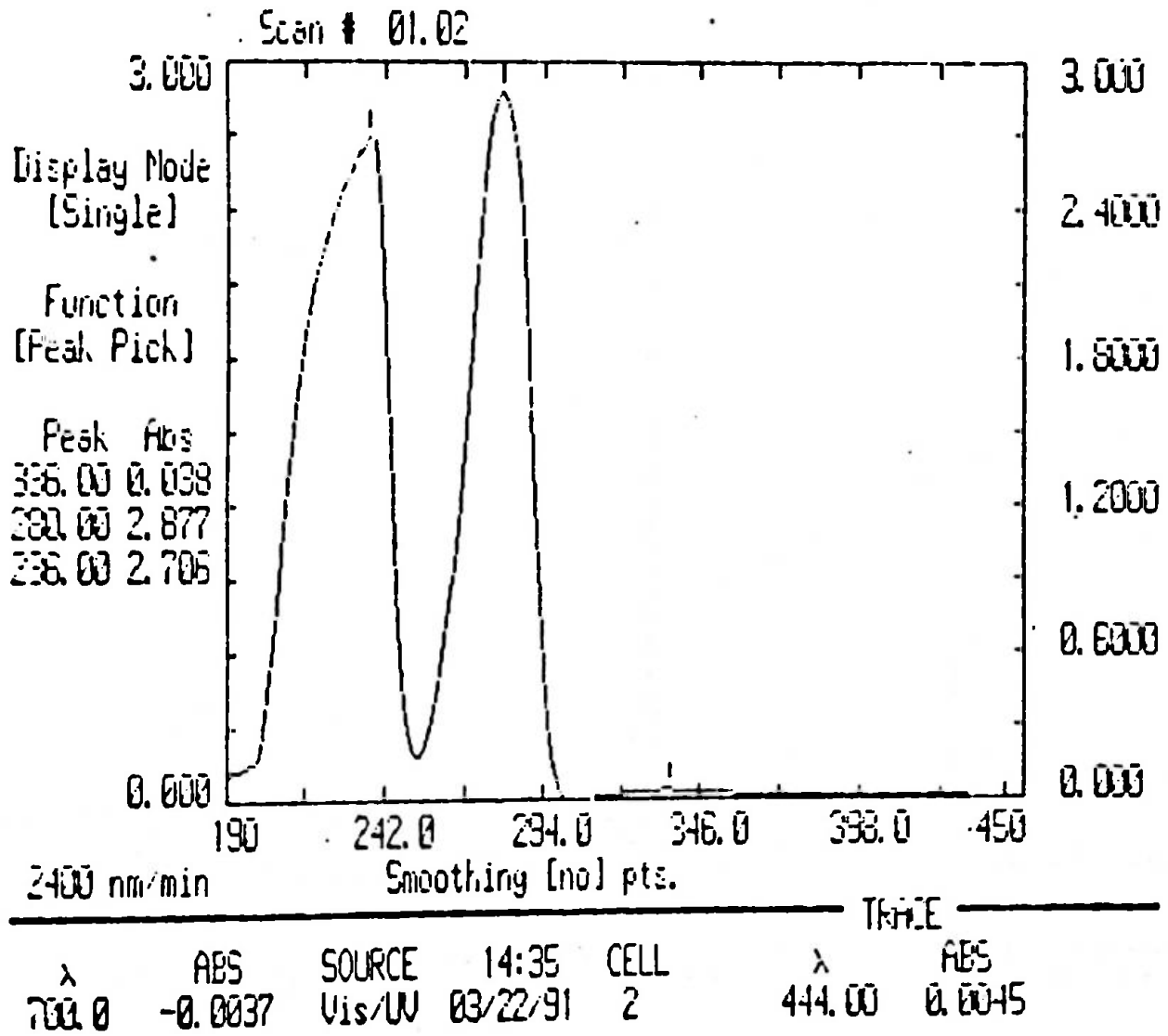


FIGURA 15 - Espectro na região do UV de SP - 2 obtido em metanol.

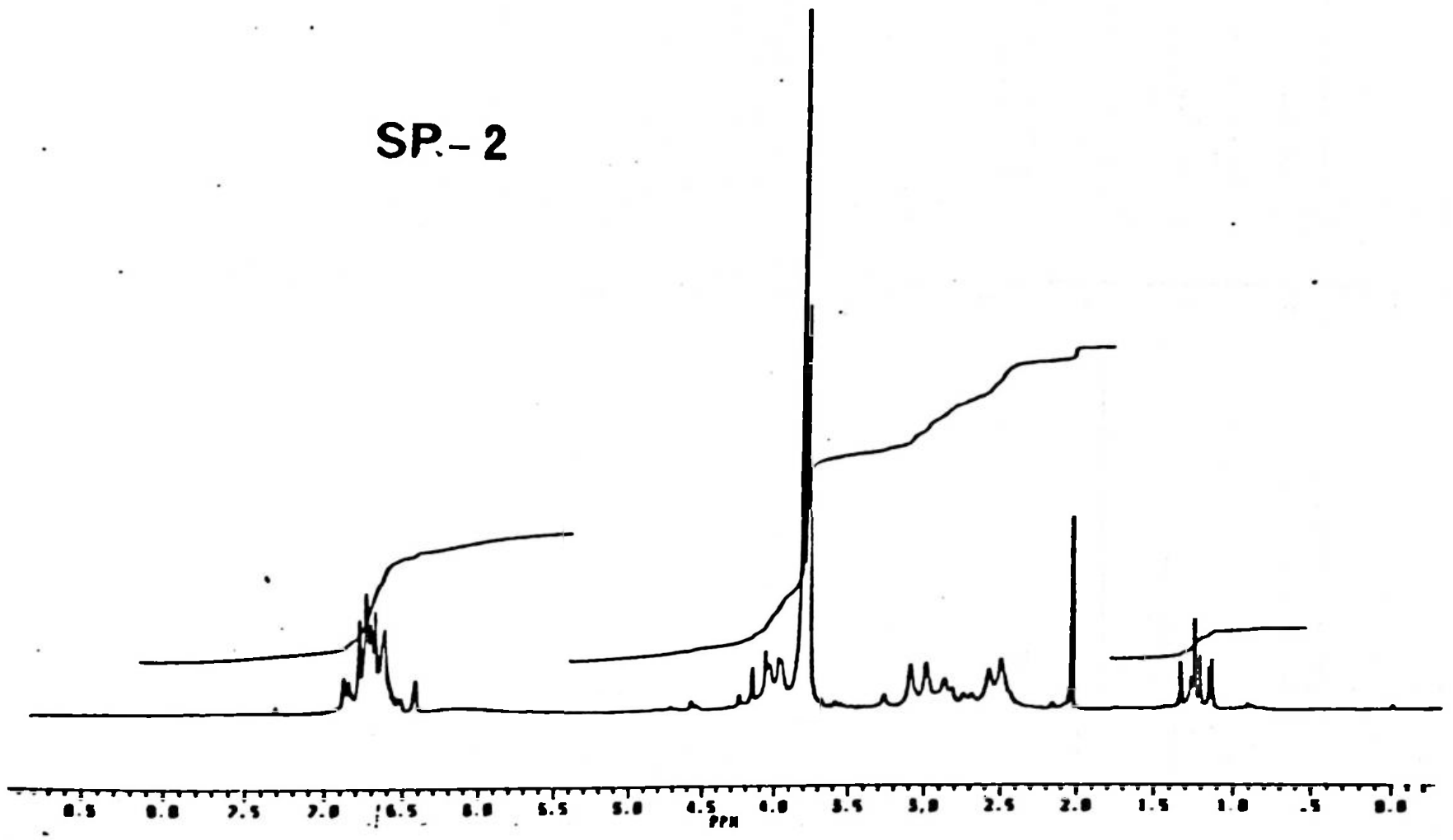


FIGURA 16 - Espectro de RMN ^{+}H a 80 MHz em $CDCl_3$ de SP - 2.

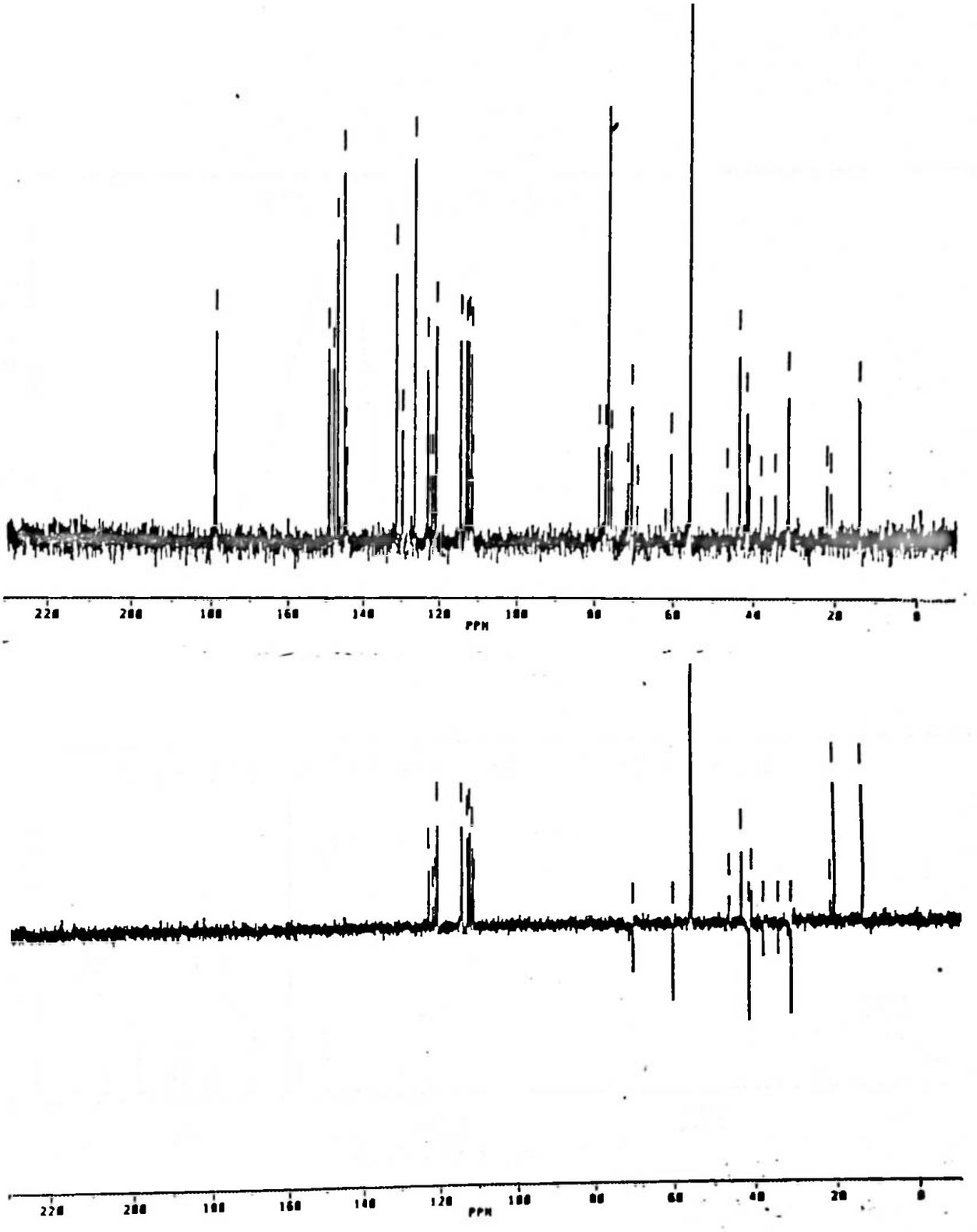
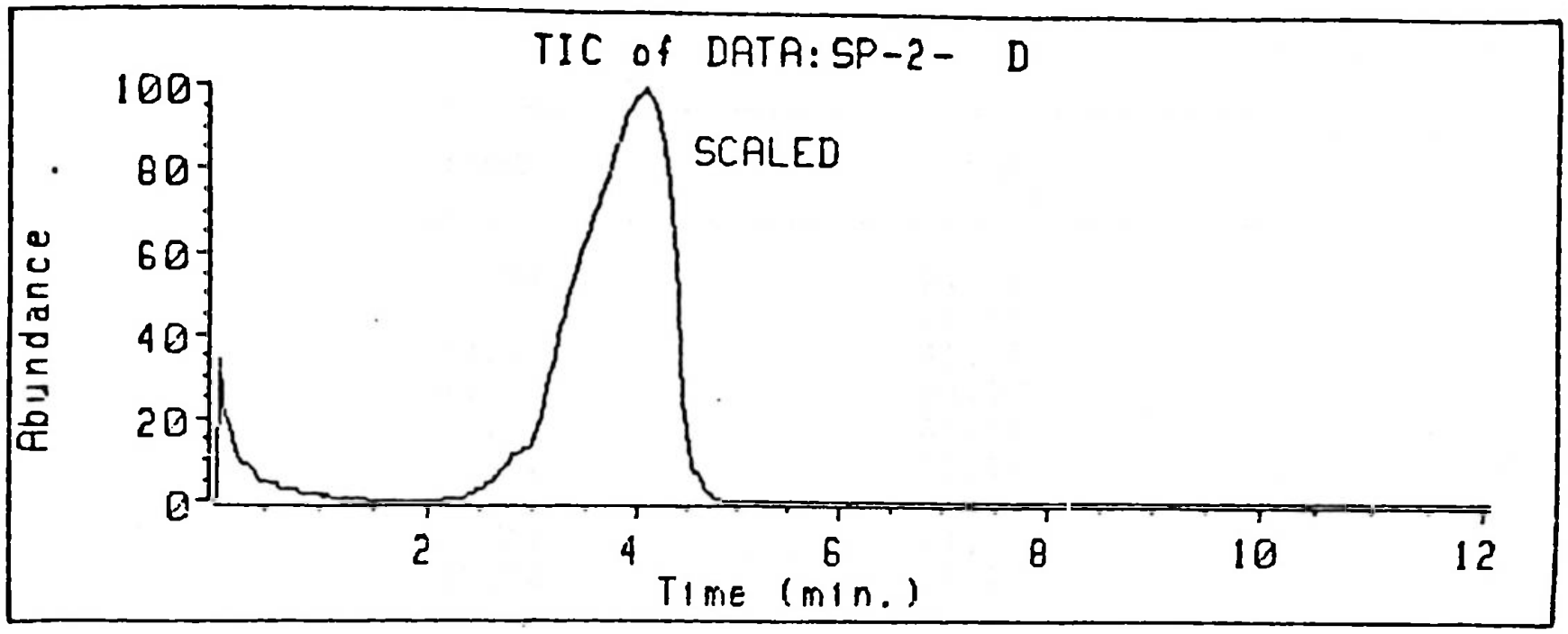


FIGURA 17 - Espectros de RMN ^{13}C a 20 MHz em $CDCl_3$ de SP - 2.



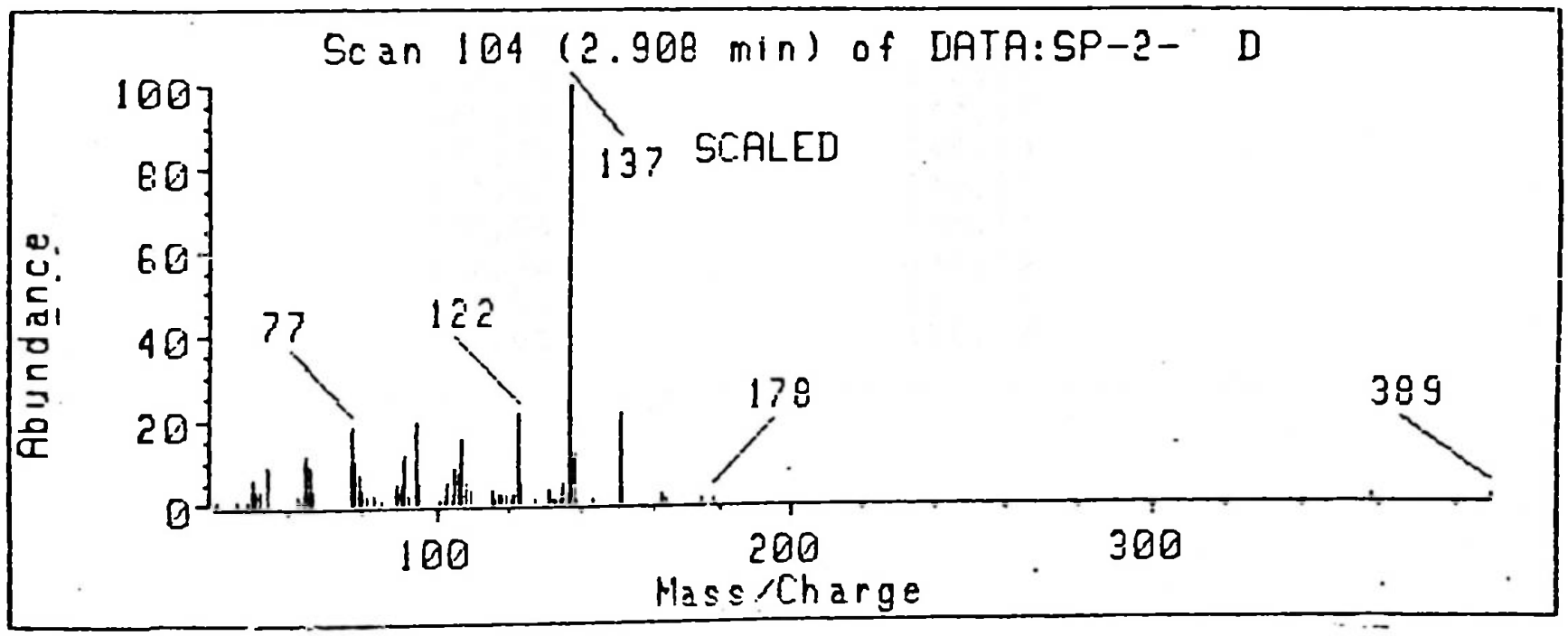


FIGURA 18 - Espectro de Massa de SP -2.

TABELA 18: Deslocamentos Químicos Observados nos Espectros de RMN de ^{13}C a 20 MHz de SP-1 e SP-2 em $CDCl_3$.

SP-1	SP-2
10,14	21,68
34,36	31,09
37,94	41,35
40,80	43,27
46,39	55,61
55,67	66,68
69,79	70,14
71,11	71,15
75,40	76,18
78,60	77,00
103,20	111,13
106,62	112,22
111,34	114,40
111,54	121,00
114,10	126,25
120,46	129,58
121,69	131,06
129,33	144,17
130,40	144,73
144,45	146,51
146,64	146,57
147,72	147,55
148,93	148,88
178,62	178,97

VI. DISCUSSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de substâncias químicas utilizadas na "desinfecção" (anti-sepsia) de feridas, lesões e mãos tem sido realizada desde os albores da era microbiana, isto é, desde a descoberta, no fim do século passado, da bactéria por Pasteur e Koch, como causa da doença infecciosa.

Os termos anti-sepsia e anti-séptico foram introduzidos na Inglaterra sendo listados, pela primeira vez, no dicionário Oxford (Oxford English Dictionary) na edição do ano de 1750 (BLOCK, 1983).

O primeiro método de avaliação foi desenvolvido por Koch, em 1881, e consistia em expor "fio de seda" (suporte), impregnado com esporos de Bacillus anthracis dessecados, à ação de substâncias químicas (concentração única) durante tempos variáveis e, a seguir, inoculado no meio de cultura líquido. Logo depois, em avaliação semelhante, substituíram o "fio de seda" por pérola de vidro como carreador de microrganismos para evitar a absorção do agente químico pelo suporte.

No início do século, Ridel & Walker (1903), propuseram um novo método de avaliação, baseado na comparação da atividade antimicrobiana de um novo produto com a de uma solução de ácido fênico, em condições estandardizadas, quanto ao tempo, à concentração, à temperatura e ao meio de cultura. Esse método, denominado de Coeficiente Fenólico, é até hoje utilizado para

avaliação e controle dos agentes químicos desinfetantes e anti--sépticos.

Com a descoberta dos antibióticos por Fleming, em 1929, novos métodos de avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* foram introduzidos no arsenal de controle dos agentes químicos, tanto em meio líquido, como em meio sólido.

Posteriormente, verificou-se que além de seres microscópicos (bactérias e fungos) outros, pluricelulares como os vegetais tanto inferiores (algas e líquens) quanto superiores, também eram capazes de sintetizar substâncias antimicrobianas como metabólitos. Essas substâncias foram denominadas de fitoncidas, quando produzidas pelos vegetais superiores, e protobióticos, quando sintetizadas por algas e líquens.

Assim, a pesquisa da atividade antimicrobiana dos vegetais superiores *in vitro* tem sido efetuada através dos tempos, por pesquisadores de vários países, principalmente pelos orientais.

Entre nós, um dos pioneiros a estudar, sistematicamente a atividade antimicrobiana foi Oswaldo Gonçalves de Lima do Instituto de Antibióticos de Pernambuco, que pesquisou várias plantas brasileiras, em especial as madeiras de lei, e substâncias delas isoladas. Verificou que a resistência natural destas madeiras aos agentes responsáveis pela destruição era em decorrência da presença de certas substâncias. Esses resultados motivaram outros pesquisadores e justificam a

pesquisa da atividade antimicrobiana de vegetais superiores em outras numerosas investigações (LACAZ, 1975).

A avaliação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos de plantas e substâncias delas isoladas passou a ser realizada por métodos de difusão (qualitativos) ou pelos métodos de diluição (quantitativos). Os de difusão são realizados em meio sólido, podendo ser empregados discos de papel, cilindros ou orifícios no meio de cultura, impregnados ou contendo extratos ou substâncias puras. O uso de discos impregnados é o método mais empregado para a triagem microbiológica sendo, inclusive, recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, devido a sua facilidade, reprodutibilidade e baixo custo (ROCHA et al.,1974; BARRY, 1976; PIDDOCK, 1990).

O método da difusão (cavidade-placa), também muito empregado, foi utilizado para o estudo do antibiograma por Erlanson (1951). Nesse teste, adiciona-se às placas de Petri, uma primeira camada do meio de cultura e, após a sua solidificação, adiciona-se uma segunda. Os microrganismos podem ser inoculados tanto na primeira camada como na segunda, pelas técnicas de pour-plate, inundação ou superfície (estria radial).

Dentre os diversos métodos de semeadura, utilizou-se a técnica de pour-plate que apresenta um crescimento uniforme e confluente do microrganismo.

No laboratório, durante as determinações da atividade antimicrobiana, verificamos que ela depende de numerosos fatores, tais como: métodos de obtenção de produtos naturais, cepas de microrganismos usados, idade, densidade do inóculo microbiano e tipo de teste empregado. Notamos que os testes de difusão do disco ou método do poço são essencialmente qualitativos, quando empregados com extratos ou compostos recém--obtidos, enquanto que o teste da diluição em ágar, ou em caldo, são adequados para a quantificação. Assim, em nossas determinações, empregando o método do poço, observamos como aqueles fatores acima citados, poderiam interferir na determinação da atividade antimicrobiana das espécies vegetais por nós selecionadas.

Os métodos de extração mais utilizados para a obtenção de extratos vegetais, segundo a literatura consultada, são: extração a quente (extração contínua em aparelho de Soxhlet e maceração) e extração a frio (percolação).

Assim, em nossos experimentos, utilizamos o processo de maceração e percolação com diversos solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade.

Trabalhamos de maneira asséptica e adequada sem usar a filtração, pois os filtros podem interferir retendo as substâncias inibidoras de crescimento bacteriano, encontradas nos extratos e frações e sem aquecimento, porque poderia alterá-las.

Dentre os vários métodos de avaliação da atividade antimicrobiana in vitro pesquisados, elegemos o da difusão em ágar (cavidade-placa) de camada dupla, como preconizado por GROVE & RANDALL (1955), uma vez que oferece ótimas condições de crescimento para todos os microrganismos testados e boa reprodutibilidade dos resultados. Esse método consiste na difusão da droga em meio sólido, formando um gradiente de concentração da mesma a partir do seu ponto de aplicação. Assim, quanto mais distante do ponto de aplicação da droga, menor sua concentração. Portanto, quanto mais longe do ponto de aplicação da droga, for inibido o crescimento de determinado microrganismo, maior será a sensibilidade deste à referida droga.

Utilizamos o meio AM nº1 (Antibiotic Medium - Difco) por apresentar pH 6,6, o qual não impedia a difusibilidade dos extratos, que apresentavam pH em torno de 6,5. Verificamos que, quando utilizamos ágar Müller-Hinton (pH 7,0 - Difco), não havia a difusibilidade das amostras, ou o diâmetro dos halos de inibição eram menores do que os observados com o ágar AM nº1.

Assim sendo, concluímos que a atividade antimicrobiana apresentada pelos produtos naturais obtidos era pH dependente.

Para a formação da camada dupla, utilizamos o mesmo meio de cultura para não alterarmos o pH. Esse mesmo procedimento é utilizado para o doseamento de certos antibióticos, como é o caso

da anfotericina B, ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, neomicina, entre outros, que necessitam do mesmo meio de cultura para a formação da camada dupla.

Dos trabalhos relatados na última década, apenas GUTKIND et al. (1981) afirmaram que a determinação da atividade antimicrobiana in vitro depende do pH do meio de cultura. Considerando a sua importância, utilizaram como meio de cultura o AM nº1. Por outro lado, ODELOLA & OKOROSOBO (1988) verificaram que a atividade era independente do pH do meio de cultura, mas reconheceram que, no caso de antibióticos, é de fundamental importância. Entretanto, vários pesquisadores utilizaram ágar Müller-Hinton, e não relataram a influência do pH do meio na determinação da atividade antimicrobiana de vegetais superiores (LAURENS et al., 1982; MARHUENDA & GARCIA, 1985; MOUREY et al., 1985; BASTIDE et al., 1987; CÁCERES et al., 1987; HORIBA et al., 1991).

Os nossos resultados, porém, falam a favor da necessidade de se testar a atividade em diferentes meios de cultura com diferentes pH, para comprovar a existência da atividade antimicrobiana em vegetais superiores utilizados pela medicina popular.

Quanto aos indicadores biológicos da atividade antimicrobiana in vitro, tanto de agentes químicos (desinfetantes, anti--sépticos, quimioterápicos, antibióticos) quanto de agentes físicos (autoclave e forno) é recomendado o uso de um

da anfotericina B, ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, neomicina, entre outros, que necessitam do mesmo meio de cultura para a formação da camada dupla.

Dos trabalhos relatados na última década, apenas GUTKIND et al. (1981) afirmaram que a determinação da atividade antimicrobiana in vitro depende do pH do meio de cultura. Considerando a sua importância, utilizaram como meio de cultura o AM nº1. Por outro lado, ODELOLA & OKOROSOBO (1988) verificaram que a atividade era independente do pH do meio de cultura, mas reconheceram que, no caso de antibióticos, é de fundamental importância. Entretanto, vários pesquisadores utilizaram ágar Müller-Hinton, e não relataram a influência do pH do meio na determinação da atividade antimicrobiana de vegetais superiores (LAURENS et al., 1982; MARHUENDA & GARCIA, 1985; MOUREY et al., 1985; BASTIDE et al., 1987; CÁCERES et al., 1987; HORIBA et al., 1991).

Os nossos resultados, porém, falam a favor da necessidade de se testar a atividade em diferentes meios de cultura com diferentes pH, para comprovar a existência da atividade antimicrobiana em vegetais superiores utilizados pela medicina popular.

Quanto aos indicadores biológicos da atividade antimicrobiana in vitro, tanto de agentes químicos (desinfetantes, anti--sépticos, quimioterápicos, antibióticos) quanto de agentes físicos (autoclave e forno) é recomendado o uso de um

representante dos Gram-positivos (Staphylococcus e Micrococcus luteus) e de Gram-negativos (Escherichia coli), principalmente na fase da triagem. Uma vez observada a atividade, recomenda-se o uso de outros microrganismos mais resistentes à ação dos agentes. Além disso, é sugerido efetuar os testes baseados na aplicação em campo ou seja, com cepas de microganismos do local/localidade.

No caso de fitoncidas, de acordo com JIMENEZ-VALERA et al. (1985), NAMBA et al. (1981, 1982) e BURAS et al.(1986), os microrganismos indicadores são escolhidos de acordo com o uso popular da planta em estudo.

A escolha da cepa padrão dos microrganismos foi realizada, atendendo às normas empregadas para agentes químicos e local (campo) em decorrência do uso popular das ipomoeas contra afecções da pele. Assim sendo, foram utilizados microrganismos envolvidos na etiologia de dermatoses.

Para a triagem in vitro, utilizou-se como microrganismos indicadores Staphylococcus epidermidis e Micrococcus luteus, cepas padrão de ATCC. Após verificada a ação antimicrobiana frente a esses dois microrganismos utilizamos outros microrganismos: Sthaphylococcus aureus e Escherichia coli como representante dos Gram-negativos, enquanto que para a determinação da CIM foram empregados 25 microrganismos indicadores, sendo alguns de cepas padrão de ATCC e cepas de campo, representantes dos Gram-positivos e Gram-negativos e alguns fungos em forma de levedura (Tabela 7).

A análise da literatura revela que a escolha e o número de microrganismos utilizados na triagem antimicrobiana **in vitro** de fitoncidas varia de autor para autor. KHAN et al. (1980) utilizaram como microrganismo indicador apenas o Staphylococcus aureus e Escherichia coli, para a triagem de 134 extratos percententes a 41 famílias usadas popularmente na Tailândia. Já ANDARY et al (1981) empregaram 25 cepas de fungos responsáveis pela contaminação de alimentos.

Quanto à padronização dos inóculos bacterianos, utilizamos a escala de MacFarland para a padronização das suspensões, na concentração de cerca de 10^6 a 10^7 UFC/ml, para que o tamanho do inóculo não interferisse na atividade antimicrobiana. A densidade do inóculo é a variável mais importante na determinação da atividade antimicrobiana, especialmente quando se utilizam microrganismos que produzem enzimas capazes de inativar substâncias. Assim sendo, quanto maior o inóculo, maior será a produção de enzimas, da mesma forma maior também será a probabilidade da bactéria ser resistente à concentração da substância testada. Por outro lado, quanto menor o tamanho, maior a probabilidade da bactéria ser sensível, podendo interferir na reprodutibilidade dos resultados.

A temperatura e o tempo de incubação são também fatores determinantes na avaliação da atividade. Portanto, houve a necessidade de padronizá-los, uma vez que utilizamos vários microrganismos indicadores. A temperatura adequada para o

crescimento dos indicadores foi de 37°C, a qual está de acordo com a encontrada na literatura consultada, que é de 35°C a 37°C. Em relação ao tempo de incubação este foi de 18 a 24 horas, pois alguns microrganismos reproduzem-se mais ativamente do que outros, não havendo, neste caso, tempo para formar o gradiente de concentração, que deve ocorrer simultaneamente ao crescimento microbiano. Assim, as placas eram deixadas em repouso durante aproximadamente 20 minutos, à temperatura ambiente, para ocorrer a pré-difusão, promovendo a formação do gradiente, concomitante ao crescimento microbiano.

Não utilizamos dados numéricos para a medida do diâmetro do halo de inibição no método de difusão (qualitativo), porque não sabemos a capacidade de difusão dos extratos, frações e substâncias isoladas. Este procedimento é somente útil na comparação da atividade de um único extrato ou substâncias dele isoladas, quando existe alguma informação do coeficiente de difusão das mesmas. Em decorrência disso, atribuímos sinal positivo (+), quando apresentava halo de inibição ao redor dos discos/cavidades, e negativo (-), quando não havia a formação de halo de inibição.

Quanto à família Convolvulaceae, alguns autores determinaram a atividade antimicrobiana do gênero Convolvulus e Ipomoea, contra vários microrganismos (CHESNE et al., 1984; ALMAGBOUL et al., 1985a, c; NADIR et al., 1986; RIZVI et al., 1987 e JAWAD et al., 1988a). Entretanto, nenhum relatou a atividade das espécies

por nós selecionadas.

Em relação a coleta em diferentes estações do ano (inverno e primavera), não notamos nenhuma diferença na atividade antimicrobiana, isso talvez seja em virtude de I. cairica ser uma planta anual (ciclo de 120 dias). Enquanto MOUREY et al., (1985) e ODELOLA & OKOROSOBO (1988) demonstraram a influência sazonal em algumas plantas.

A triagem da atividade antimicrobiana in vitro, efetuada com os extratos brutos de Ipomoea cairica, Ipomoea pes-caprae e Ipomoea phyllomega, demonstrou que essas espécies inibiam o crescimento de Staphylococcus epidermidis tanto quanto o de Micrococcus luteus, utilizados como microrganismos indicadores. Como a Ipomoea cairica é ubíqua, ou seja, freqüente na região, de fácil coleta e também por ser uma planta invasora de culturas, nós a escolhemos para a continuidade do estudo.

Em relação às substâncias SP-1 e SP-2, obtidas de Ipomoea cairica, verificamos que apresentavam teste positivo para alcalóides, muito embora, não tenhamos efetuado extração específica para alcalóides. E quanto à elucidação estrutural das mesmas, esta ainda não foi concluída.

Informamos que as substâncias SP-1, SP-2.1 e SP-2.2, foram enviadas para o Dr. Bhupesh C. DAS do Instituto de Química de Substâncias Naturais da França - Fr, por intermédio do Dr. R. MUKHERJEE, que aceitou efetuar a análise das mesmas.

VII. CONCLUSÃO

Os nossos resultados permitem concluir que:

1. Os métodos de extração, percolação e maceração não apresentaram diferença significante na atividade antimicrobiana contra os microrganismos indicadores.

2. Os extratos, frações e substâncias delas isoladas só apresentavam ação inibitória a pH 6,6, portanto a ação bacteriostática/bactericida era pH dependente.

3. Em relação a atividade apresentada pelos extratos, frações e substâncias delas isoladas, observamos que:

   3.1. Os microrganismos Gram-negativos foram mais sensíveis do que os Gram-positivos para o extrato acetatoetílico de Ipomoea cairica.

   3.2. Para as frações e substâncias isoladas (SP-1 e SP-2), os microrganismos Gram-positivos foram mais sensíveis do que os Gram-negativos.

   3.3. A ação antimicrobiana de SP-1 e SP-2 foi maior contra os fungos em forma de levedura, com CIM de 60,0ug/ml.

4. Este trabalho corrobora com a sabedoria e o emprego popular de algumas espécies de Ipomoea como agentes antinfecciosos.

5. Quanto às substâncias, SP-1 e SP-2, isoladas de Ipomoea cairica, acreditamos que são nitrogenadas, provavelmente alcalóides de núcleo indólico e inéditas.

VIII. RESUMO

Foi realizada a triagem da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos brutos de Ipomoea cairica, Ipomoea pes-caprae, Ipomoea phyllomega pelo método de difusão em ágar pelas técnicas de cavidade-placa e disco-placa. Estas espécies de Convolvulaceae, utilizadas na medicina popular nordestina, foram ensaiadas contra Staphylococcus aureus e Micrococcus luteus, selecionados como microrganismos indicadores.

Após esta triagem, elegemos a Ipomoea cairica para a continuação do estudo da atividade antimicrobiana. As partes aéreas da referida espécie foram coletadas em setembro de 1990, nos arredores da cidade de Ribeirão Preto, estado de São Paulo, secas e pulverizadas, e extraídas por percolação com acetato de etila. O extrato bruto, assim obtido, foi submetido a fracionamento cromatográfico e isolou-se 2 substâncias codificadas como SP-1 e SP-2.

A ação antimicrobiana destes produtos foi avaliada pelo método de difusão em ágar, utilizando-se Antibiotic medium nº1 (pH 6,6), como meio de cultura, pela técnica de cavidade--placa em camada dupla como preconizado por GROVE & RANDALL (1955). Selecionou-se Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus luteus e Escherichia coli como microrganismos indicadores, com uma suspensão do inóculo de 10^6 a 10^7 UFC/ml, padronizada pela metade da escala de MacFarland. Foram confeccionados poços de 6,0mm de diâmetro e adicionados 50,0ul das amostras solubilizadas em DMSO/H_2O (1:1) para obter

uma concentração de 15,0mg/ml. Foi atribuído o sinal positivo (+), quando as amotras apresentavam halo de inibição ao redor dos poços, e sinal negativo (-), quando não apresentavam halo de inibição. Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foi utilizado o método da diluição em ágar AM nº1 frente a 25 microrganismos, semeados através de multiaplicador de Steer, na superfície do ágar, em forma de pontos. O extrato acetatoetílico e frações cromatográficas dele obtidas foram testadas nas concentrações de 20,0; 10,0; 5,0; 2,5 e 1,25mg/ml. As substâncias SP-1 e SP-2 isoladas das frações foram testadas nas concentrações de 1.000,0; 500,0; 250,0; 125,0 e 62,5ug/ml. A menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano foi considerada a CIM.

Verificou-se que a atividade antimicrobiana era pH dependente, ou seja, a atividade dos extratos, frações e substâncias SP-1 e SP-2 só foi evidenciada quando utilizou-se um meio de cultura com pH em torno de 6,6. Os extratos e frações de Ipomoea cairica foram ativos tanto para bactérias Gram-positivas, quanto para as Gram-negativas, quando utilizou-se o método de difusão em ágar pela técnica de cavidade - placa.

A CIM dos extratos e frações foi de 1,0mg/ml para Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus luteus, Enterobacter da saliva, Pseudomonas aeruginosa de canal, Candida albicans da pele, Candida parapsilosis, Candida

guilliermondii, Rhodotorulla e Candida krusei, e de 60,0ug/ml para as substâncias SP-1 e SP-2 contra Microccus luteus, Enterobacter da saliva, Candida parapsilosis, Candida guilliermondii e Rhodotorulla.

IX. SUMMARY

The antimicrobial activity of crude extracts of Ipomoea cairica, Ipomoea pes-caprae and Ipomoea phyllomega was tested in vitro on Staphylococcus aureus and Micrococcus luteus used as indicator microorganisms, employing agar gel immunodiffusion by the well-plate and disk-plate techniques. Some species of Convolvulaceae were used in folkloric medicine.

After microbiological screening, Ipomoea cairica was selected for the study of antimicrobial activity. The aerial parts of I. cairica were colleted in September 1990 from the surroundings of Ribeirão Preto, a city located in the northern part of the state of São Paulo. The material was dried and pulverized and extracted by percolation using ethyl acetate as solvent. The crude extract thus obtained was chromatographed and two substances names SP-1 and SP-2 were obtained.

The antimicrobial action of these substances was evaluated by agar diffusion using Antibiotic Medium nº1, pH 6.6, as culture medium. The substances were tested against Staphylococcus aureus, Sthapylococcus epidermidis, Micrococcus luteus and Escherichia coli used as indicator microorganisms in an inoculum suspension of 10^6 to 10^7 CFU/ml standardized by half the MacFarland scale, employing the double-layer well-plate technique recommended by GROVE & RANDALL (1955). Wells measuring 6mm in diameter were prepared and 50.0ul of the samples were added after solubilization in DMSO/H_2O (1:1) in order to obtain a concentration of 15.0mg/ml. A positive sign was assigned when

the samples presented an inhibition halo around the wells, and a negative sign was assigned when the halo was not present.

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by dilution on AM nº 1 agar in the presence of microorganisms inoculated onto the agar surface as points using a Steer multiapplicator. The ethyl acetate crude extract and the chromatographic fractions were tested at concentrations of 20,0, 10.0, 5,0, 2,5 and 1,25mg/ml, and substances SP-1 an SP-2 at concentrations of 1000,0, 500.0, 250,0, 125.0 and 62,5ug/ml, and the lowest concentration capable of inhibiting microbial growth was considered to be the MIC.

The antimicrobial activity was found to be pH dependent, i.e., the activity of extracts, fractions and substances SP-1 an SP-2 was detected only when the culture medium was used at pH 6,6 I. cairica extracts and fractions were active against both Gram--positive and Gram-negative bacteria when agar diffusion was used by the well-plate technique.

The MIC of extracts and fractions was 1,0mg/ml against Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Micrococcus luteus, saliva Enterobacter, canal Pseudomonas aeruginosa, skin Candida albicans, Candida parapsilopsis, Candida quilliermondii, Rhodotorulla and Candida krusei, and the MIC of substances SP-1 and SP-2 was 60,0ug/ml against Micrococcus luteus, saliva Enterobacter, Candida parapsilopsis, Candida quilliermondii and Rhodotorulla.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-CHAAR, C.I. Alkaloids of an Ipomoea seed commoly know as kaladana in Pakistan. Leban. Pharm. J., v.9, p.93-109, 1967.

AGRA,M.F. Contribuição ao estudo das plantas medicinais na Paraíba. Cien. Cult.,v.33, p.64-6, 1980.

AJAO, A. O.; EMELE, F. ; ONADEKO, B. F. Antibacterial activity of Euphorbia hirta. Fitoterapia, v.56, p.165-67, 1985.

ALARCON DE LA LASTRA, C.; MARTIN, M. J.; DELGADO, F.; MARHUENDA, E.; MENENDEZ, M. Isolement des acides phénols caféique et chlorogénique et de l'orcinol de Dittrichia viscosa (L.) W. Greuter. Étude de l'activité antimicrobienne. Plant. Med. Phytother, v.22, n.1, p.11-16, 1988.

ALMAGBOUL, A.; FAROUK, A; BASHIR, A.; KARIM, A. ; SALIH, M. Antimicrobial activity of certain sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity. (II). Fitoterapia, v.56, n.2, p.103-09, 1985a.

ALMAGBOUL, A. Z.; FAROUK, A.; BASHIR, A. K.; KARIM, A.; SALIH, M. Antibacterial activity of sudanese plants used in folkloric medicine (III). Fitoterapia, v.56, n.4, p.195-200, 1985b.

ALMAGBOUL, A. Z.; BASHIR, A. K.; FAROUK, A.; KARIM, A.; SALIH, M. Antimicrobial activity of certain sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity (IV). Fitoterapia, v.56, n.6, p.331-37, 1985c.

ALMAGBOUL, A. Z.; BASHIR, A. K.; KARIM, A.; SALIH, M.; FAROUK, A. ; KALID, S. A. Antimicrobial activity of certain sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity (V). Fitoterapia, v.59, n.1, p.57-62, 1988.

AL-MESHAL, I. A.; MOSSA, J. S.; AL-YAYA, M. A.; KHATIBI, A.; HAMMOUDA, Y. Phytochemical and biological screening of Saudi medicinal plants. I. Fitoterapia, v.53, p.79-84, 1982.

AL-SHAMMA, A. ; MITSCHER, L. A. Comprehensive survey of indigenous Iraqi plants for potential economic value. I. Screening results of 327 species for alkaloids and antimicrobial agents. J. Nat. Prod., v.42, n.6, p.633-42, 1978.

ANDARY, C. ; ROUSSEL, J.L.; MOTTE, M.E. ; RASCOL, J.P. ; PRIVAT,G. Activité antifongique comparée de divers esters de l' acide dihydroxy - 3,4 cinnamique. Cryptog. Mycol., v.2, p.119-30, 1981.

ARAÚJO, C. C.; PAULO, M. Q.; MAIA, R. F.; LIMA, E. O. Avaliação de atividade antimicrobiana do composto 5,7, 2, 5 - tetracetoxi - 4 - fenilcumarina obtido a partir de Coutarea hexandra (Rubiaceae). Rev. Microbiol., v.19, n.2, p.177-79, 1988.

BANERJEE,S.K.; BHATNAGAR, S.P. Indole bases of some seeds of Ipomoea species. Ind. J. Pharm., v.36, n.2, p.44-6, 1974.

BARBAGALLO, C.; MAUGERI, T. L.; MELI, R.; PAVONE, P.; SCOGLIO, M. E. Attivitá antibatterica della radice di Astragalus siculus Biv. Fitoterapia, v.52, p.87-90, 1981.

BARRY, A.L. The Antimicrobiotic Susceptibility Test. Principles and Practices. Philadelphia, Lea & Febiger, 1976.

BASTIDE, P.; MALHURET, R.; CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P.; MICHET, A. Correlation composition chimique et activité antimicrobienne. II. Activité de trois huiles essentielles de résinoux vis - á - vis de deux souches bactériennes. Plant. Med. Phytother., v.21, n.3, p.209-17, 1987.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., v.45, p.493-96, 1966.

BLOCK, S.S. Historical Review. In. BLOCK,S.S. Desinfection, Sterilization and Preservation. 3ª ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983, p. 868-76.

BOILY, Y. ; van PUYVELDE, L. Screening of medicinal plants of Rwanda (Central Africa) for antimicrobial activity. J. Etnopharmacol., v.16, p.1-13, 1986.

BURAS, J. S.; MOREIRA, E. A.; GODOY, G. F.; NAKASHIMA,T. ; MIGUEL, O. G. Verificação da sensibilidade bacteriana aos princípios ativos de Siphocampylus verticillatus (Cham.) G. DON, Campanulaceae. Trib. Farm., v.54, n.6, p. 1-42, 1986.

CÁCERES, A.; GIRÓN, L. M.; ALVARADO, S. R.; TORRES, M. F. Screening of antimicrobial activity of plants populary used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. J. Ethnopharmacol., v.20, p.223-37, 1987.

CASTRO,J.L. Medicina Vegetal: Teória e Prática conforme a Naturopatia. 2. ed. Portugal, Publicações Europa - América, 1981. Cap. 1, p.13-19: Historiologia Botânica.

CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. Ph.; MICHET, A.; BASTIDE,P.; MALHURET, R. Corrélation composition chimique activité antimicrobienne. III. Influence du vieillissement naturel et provoqué sur l' activité de trois huiles essentielles de résineux vis - á - vis d' Escherichia coli. Pl. Med. Phytother., v.21, n.3, p.218-35, 1987.

CHESNE, C.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Étude de l'activité antifongique de plantes supérieures. III. Étude comparative de techniques d'isolement d'un saponoside antifongique des parties aériennes du Polygala vulgaris. L. Pl. Med. Phytother., v.17, n.4, p.191-201, 1983.

CHESNE, C.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Étude de l'activité antifongique de plantes supérieures. Action de 49 plantes indigenes sur 11 champignons phytopathogenes. Ann. Pharm. Far., v.42, n.1, p.27-33, 1984.

CHIAPPETA, A. A.; DIU, M. B. S.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Antimicrobial activity of Solanum viarum extracts. Fitoterapia, v.59, n.3, p.247-48, 1988.

COSAR, G.; BILGEHAN, H.; CUBUKUÇU, B. Antibacterial and antifungal activities in Berberidaceae. Ecz. Fak. Med., v.19, p.15-25, 1983.

CORREA, P.M. Dicionário de Plantas Utéis do Brasil. Rio de Janeiro, 1969. v.VII.

COSTA,A. Níveis de Rifampicina e de Canamicina no Soro e Perilinfa de Cobaias (Cavia cobaya). Ribeirão Preto, 1973. 82p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

CRONQUIST, A. An Integrated System Classification of Florening Plants. New York, Columbia University Press, 1981.

Der MARDEROSIAN, A.; CHO, E. ; CHAO, J.M. The isolation and identification of the ergoline alkaloids from Ipomoea muelleri. Planta Med., v.25, p.6-16, 1974.

DÖBEREINER,J. ; TOKARNIA, C.H. ; CANELLA, C.F.C. Intoxicação experimental pela "Salsa" (Ipomoea asarifolia R. et Schult.) em ruminantes. Arq. Inst. Biol. Animal, v.3, p.39-57, 1960.

DUBEY, P.; KHARE, N. ; GUPTA, P.C. A new flavonoid glycoside from the leaves of Ipomoea fistulosa. Curr. Sci., v.51, n.7, p.351-52, 1982.

FALCÃO, W.F.A.; FALCÃO,J. I. A. Contribuição ao estudo das Convolvulaceas de Pernambuco. Rodriguesia, v.30, n.45, p.63-97, 1978.

FAROUK, A.; BASHIR, A. K. ; SALIH, A. K. M. Antimicrobial activity of certain sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity. I. Fitoterapia, v.54, p.3-7, 1983.

FRANZBLAU, S. G.; CROSS, C. Comparative in vitro antimicrobial activity of chinese medicinal herbs. J. Ethnopharmacol., v.15, p.279-88, 1986.

GAZI, M.I. The finding antiplaque features in Acacia arabica type of chewing gum. J. Clin. Periodontal., v.18, p.75-7, 1991.

GNAN, S. O.; SHERIHA, E. M. Antimicrobial activity of (+)-tuberine. J. Food Prot., v.49, n.5, p.340-41, 1986.

GOULTSCHIN, J. ; PALMON, S. ; SHAPIRA, L. ; BRAYER,L. GEDALLA,I. Effect of glycyrrhizin containing toothpaste on dental plaque reduction and gingival health in humans. J. Clin. Periodontal., v.18, p.210-12, 1991.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. V. Antibacterial properties of propolis (bee glue). J. R. Soc. Med., v.83, p.159-60, 1990.

GRÖEGER, D. The occurrence of ergolene derivates in Ipomoea species. Flora, v.153, n.2, p.353-82, 1963.

GROVE, D.C.; RANDALL,W.A. Assay Methods of Antibiotics. In: Enciclopedia Medical. New York, 1955.

GUÉRIN, J. C. ; RÉVEILLÉRE, H. P. Activité antifongique d' extraits vegétaux á usage thérapeutique. I. Étude de 41 extraits sur 9 souches fongiques. Ann. Pharm. Fr., v.42, n.6, p.553-59, 1984.

GUÉRIN, J. C. ; RÉVEILLÉRE, H. P. Activité antifongique d'extraits végétaux à usage thérapeutique. II. Étude de 40 extraits sur 9 souches fongiques. Ann. Pharm. Fr., v.43, n.1, p.77-81, 1985.

GUTKIND, G. O.; MARTINO, V.; GRANA, N.; COUSSIO, J. D.; TORRES, R. A. Screening of South American plants for biological activity. L. Antibacterial and antifungical activity. Fitoterapia, v.52, p.213-18, 1981.

HATTORI, M.; MIYACHI, K.; SHU, Y. Z.; KAKIUCHI, N.; NAMBA, T. Studies on dental caries prevention by traditional medicines (IX). Potent antibacterial action of cumarin derivatives from Licorice roots against Streptococcus mutans. Shoyakugaku Zasshi, v.40, n.4, p.406-12, 1986.

HEISEY, R.M. ; GORHAM, B.K. Antimicrobial effects of plant extracts on Streptococcus mutans, Candida albicans, Trichophyton rubrum and other micro-organisms. Let. Appl. Microbiol., v. 14, p. 136-39, 1992.

HOEHNE, F.C. Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais. São Paulo, Graphycars, 1939.

HORIBA, N.; MAEKAWA, Y.; ITO, M.; MATSUMOTO, T.; NAKAMURA, H. A pilot of japanese green tea as a medicament: Antibacterial and bactericidal effects. J. Endod., v.17, n.3, p.122-24, 1991.

IYER, C. S. R.; SHAH, G. D.; CHATTERJEE, A. Chemical investigation of Ipomoea fistulosa: isolation, structure and synthesis of marsilin. Ind. J. Chem., v.12, n.3, p.281-83, 1974.

JAFFER, H. J.; MAHMOUD, M. J.; JAWAD, A. M.; NAJI, A.; AL-NAIB, A. Phytochemical and biological screening of some Iraqi plants. Fitoterapia, v.59, n.3, p.229-33, 1988.

JAWAD, A. M.; JAFFER, H. J.; AL-NAIB, A.; NAJI, A. Antimicrobial activity of sesquiterpene lactone and alkaloids fractions from Iraqi plants. Inst. J. Crude Res., v.26, n.4, p.185-88, 1988a.

JAWAD, A. L. M.; MAHMOUD, M. J. ; AL-NAIB, A. Antimicrobial activity of Xanthium strumarium extracts. Fitoterapia, v.59, n.3, p.220-221, 1988b.

JIMENEZ-VALERA, M.; RUIZ-BRAVO, A.; RAMOS-CORMEZANA, A. Actividad antimicrobiana frente a Yersinia enterocolítica en plantas superiores. Microbiol. Espan., v.38, n.3/4, p.67-71, 1985.

JIRAWONGSE, V.; PHARADAI, T.; TANTIVATANA, P. The distribuition of indols alkaloids in certain genera of Convolvulaceae growing in Thailand. J. Nat. Res. Coun. Thailand, v.9, n.1, p.17-24, 1977.

KINOSHITA - GOUVEA, L.S. ; MACIAS, L. Flora fanerogâmica da reserva do parque estadual das fontes do Ipiranga (São Paulo). Convolvulaceae. Hoehnea, v.12, p.86-90, 1985.

KHAN, M. R.; NDAALIO, G.; NKUNYA, M. H. H.; WEVERS, H.; SAWHNEY, A. N. Studies on African medicinal plants part. I. Preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. Planta Med., p. 91-7, 1980. Supplement.

KUBO, I.; TANIGUCHI, M.; CHAPYA, A.; TSUJIMOTO, K. An insect antifeedant and antimicrobial agent from Plumbago capensis. Planta Med., p.185-87, 1980. Supplement.

KUBO, I.; HIMEJIMA, M. Anethole, a synergist of polygodial against filamentous microrganisms. J. Agric. Food Chem., v.39, n.12, p.2290-292, 1991.

KUBO, I.; MUROI, H. ; HIMEJIMA, M. Antimicrobial activity of green tea flavor components and their combination effects. J. Agric. Food Chem., v.40, n.2, p.245-48, 1992.

LACAZ, C.S. Antibioticos. 3ª ed. São Paulo. Edgard Blucher, 1975.

LAURENS, A.; MBOUP, S.; GIONO-BARBER, P.; SYLLA, O.; DAVID-PRINCE, M. Étude de l'action antibactérienne d'extraits d'Anacardium occidentale L. Ann. Pharm. Fr., v.40, n.2, p.143-46, 1982.

LAURENS, A.; MBOUP, S.; TIGNOKPA, M.; SYLLA, O.; MASQUELIER, J. Activité antimicrobienne de quelques espèces médicinales des marchés Dakarois. Pharmazie, v.40, p.482-84, 1985.

Le GRAND, A.; WONDERGEM, P. A.; VERPOORTE, R.; POUSSET, J. L. Anti-infectious phytotherapies of the tree - savannah of Senegal (West-Africa) II. Antimicrobial activity of 33 species. J. Ethnopharmacol., v.22, p.25-31, 1988.

LIMA, E. O.; MAIA, R. F. Investigação da ação quimioterápica da Waltheria viscosissima contra microrganismos. CCS, v.6, n.1, p.23-7, 1984.

LORENTI, A. S.; VIALE, A. A.; BUSCHI, C. A.; GONZALEZ, M. D.; SCHTEINGART, C. D.; IRIBARREN, A. M.; POMILIO, A. B. Antimicrobial activity of some Argentine higher plants. Fitoterapia, v.82, n.2, p.81-6, 1982.

LORENZI, H. Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas, Tóxicas e Medicinais. São Paulo, Nova Odessa, 1982.

MAHMOUD, Z. Antimicrobial components from Maclura pomifera fruits. Planta Med., v.42, p.299-301, 1981.

MAHMOUD, M. J.; JAWAD, A. L. M.; HUSSAIN, A. M.; AL-OMARI, M.; AL-NAIB, A. In vitro antimicrobial activity of Salsola rosmarinus and Adiantum capillus-veneris. Inst. J. Crude Drug Res., v.27, n.1, p.14-6, 1989.

MARHUENDA, E.; GARCIA, M. D. Mise en évidence des propriétes antimicrobiennes des sommités fleuries d' Ononis natrix L. Identification de l'acide férrulique. Pl. Med. Phytother., v.19, n.3, p.163-72, 1985.

MITSCHER, L. A.; LEU, R. P.; BATHALA, M. S.; WU, W. N.; BEAL, J. Antimicrobial agents from higher plants. I. Introduction, rationale, and methodology. Lloydia, v.35, n.2, p.157-66, 1972.

MITSCHER, L. A.; GALLAPUDI, S. R.; OBURN, D. S.; DRAKE, S. Antimicrobial agents from higher plants: Two dimethylbenzisochromans from Karwinskia humboldtiana. Phytochemistry, v.24, n.8, p.1681-88, 1985.

MOSKALENKO, S. A. Preliminary screening of Far-Eastern ethnomedicinal plants for antibacterial activity. J. Ethnopharmacol., v.15, p.231-59, 1986.

MOUREY, M.; MORTIER, F.; MOUREY, A. Activité antimicrobienne d'extraits de feuilles de Ginkgo biloba L. Pl. Med. Phytother., v.19, n.4, p.270-76, 1985.

MUBARAK, S. I. M.; AL-SAMARRAI, A. M. H.; AL-SAWAH, D. A. H. Antimicrobial activity of Pteropyrum aucheri growing in Iraqui. Fitoterapia, v.59, n.4, p.317-19, 1988.

NADIR, M. T.; DHAHIR, ABDUAL-BAQI, J.; AL-SARRAJ, S. M.; HUSSEINS, W. A. The effect of different methods of extraction on the antimicrobial activity of medicinal plants. Fitoterapia, v.57, n.5, p.359-63, 1986.

NAMBA, T.; TSUNEZUKA, M.; BAE, K. H.; HATTORI, M. Studies on dental caries prevention by traditional chinese medicines. I. Screening of crude drugs for antibacterial action against Streptococcus mutans. Shoyakugaki Zasshi, v.35, n.4, p.295-302, 1981.

NAMBA, T.; TSUNEZUKA, M.; HATTORI, M. Dental caries prevention by traditional chinese medicines. II. Potent antibacterial action of Magnoliae cortex extracts against Streptococcus mutans. Planta Med., v.44, p.100-06, 1982.

NAQVI, B. S.; SHAIKH, D.; SHAIKH, R. Screening of pakistani plants for antibacterial activity. Pakistan J. Sci. Ind. Res., v.28, n.4, p.264-75, 1985.

NIWAGUCHI, T. ; INOUE, T. Chromatographyc separation of lysergic acid amide and isolysergic acid amide in Morning Glory seeds. J. Chromatog., v.43, p.510-12, 1969.

ODELOLA, H. A. ; OKOROSOBO, V. I. Preliminary investigation of in vitro antimicrobial activity of two nigerian Diospyros species (Ebenaceae). Afr. J. Med. Sci., v.17, p.167-70, 1988.

PEREIRA, N.A. Pesquisa de Produtos Naturais no Brasil: sua abrangência e perspectivas. Apresentado no II Encontro de Farmacognosia do Brasil, Curitiba - Pr, 1984.

PIDDOCK, L. J. V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. J. Appl. Bacteriol., v.68, p.307-18, 1990.

RIZVI, H. A.; YASMEEN, A.; MODAN, M. ; BADAR, Y. Screening of higher plants for antibacterial activity. Pakistan J. Sci. Ind. Res., v.30, n.3, p.215-20, 1987.

ROCHA, M.; ZULIANI, M. E.; TRABULSI, L. R. Antibiograma. Rev. Microbiol., v.3, n.1, p.51-60, 1972.

ROSS, S. A.; EL-KELTAWI, N. E.; MEGALLA, S. E. Antimicrobial activity of some egyptian aromatic plants. Fitoterapia, v.51, p.201-05, 1980.

SABAHI, M.; MANSOURI, S. H.; RAMEZANIAN, M.; GHOLAM-HOSEINIAN, A. Screening of plants from the southeast of Iran antimicrobial activity. Int. J. Crude Drug Res., v.25, n.2, p.72-6, 1987.

SAEKI, Y.; ITO, I.; SHIBATA, M.; SATO, Y.; OKUDA, K.; TAKAZOE, I. Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria. Bull. Tokyo dent. Coll., v.30, n.3, p.129-35, 1989.

SAKAR, M. K.; TAMER, A. U.; TOKUR, S. Antimicrobial activities of some Hypericum species growing in Turkey. Fitoterapia, v.59, p.49-52, 1988.

SANTOS Filho, D. Alcalóides de Nectandra megapotamica (Sprg.) Chodat et Hassler. (Lauraceae). Ribeiro Preto,1969. 53 p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

SANTOS Filho, D.; SARTI, S. J.; BASTOS, J. K.; LEITÃO FILHO, H. F.; MACHADO, J. O.; ARAÚJO, M. A. C.; LOPES, W. D. ; ABREU, J. E. Atividade antibacteriana de extratos vegetais. Rev. Ciênc. Farm., v.12, p.47-69, 1990.

SCHER, S.K. Botanicals - Myth and Reality. Cosm.Toil., v.106, p.65-76, 1991.

SCHULTES, R. E. Hallucinogens of plant origin. Science, v.163, p.245-54, 1969.

SCHULTES, R. E. Tropical american hallucinogens: Where are we going? Cien. Cult,. v.25, n.6, p.543-61, 1973.

SMOLENSKI, S.I. ; SILINIS, H. ; FARNSWORTH, N.R. Alkaloids screening. I. Lloydia, v.35, n.1, p.1-34, 1972.

STANESCU, U.; RISCALCIC, E.; GRICORESCO, E. Studiul fitochimic al semintelor speciei Ipomoea violacea (L.). Farmacia, v.21, n.12, p.719-29, 1973.

TABER, W. A.; VINING, L. C.; MEACOCK, R. A. Clavine and lysergic acid alkaloids in varieties of Morning Glory. Phytochem., v.2, p.65-70, 1963.

TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. ; CANELLA,C.F.C. Estudo experimental sobre a toxicidade do "Canudo" (Ipomoea fistulosa Mart.) em ruminantes. Arq. Inst. Biol. Animal, v.3, p.59-71, 1960.

TOMES, C. M.; VIALE, A. A.; BUSCHI, C. A.; ROH, R. D.; SCHTEINGARI, C. D.; INIGO, R. P. A.; ZALLOCHI, F. M.; POMILIO, A. B. Antimicrobial screening of some Argentine higher plants. II. Fitoterapia, v.57, n.1, p.46-50, 1986.

TWAIJ, H. A. A.; SALIH, F. M.; NADIR, M. T.; AZIZ, N. K. Antimicrobial and some pharmacological activity of Centaurea phyllocephala and Centaurea behen. Fitoterapia, v.57, n.1, p.41-5, 1986.

UJIKAWA, K.; PURCHIO, A. Substâncias antifúngicas, inibidoras de Aspergillus flavus e de outras espécies fúngicas, isoladas de Agave sisalina (Sisal). Cien. Cult., v.41, n.12, p.1218-24, 1989.

VERPOORTE, R.; TJIN ATSOI, A.; Van DOORNE, H.; BAERHEIM SVENDENSEN, A. Medicinal plants of Suriname. I. Antimicrobial activity of some medicinal plants. J. Ethnopharmacol., v.5, p.221-26, 1982.

WALKER, C. Effects of sanguinarine and Sanguinaria extracts on the microbiota associated with the oral cavity. J. Can. Dental Assoc., v.25, p.18-22, 1990. Supplement.

WILKINSON, R.E. ; HARDCASTLE, W.S. ; McCORMICK, C.S. Seed ergot alkaloids contents of Ipomoea hederifolia, Ipomoea quamoclit, Ipomoea coccinea and Ipomoea wrightii. J. Sci. Food Agric., v.39, p.335-39, 1987.

WITTERS, W. L. Extration and identification of clavine and lysergic and alkaloids from Morning Glories. Ohio. J. Sci., v.75, n.4, p.198-201, 1975.