



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

VICTOR HUGO ALVES DO NASCIMENTO

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS COM CAPACIDADE
ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE MURUCIZEIRO
(*Byrsonima crassifolia*) E INGAZEIRO (*Inga edulis*)**

Belém-PA
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

VICTOR HUGO ALVES DO NASCIMENTO

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS COM CAPACIDADE
ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE MURUCIZEIRO
(*Byrsonima crassifolia*) E INGAZEIRO (*Inga edulis*)**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de mestre

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Consuelo Lúcia Sousa de Lima

Belém-PA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nascimento, Victor Hugo Alves do, 1992-

Determinação de compostos com capacidade antimicrobiana dos extratos de folhas de murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) e ingazeiro (*Inga edulis*) /Victor Hugo Alves do Nascimento.- 2017.

Orientador: Consuelo Lúcia Sousa de Lima

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Belém, 2017

1. Produtos Naturais 2. Química orgânica 3. Muruci (Planta)
4. Química vegetal I. Título

CDD 22.ed. 547.7



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

VICTOR HUGO ALVES DO NASCIMENTO

DATA DA AVALIAÇÃO: ____ / ____ / ____

CONCEITO: _____

Banca examinadora:

Prof^ª. Dra. Consuelo Lúcia Sousa de Lima
FEA/ITEC/UFPA- Orientadora

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
FEA/ITEC/UFPA- Membro Interno

Prof^ª. Dra. Cintya de Oliveira Souza
MS/IEC/ Bacteriologia e Micologia- Membro Externo

Prof^ª. Dra. Lúcia de Fátima Henriques Lourenço
FEA/ITEC/UFPA- Membro Suplente

Belém-PA
2017

Dedico...
**À minha mãe (*in memoriam*), ao meu pai e minha
segunda mãe Lídia por *todo esforço para me dar o
melhor presente que poderia receber: a educação.*
Aos meus queridos irmãos, pelo imenso carinho.
*Amo vocês!***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a vida, saúde, disposição e por todas as oportunidades oferecidas, como esta que estou realizando. Obrigado por ser um DEUS fiel e mesmo sem que eu mereça, proporcionar coisas maravilhosas em minha vida.

À minha orientadora Consuelo Sousa, pelos ricos ensinamentos, pela paciência, apoio, compreensão, por ter confiado a mim este trabalho. Tenha certeza que saio amando mais ainda a microbiologia por sua causa e pela sua maneira de ensinar.

Aos professores Dr. Jesus Souza por toda estrutura de laboratório que me deu, por toda sua ajuda (principalmente em cromatografia) e pela confiança a mim concedida na realização deste projeto e Dra. Cintya Oliveira por ter me aceitado de paraquedas no Instituto Evandro Chagas (IEC) e por todo apoio, ensinamento, compreensão e paciência que teve comigo nesse último ano, que Deus lhe recompense com o Seu melhor.

Ao Instituto Evandro Chagas pela oportunidade de estágio e por toda estrutura oferecida.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa.

À minha mãe (*in memoriam*) Maria Alves, te carrego sempre em minha memória e coração. Seus ensinamentos e princípios ecoam em minha vida, carrego sempre um pouco de você por onde ando. Você é tudo para mim.

Ao meu pai, Célio Nascimento, meu grande amigo, espelho, pai-mãe, companheiro, que sempre investiu em meus estudos, e minha Tia-Mãe Lídia Alves, sou grato por ter você como minha segunda mãe, obrigado pelo apoio, orações, ensinamentos e confiança não só nesta etapa, mas em todos os momentos da minha vida. Vocês são a minha fortaleza e a razão da minha vida!

Aos meus queridos irmãos que sempre me incentivaram e apoiaram, mesmo nos momentos mais difíceis vocês sempre me ajudavam. Vocês são a razão para eu sempre continuar firme. Amo vocês!

Aos meus tios, especialmente tia Nice e Benimar, por me aceitarem na sua casa, me tratando sempre como um filho, que Deus os recompense maravilhosamente. Ao meu

tiozão Vanildo Alves (DOUTOR LAJICA), por tudo o que me ensinou, pela paciência e por sempre apoiar meus objetivos.

À Raiane Vieira pelo companheirismo, pelo apoio, paciência (muita), e por ser essa pessoa linda, com um coração maravilhoso e cheio de bondade. Você é a pessoa mais especial que apareceu na minha vida. Obrigado por tudo!

Ao meu amigo Jean Aquino, por tudo, são tantas coisas que não dá para descrever tudo aqui. Mano te amo, que nossa amizade dure eternamente. Você já é minha família.

À Lauana Pantoja-Mendes, por todo apoio, companheirismo, por ser essa amiga maravilhosa, que faz o possível e o impossível para me ajudar. Obrigado por me aturar e ser essa pessoa especial. Que nossa amizade seja eterna assim como nosso amor pelo PAYSANDU SPORT CLUB- O MAIOR CLUBE DO NORTE DO PAÍS.

Aos meus amigos Clésia, Robson, Susu, Maria, Rafa, Ananda, mãe Lidy, Dona Rose e toda galera da micro, a todos do CVACBA e IEC por sempre me apoiarem e me fazerem sorrir. A dona Dolores (IEC), minha grande amiga, minha companheira de “lab” e de cafezinhos, obrigado por tudo. Aos meus companheiros de laboratório Alessandra e Brito, por toda ajuda, em todos os momentos, pelas risadas e choros, esse trabalho é de vocês também.

À Bruno Moura que me ajudou demais quando meu filho (notebook) resolvia me deixar na mão (não foram poucas vezes), e sempre se mostrou disponível e generoso. Muito obrigado!

Aos meus amigos da turma de mestrado (Adriane, Adriano, Bernny, Jean, Raiane, Josiane, Lorena, Sérgio, Rennan, Wagner, Yamila e Yasmin) pelo apoio, momentos de risadas nas disciplinas, no RU e fora da UFPA.

E por fim, a todos aqueles que, de alguma forma me apoiaram durante esses dois anos de mestrado fica a minha gratidão e carinho.

Muito Obrigado!!

É graça divina começar bem.
Graça maior é persistir na caminhada certa, manter o ritmo!
Mas a graça das graças é não desistir nunca,
Podendo ou não, caindo,
Embora aos pedaços, chegar até o fim!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teor de Fenólicos Totais do extrato bruto e frações de folhas de muruci (<i>Byrsonima crassifolia</i>) e Ingá (<i>Inga edulis</i>).....	40
Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição obtidos para extrato bruto e frações de <i>Byrsonima crassifolia</i>	41
Tabela 3. Diâmetro dos halos de inibição obtidos para extrato bruto e frações de <i>Inga edulis</i>	41
Tabela 4. Valores de Concentração Inibitória Mínima dos extratos bruto e frações de <i>Byrsonima crassifolia</i> e <i>Inga edulis</i>	43
Tabela 5. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de disco-difusão para o extrato bruto e frações de <i>Byrsonima crassifolia</i> e <i>Inga edulis</i> após pré-purificação por SPE.....	44
Tabela 6. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de disco-difusão para padrões de compostos fenólicos isolados e em forma de MIX.....	45
Tabela 7. Concentração dos compostos fenólicos do extrato bruto e frações de <i>Byrsonima crassifolia</i>	46
Tabela 8. Concentração dos compostos fenólicos do extrato bruto e frações de <i>Inga edulis</i>	47

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Geral	12
2.2 Específicos	12
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3.1 MATRIZES AMAZÔNICAS	13
3.1. <i>Byrsonima crassifolia</i>	13
3.1.2 <i>Inga edulis</i>	14
3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	15
3.2.1 Mecanismo de ação	16
3.2.2 Resistência antimicrobiana	16
3.3 TESTES PARA VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	17
3.3.1 Teste de disco-difusão	17
3.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	18
3.3.3 Principais Bactérias patogênicas utilizadas em testes antimicrobianos.....	18
3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	19
3.4.1 Alcaloides	20
3.4.2 Terpenoides	21
3.4.3 Compostos fenólicos	22
3.5 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MATRIZES VEGETAIS.....	22
3.5.1 Extração por solventes em matrizes vegetais	22
3.5.2 Extração em Fase Sólida (SPE- Solid Phase Extraction)	23
3.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

CAPÍTULO II

ARTIGO: Determinação de compostos fenólicos com capacidade antimicrobiana dos extratos de folhas de murucizeiro (<i>Byrsonima crassifolia</i>) e ingazeiro (<i>Inga edulis</i>).....	35
---	----

1 INTRODUÇÃO

A deterioração de alimentos por ação microbiana é um fator de grande importância nas indústrias alimentícias, pois acarreta prejuízos econômicos, além de colocar em risco a saúde dos consumidores pela grande capacidade de adaptação e resistência que os micro-organismos vêm adquirindo ao longo dos anos (FAI, 2008; CARVALHO et al., 2009).

O surgimento de cepas resistentes vem aumentando a preocupação com a saúde pública, fato que está relacionado com uso abusivo de antibióticos no tratamento de pessoas e animais (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O estudo de agentes antimicrobianos possui grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores e a busca por compostos em óleos essenciais e extratos de plantas como uma abordagem alternativa vem se intensificando e ganhando destaque (PARK et al., 2011; RADJI, et al., 2013).

Extratos naturais vêm sendo utilizados para aumentar a vida de prateleira e melhorar as características dos alimentos. Esses extratos e/ou seus princípios ativos possuem atividade antibacteriana demonstrada em estudos laboratoriais (ALVES et al., 2008; YOSSA et al., 2010; IVANOVIC et al., 2012).

A biodiversidade brasileira é uma das mais ricas do planeta, contendo muitas plantas com propriedades antimicrobianas, necessitando, no entanto, de real comprovação da eficácia de seus compostos bioativos (CALIXTO, 2005; MELO, 2009).

Neste contexto, a região amazônica se destaca por sua grande biodiversidade, possuindo matrizes vegetais que são utilizadas pelas comunidades nativas nas mais variadas formas, como chás, infusões, banhos, ou misturas das partes desses vegetais, no tratamento de variadas infecções, no entanto, poucas espécies foram estudadas e descritas em publicações científicas (BRAZ-FILHO, 1999; RODRIGUES et al., 2014).

O estudo destas plantas amazônicas e de seus compostos bioativos pode favorecer a descoberta de novos compostos antimicrobianos, auxiliando assim no crescimento tecnológico da região (CAVALCANTE, 2011).

As atividades biológicas, tais como atividade antimicrobiana, antifúngica, antiprotozoárias, antivirais e antioxidantes, estão diretamente relacionadas com a produção dos metabólitos secundários, que se apresentam como uma fonte promissora para a descoberta de novas moléculas úteis ao homem. Os principais metabólitos secundários em matrizes vegetais que estão correlacionados com a atividade

antimicrobiana são os compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides (HAIDA et al., 2007).

A identificação e isolamento das substâncias desejadas são de extrema importância, principalmente pela busca de novas moléculas que sejam úteis no desenvolvimento de antimicrobianos.

Embora as matrizes vegetais sejam complexas, várias técnicas vêm sendo utilizadas, tais como o uso de espectrofotometria, ultrassom, cromatografia, entre outras. Neste sentido, torna-se indispensável a verificação da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração. Esta avaliação permite prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (MARÇO et al., 2008).

Pesquisas têm mostrado o potencial dos compostos em relação à capacidade antimicrobiana nas folhas de *Bysonima crassifolia* (CAVALCANTE 2011; OKOBA, 2016) e *Inga edulis* (PERAZA-SÁNCHEZ, 2007; CAVALCANTE 2011; OKOBA, 2016), entretanto são necessários estudos mais aprofundados para a identificação e isolamento desses componentes, utilizando técnicas que permitam obter resultados de forma eficiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Determinar os principais compostos responsáveis pela capacidade antimicrobiana de folhas de murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) e ingazeiro (*Inga edulis*).

2.2 Específicos

- Avaliar o teor de Fenólicos Totais presentes nas folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato bruto e das frações (acetato, metanólica e metanol:água) frente às bactérias Gram negativas (*Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*) e bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*,) através do método de disco-difusão;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos brutos e das frações (acetato, metanólica e metanol:água) que obtiverem resultados satisfatórios no teste de disco-difusão;
- Fracionar os extratos brutos e frações por Extração em Fase Sólida (SPE) e reavaliar o potencial antimicrobiano dos extratos bruto e frações obtidas pelo método de disco-difusão;
- Identificar os principais compostos fenólicos responsáveis pela capacidade antimicrobiana através de cromatografia líquida de alta eficiência;
- Quantificar os principais compostos fenólicos responsáveis pela capacidade antimicrobiana através de cromatografia líquida de alta eficiência.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 MATRIZES AMAZÔNICAS

A floresta amazônica é a mais extensa floresta equatorial do mundo e a maior reserva de biodiversidade tanto de espécies animais como de espécies vegetais, com inúmero potencial a ser estudado e explorado (RODRIGUES et al., 2014).

Na região amazônica, os habitantes reproduzem há várias gerações os mesmos métodos de produção e hábitos alimentares, além de fazer a utilização de diversas plantas medicinais. Esses vegetais amazônicos são utilizados na forma de chá, infusões e tintura pela população local no tratamento dos mais variados tipos de afecções, no entanto, não há evidências científicas concretas da eficácia desses vegetais (BRAZ-FILHO, 1999; SILVA et al., 2007).

A exploração racional do potencial das matrizes vegetais amazônicas pode proporcionar as mais variadas aplicações na produção de novos medicamentos, como substitutos de antibióticos com o objetivo de reduzir a resistência microbiana ou como aditivos em formulações alimentícias, cosméticas ou sanitizantes (HARVEY, 1999; AHMAD; BEG, 2001).

Portanto, a comercialização de extratos vegetais ricos em substâncias com potencial antimicrobiano deve ser vista como estratégia de desenvolvimento para a região. Contudo, a aplicação destes extratos vegetais deve ser precedida de estudos que avaliem fatores como: identificação, isolamento, toxicidade e a eficácia do princípio ativo, formas de aplicações e a produção a nível industrial (BRAZ-FILHO, 1999; SILVA et al., 2002).

3.1.1 *Byrsonima crassifolia*

Malpighiaceae é uma família predominantemente tropical com cerca de 65 gêneros e cerca de 1.250 espécies das quais aproximadamente 85% são neotropicais que se distribuem em florestas tropicais, subtropicais e savanas do Velho e Novo Mundo, onde estão localizadas 85% das espécies. No Brasil ocorrem 32 gêneros com cerca de 300 espécies, distribuídas em diversas formações vegetais (BARROSO et al., 1991; DAVIS et al., 2001; CAMERON et al., 2001).

O gênero *Byrsonima* pertence à família *Malpighiaceae*, contendo mais de 150 espécies diferentes, largamente encontradas em países sul americanos, como México e Brasil (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012).

O nome popular do muruci pode ser dado a diferentes espécies da família supracitada, bem como por suas cores e locais de ocorrência, tais como muruci-pequeno (*B. verbascifolia*), muruci-de-flor-vermelha (*B. punctulata*), muruci-da-chapada (*B. salzmanniana*), muruci-do-campo (*B. crassifolia*, *B. intermedia*), muruci-da-mata (*B. crispa*), muruci vermelho (*B. amazônica*), dentre outros (FERREIRA, 2005; RUFINO, 2008). As folhas, em destaque na figura 1, cascas, sementes e o próprio fruto são utilizadas pelas populações locais no tratamento de inflamações ginecológicas e gastrointestinais, infecções e acidentes ofídicos da pele (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012).

Figura 1. Folhas de *Byrsonima crassifolia*



Fonte: MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, 1999.

Várias propriedades têm sido analisadas e estudadas das várias espécies de *Byrsonima*, e seus metabólitos tem sido diretamente ligado às propriedades antioxidantes (SILVA et al., 2007; POMPEU, 2012), propriedades anti-inflamatórias (MALDINI et al., 2009; MALDINI; MONTORO; PIZZA, 2011) GUILHON-SIMPLÍCIO et al., 2012), efeitos antidepressivos (HERRERA-RUIZ et al., 2011) e capacidade antimicrobiana (MICHELIN et al., 2008; CAVALCANTE, 2011; SANTOS et al., 2012).

3.1.2 *Inga edulis*

O *Inga* é um gênero extenso de árvores da família *Leguminosae: Mimosoideae* nativa dos trópicos úmidos americanos. *Leguminosae* é considerada a terceira maior

família entre as angiospermas, com 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, com distribuição cosmopolita (LEWIS et al. 2005).

Esse gênero tem despertado interesse da comunidade científica, já que suas folhas, cascas e frutos e suas diferentes interações e frações de seus compostos possuem uma elevada capacidade oxidante conforme descrita por Dias (2010); Pompeu (2012); Souza et al., (2007) capacidade anti-inflamatória conforme verificada por Silva et al., (2007), atividade antiprotozoária conforme Peraza-Sánchez et al., (2007) e capacidade antimicrobiana verificada por Cavalcante (2011).

Figura 2. Folhas de *Inga edulis*



Fonte: ARQUIVO PESSOAL, 2015.

Amplamente distribuída e cultivada na Amazônia e na América Central, a espécie possui muitos nomes vulgares, mostrando a sua importância para a população interiorana: ingá, ingá- cipó, ingá-de-metro, ingá-doce, ingá- de-macaco, ingá-macarrão, rabo-demico (Brasil); guamo, guama (Colombia, Venezuela, Costa Rica); pacaie sogá, pacaie silvestre (Peru) (FALCÃO, 2000). Suas folhas em destaque na Figura 2 são utilizadas no tratamento de várias afecções como reumatismo, artrite, diarreia, pelas pessoas nativas dessas áreas (SILVA et al., 2007).

3.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os antimicrobianos devem ser utilizados de forma consciente, preconizando os antibióticos com menor espectro para um determinado patógeno, evitando a resistência dessa droga a uma determinada bactéria (NIKAIDO, 2009).

3.2.1 Mecanismo de ação

A atividade antimicrobiana de uma substância pode ser dividida em etapas: onde primeiramente as substâncias agregam-se aos micro-organismos e penetram nas suas células; logo após, são transportadas para um sítio ativo intracelular e por fim ligam-se a sítios bioquímicos específicos, realizando suas ações bioquímicas. Em cada uma dessas etapas pode-se iniciar ou ter-se a resistência, que está ligada aos processos de síntese de enzimas que inativam o composto, prevenção e modificação do sítio alvo (SCHAECHTER et al., 2002).

Os compostos naturais podem agir nos micro-organismos desintegrando a membrana citoplasmática, desestabilizando a força próton motriz, fluxo de elétrons, transporte ativo e a coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios ser afetados em consequência de outros interferentes (BURT, 2004).

3.2.2 Resistência antimicrobiana

Os agentes antimicrobianos são essenciais para prevenção, controle e tratamento de infecções bacterianas em homens e animais. Todavia, o uso excessivo e indiscriminado desses agentes tem promovido o surgimento e prevaência da resistência antimicrobiana em bactérias de forma acelerada (PETROVIC, 2008; HARADA, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, mudanças na população microbiana podem levar à evolução de novos micro-organismos patogênicos e ao desenvolvimento de novos fatores de virulência em patógenos antigos, como o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos ou mudanças na habilidade de sobrevivência em condições ambientais adversas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Um número limitado de países latino-americanos possui em âmbito nacional programas de vigilância que monitoram a resistência antimicrobiana, como Argentina, Chile e Colômbia (GARCIA, 2003; BRICENO et al., 2010). Já o Brasil não possui um programa nacional de vigilância da resistência antimicrobiana, o que torna ainda mais difícil estimar a prevalência real e peso das doenças causadas pela resistência das bactérias aos antibióticos. (OKEKE et al., 2005).

3.3 TESTES PARA VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* (2015), os testes de sensibilidade aos antimicrobianos, são indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso e exija uma terapia antimicrobiana.

De acordo com o grande número de espécies de plantas disponíveis para a análise, é primordial ter sistemas eficientes com métodos que avaliem a eficácia de plantas medicinais como agente antimicrobiano, levando-se em consideração a avaliação biológica completa dos extratos para garantir a eficácia e segurança, seguido pela identificação de princípios ativos, formulações de dosagem e perfil farmacocinético da nova droga (DAS, 2010).

Para a avaliação da atividade antibacteriana utilizando extratos vegetais diferentes métodos podem ser utilizados, tais como, método de difusão em ágar por poço, teste de difusão em disco e métodos de macrodiluição e microdiluição com a determinação da concentração inibitória mínima (BONA, 2014).

Preferencialmente se utiliza cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection), pois estas apresentam estabilidade genética e por serem padronizadas pode-se ter a monitorização de vários parâmetros principais no controle de qualidade (SEIJAS et al., 2002).

3.3.1 Teste de disco-difusão

Este método foi idealizado por Bauer et al. (1966), e desde então é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia. Fundamenta-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. Esta difusão do agente antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração mínima inibitória (JORGENSEN, 1999; NCCLS, 2006).

Este método é qualitativo e indicado para estabelecer a sensibilidade do micro-organismo, entretanto não determina a potência antimicrobiana de um composto; e torna-se limitado quando as substâncias não se difundem no meio (SOUZA et al., 2003). Fundamenta-se na difusão da substância a ser testada, em um meio de cultura sólido e inoculada com o micro-organismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição (VANDEN BERGUE; VLIETINCK, 1991; SILVEIRA et al., 2009).

3.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima corresponde à menor concentração de agente antimicrobiano, que será capaz de realizar a inibição do organismo teste (RICARDO, 2008; MADIGAN et al., 2008). Pode ser realizado pelo método de macro ou microdiluição. O método de microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL.

Este método tem vantagens como uma boa reprodutibilidade, sensibilidade (30 vezes mais sensível que outros métodos), requererem pequena quantidade de amostra, podendo ser utilizado para um grande número das mesmas (OSTROSKY et al., 2008).

3.3.3 Principais Bactérias patogênicas utilizadas em testes antimicrobianos

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos tem ocasionado resistência dos micro-organismos patogênicos através de mutações em suas células, determinando a deficiência na potencialização do composto frente à esses micro-organismos. A maioria dos testes de atividade antimicrobiana são realizados frente às principais cepas com resistência antimicrobiana, entre eles, destacam-se os gêneros de *Salmonella* (CARVALHO et al., 2009), *Escherichia coli* (SOUSA et al., 2011), *Staphylococcus aureus* (SILVA et al., 2007), *Enterococcus faecalis* (CAVALCANTE, 2011), *Bacillus cereus* (AGUIAR et al., 2008), *Streptococcus* (LOGUERCIO et al., 2005).

As bactérias Gram negativas possuem maior proteção contra compostos que tentam atuar na degradação de sua célula e por isso geralmente apresentam nível de resistência microbiana mais elevada do que as bactérias Gram positivas. Isso está diretamente relacionado com a constituição da membrana externa das células Gram negativas que é formada por fosfolipídios e proteínas, estas estruturas conferem grande impermeabilidade a estas células frente aos agentes antimicrobianos (HARRIS, 2003).

Entre as principais bactérias Gram negativas resistentes destacam-se *Salmonella* Typhimurium, que é um sorotipo amplamente disseminado na natureza e de grande importância em saúde pública. A grande maioria dos casos de infecções humanas *Salmonella* Typhimurium deve-se às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's). Este sorotipo vem sendo associado com grande resistência adquirida ao longo dos anos

(YAMAMOTO; NAKANE, 2006); e *Escherichia coli*, que representa a espécie bacteriana mais comumente isolada, indicando contaminação fecal durante ou no pós-processamento de alimentos (FORSYTHE, 2002).

Entre as bactérias Gram positivas destacam-se espécies de *Staphylococcus aureus*, que possuem elevada resistência frente a inúmeros agentes antimicrobianos, adquirida através de mutações e transferências de genes por plasmídeos e transposons e *Enterococcus faecalis* que tem adquirido resistência nos últimos anos, principalmente pelo uso indiscriminado de antibióticos, criando grandes reservatórios com a possibilidade de transferências de material genético através de plasmídeos (SHEPARD, 2002; ANDRADE et al., 2016).

3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, com distribuição em todas as partes dos vegetais e caracterizados por sua diversidade de estruturas químicas (NODARI; GUERRA, 2000; NIERO et al., 2003). Esses compostos não são necessariamente essenciais ao organismo produtor, mas exercem um papel importante na sobrevivência da planta em seu ecossistema, funcionando como mecanismos de defesa por agentes externos, tais como, micro-organismos, insetos, herbívoros, entre outros (VERPOORTE; VANDER HEIJDEN; MEMELINK, 2000; SIMÕES et al., 2004).

Os metabólitos secundários desempenham papéis importantes na bioquímica e fisiologia dos vegetais. Inúmeras classes de produtos naturais constituem grupos importantes de metabólitos secundários, estando envolvidos em muitos processos fisiológicos de plantas, particularmente naqueles que respondem ao estímulo ambiental. A composição de metabólitos secundários nos tecidos da planta pode influenciar diretamente na qualidade e toxicidade dos alimentos produzidos para humanos e animais (STOBIECKI et al., 2003).

Os metabolitos secundários possuem ação antibacteriana, antivirais, antifúngicas, antiparasitárias e propriedades antioxidantes. Hoje, essas substâncias também têm grande valor como cosméticos e medicamentos, sendo também utilizados para dar sabor e preservar alimentos (CESPEDES et al., 2015).

A pesquisa fitoquímica é importante principalmente quando ainda não são dispostos todos os estudos químicos com espécies de interesse popular, tendo como

objetivo conhecer os compostos químicos das espécies vegetais e avaliar sua presença nos mesmos, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes (SIMÕES et al., 2004).

Já foram identificados alguns compostos ao se utilizar as espécies *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*.

Gordon et al. (2011) identificaram ácido gálico e quercetina em extratos acetônicos de *Byrsonima*. Silva e Rogez (2013) identificaram a presença de ácido gálico, quercetina-3- *O*- α -L-glicosídeo e epigalocatequina galato em extratos alcoólicos de folhas de *Byrsonima crassifolia*.

Souza et al. (2007) identificaram a presença de ácido gálico, catequina, epicatequina, mirecetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo e quercetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo no extrato metanólico de folhas de *Inga edulis*.

Dias, Souza e Rogez (2010) identificaram ácido gálico, procianidina B1, catequina, procianidina B2, epicatequina, miricetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo, miricetina e quercetina, presentes na fração aquosa de extrato de folhas de *Inga edulis*. Silva e Rogez (2013) identificaram a presença de ácido gálico, miricetina-3-*O*- α -L-raminopiranosídeo e quercetina-3-*O*- α -L-glicosídeo em extratos alcoólicos de folhas de *Inga edulis*.

Alguns compostos estão presentes em quantidades relevantes em extratos vegetais na maioria das matrizes, tais como, alcaloides, terpenóides e principalmente compostos fenólicos (CROTEAU et al., 2000).

3.4.1 Alcaloides

Os alcaloides são compostos que contêm nitrogênio em um anel heterocíclico e são geralmente de caráter básicos (tipo alcalino=alcaloide). Constituem uma grande família com mais de 15.000 metabólitos secundários, entre os quais se destacam a morfina, a codeína e a heroína. Eles são de sabores amargos fisiologicamente e farmacologicamente ativos e funcionam como uma defesa química das plantas contra os ataques herbívoros (PRAKASH, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2004; BRUNETON, 2009).

O papel dos alcaloides nas defesas químicas das plantas é sustentado pela grande variedade de efeitos fisiológicos que estes exercem sobre os animais e também por suas atividades antimicrobianas. Muitos alcaloides são tóxicos aos insetos e atuam como repelente para herbívoros (CROTEAU et al., 2000).

Cerca de 20% das espécies de plantas conhecidas acumulam esse tipo de metabólito secundário, podendo ser encontradas em diversas partes do vegetal, e em representantes de diversas famílias. Essa classe de substâncias do metabolismo secundário é famosa pela acentuada ação sobre o sistema nervoso central, sendo muitos deles utilizados como venenos ou alucinógenos (SOTTOMAYOR et al., 2004; LORENCE & NESSLER, 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

Os alcaloides geralmente se acumulam nas plantas nas partes responsáveis pela sobrevivência da espécie ou aqueles expostos na periferia do vegetal e, portanto, mais propenso aos ataques externos. Nos vegetais, esses compostos estão principalmente na forma de sais ou ligados aos taninos nos vacúolos. São geralmente insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos apolares e em álcoois (HOPKINS, 2003; BRUNETON, 2009).

As propriedades biológicas que se destaca nos alcaloides, são a propriedade de contração muscular intensa, útil na prevenção e tratamento de hemorragia pós-parto e pós- aborto (SCHRIPEMA et al., 2004).

3.4.2 Terpenoides

Os terpenoides representam a maior classe química de constituintes ativos de plantas, havendo mais de 30.000 substâncias descritas. A classificação básica dos vários terpenos decorre do número de unidades isoprênicas que estes possuem (RAVEN, 2001; VERPOORTE & MARASCHIN, 2001; LIMA; KAPLAN; CRUZ, 2003).

As estruturas de terpenoides são muito complexas, derivados do isopreno (C5) e podem ser divididos em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Podem apresentar cadeia, anel único, bicíclico ou policíclico, seus derivados oxigenados podem ser álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres (DEWICK, 2009).

De acordo com Copp (2003), os metabólitos secundários considerados como a principal classe promissora de atividade antibacteriana são os terpenoides. Os triterpenos são o grupo mais importante de terpenoides, e são reconhecidos pelos efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, cardiovasculares e antitumorais (HUSSAIN et al., 2008).

Sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas são principalmente descritas como tendo uma forte atividade antibacteriana contra cepas Gram positivas. No entanto o mecanismo de ação não é totalmente compreendido, porém especula-se uma ruptura da membrana ocasionada pelos compostos lipofílicos (COWAN, 1999).

3.4.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, amplamente distribuídos, produzidos pela maioria das plantas, sendo que já foram detectados mais de 10 mil compostos deste grupo (SILVA, 2010; KENNEDY; WIGHTMAN, 2011). Pertencem ao grupo dos compostos fenólicos várias classes químicas, como os fenóis simples e ácidos fenólicos, quinonas e flavonoides (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; SULTANBAWA, 2011).

Os efeitos bioativos dos compostos fenólicos vem sendo elucidados, tais como atividade anticarcinogênica (Ângelo, 2007), atividade antioxidante (Souza et al., 2008) e atividade antimicrobiana (Cavalcante, 2011). A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é variável de acordo com a espécie microbiana testada e estrutura da molécula. Em relação a sua estrutura química, o grau de hidroxilação do composto é o fator de maior impacto na toxicidade para determinados micro-organismos. No entanto, os mecanismos de ação destes compostos sobre os micro-organismos ainda não foram totalmente esclarecidos (CAMPOS; COUTO; HOGG, 2003).

3.5 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MATRIZES VEGETAIS

3.5.1 Extração por solventes em matrizes vegetais

A extração é uma etapa fundamental para obtenção de compostos químicos a partir das plantas ou das suas partes vegetais. A utilização de uma técnica de extração adequada é determinante para separação e/ou purificação, identificação e caracterização de compostos bioativos, e também evita a sua perda ou degradação (GURIB-FAKIM, 2006; DAI & MUMPER, 2010; SASIDHARAN, et al., 2011).

Os extratos vegetais são preparações líquidas, semi-sólidas ou sólidas, obtidas a partir de matrizes de origem biológica. Estes extratos são obtidos pelo contato da matriz vegetal com diferentes solventes como água ou solventes orgânicos (SHI, 2007).

A eficácia de muitos extratos de plantas depende do fornecimento de compostos bioativos presentes nesta matriz. Esses compostos podem ser os mais variados, por exemplo, compostos fenólicos, flavonoides, terpenoides, entre outros. No entanto matrizes vegetais são complexas e apresentam uma maior dificuldade, pois geralmente, apresentam característica de pouca solubilidade em água, possuem baixa absorção, dificuldades de penetração nas membranas lipídicas das células ou por possuírem tamanho molecular alto (BONIFÁCIO et al., 2014).

Diversos fatores podem influenciar na obtenção de compostos bioativos, tais como: a metodologia de extração, natureza da matriz vegetal, tamanho das partículas, solvente utilizado, tempo e temperatura de extração (ANDREO; JORGE, 2006).

Solventes com diferentes polaridades como o etanol, metanol, água, acetato de etila, hexano ou a mistura destes são largamente empregados para extração de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas em distintas matrizes vegetais. Os métodos para avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana são fortemente afetados pelos solventes utilizados na extração. Deste modo, a extração sequencial utilizando solventes com polaridade crescente tem sido amplamente utilizada para matrizes vegetais e alimentos (MOURE et al., 2001; MAU et al., 2005; PELLEGRINI et al., 2007).

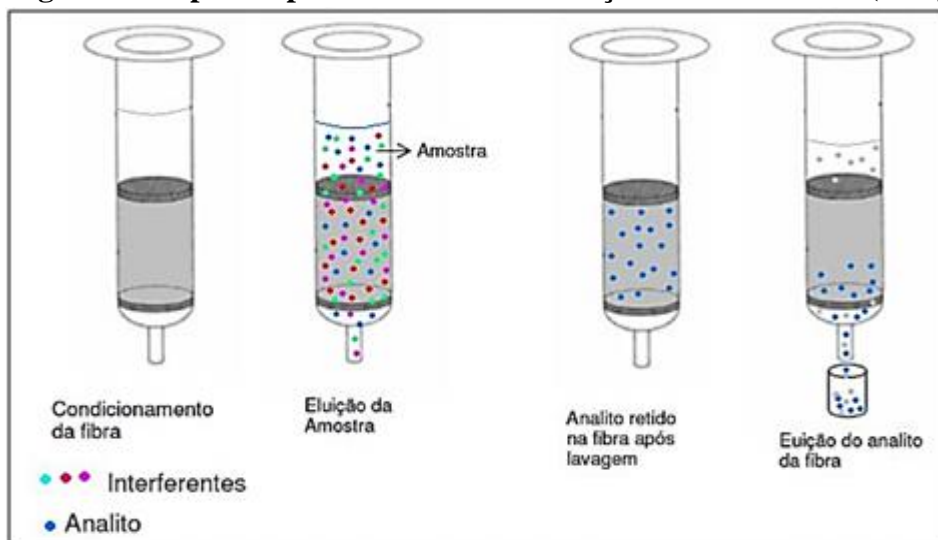
3.5.2 Extração em Fase Sólida (SPE- Solid Phase Extraction)

A Extração em Fase Sólida é uma técnica de separação líquido-sólido extensamente utilizada para extrair analitos semi-voláteis e não voláteis de amostras líquidas, mas também para amostras sólidas pré-extraídas com solventes (QUEIROZ, 2001).

A extração em fase sólida é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas. A alta capacidade de concentrar os solutos nos extratos, a facilidade de automação e a redução do consumo de solventes orgânicos são algumas das vantagens conhecidas da SPE frente a outras técnicas de extração (CALDAS et al., 2011).

A SPE emprega sorventes em cartuchos, nas formas de barril ou seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos àqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Em geral, os procedimentos da SPE consistem em 4 etapas: o condicionamento do adsorvente, carga da amostra, lavagem, eluição (Figura 3) (KHAYOON et al., 2010; NOVAIS et al., 2014).

Figura 3. Etapas do procedimento de Extração em Fase Sólida (SPE)



Fonte: EMAN, 2008.

3.5.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação contendo uma fase móvel e uma estacionária, onde a amostra a ser analisada é injetada na entrada da coluna e a fase móvel é bombeada continuamente fazendo com que a amostra migre de acordo com as interações e as propriedades físico-químicas da fase móvel e da estacionária. Outro lado da coluna é instalado um detector que transmite para um registrador um sinal que é interpretado em forma de cromatogramas, sendo a área e a altura deste proporcional a concentração do analito (JIN et al., 2008).

Os extratos vegetais são matrizes complexas, sendo na maioria das vezes necessário processo de purificação da amostra para que se realize a identificação das substâncias presentes. Para o caso de identificação de substâncias individuais, é necessária a remoção de substâncias que possam interferir, bem como a separação de compostos de uma mesma classe, com isto, a cromatografia é um método indispensável, possibilitando a posterior identificação e quantificação de compostos, com alta sensibilidade e eficiência (MARÇO, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J. S; COSTA, M. C. C. D; NASCIMENTO, S. C; SENA, K. X. F. R. Antimicrobial activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E Brown. (*Verbenaceae*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 18(3): 436-440, 2008.

AHMAD, I; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 74, p. 113-123, 2001.

ALVES, E. G. A. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**. v. 31, n. 5, p. 1224 – 1229, 2008.

ANDRADE, F. E. M; MUNOZ, C. A. M; FRANCO, J. P. V; DIAZ CORREA, L. M; VÉLEZ RIVERA, J. D; MIRANDA, J. V; LONDONO, A. M. B; ZULETA-TOBÓN, J. J; MONTUFAR PANTOJA, M. C. Bacteremia por *Staphylococcus coagulase negativo* com concentração inibitoria mínima para vancomicina ≥ 2 . **Asociación Colombiana de Infectología**. 20(1), p.3-8, 2016.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B Cent Pesqui Proc A**. vol. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANGELO, P. M; JORGE, N. Phenolic Compounds in foods- A brief review. **Ver. Inst. Adolfo Lutz**. 66(1): 1-9, 2007.

BALASUNDRAM, N; SUNDRAM, K; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. v. 99, p. 191-203, 2006.

BARROSO, G. M; PEIXOTO, A. L; ICHASO, C. L. F; GUIMARÃES, E. F; COSTA, C. G; & LIMA, H. C. Sistemática de Angiospermas do Brasil v.2. Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 1991.

BAUER, A.W; KIRBY, W. M; SHERRIS, J. C; TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. **J. Clin. Microbiol**. v. 40, p. 2413-5, 1966.

BONA, E. A. M; PINTO, F. G. S; FRUET, T. K; JORGE, T. C. M; MOURA, A. L. Comparison of methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (mic) of aqueous and ethanol plant extracts. **Pharmacology**. v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BONIFÁCIO, B. V; SILVA, P. B; RAMOS, M. A. S; NEGRI, K. M. S; BAUAB, T. M; CHORILLI, M. **International Journal of Nanomedicine**. v.9, p.1-15, 2014.

BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure and Applied Chemistry**. v. 71, n. 9, p. 1663-1672, 1999.

BRICENO, D. F; CORREA, A; VALENCIA, C; TORRES, J. A; PACHECO, R; MONTEALEGRE, M. C. Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolated from tertiary-care hospitals in Colombia. **Biomedica**. v. 30:371–81,2010.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie, Phytochimie-Plantes medicinales**. 4° ed. Editions Tec & Doc, France, 2009.

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

C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p.819-46.

CALDAS, S. S; GONÇALVES, F. F; PRIMEL, E.G; PRESTES, O. D; MARTINS, M. L; ZANELLA, R. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. **Quimi. Nova**. v.34, n.9, ,2011.

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

CAMERON, K. M; CHASE, M. W; ANDERSON, W. R; & HILLS, H. G. Molecular systematics of Malpighiaceae: evidence from plastid rbcL and matK sequences. **American Journal of Botany**. v.88, p.1847-1862, 2001.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; HOGG, T. A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 94, p. 167–174, 2003.

CARVALHO, A. A. T; SAMPAIO, M. C. C; SAMPAIO, F. C; MELO, A. F. M; SENA, K. X. F. R; CHAPPETA, A. A; HIGINO, J. S. In vitro antimicrobial activity of hydro-alcoholic extracts of *Psidium guajava* L. against gram-negative bacteria. **Acta. Farmacêutica Bonaerense**. v.21, n.4, 2002.

CARVALHO, F. C. T; BARRETO, N. S. E; REIS, C. M. F; HOFER, E; VIEIRA, R. H S. F. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from shrimp farms in Ceará State, Brazil. **Rev. Ciênc. Agron**. v.40, n.4, p. 549-556, 2009.

CAVALCANTE, M. A. Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas. Belém, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Pará- Belém, 2011.

CESPEDES, C. L; ALARCON, J; AQUEVEQUE, P. M; LOBO, T; BECERRA, J; BALBONTIN, C; AVILLA, J. V; KUBO, I; SEIGLER, D. S. New environmentally-friendly antimicrobials and biocides from Andean and Mexican biodiversity. **Environmental Research**. v.142, p. 549-562, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement.v.35, n. 3, 2015.

COPP, B.R. Antimycobacterial natural products. **Natural Products Report**. v.20, n.6, p.535-57, 2003.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**. v. 12, p. 64-582, 1999.

CROTEAU, R; KUTCHAN, T. M; LEWIS, N. G; BUCHANNAN, B. B; GRUISSEM, W; JONES, R. L. Natural products (secondary metabolites. Biochemistry and Molecular Biology of Plant). **American Society of Plant Physiologists, Rockville**. pp. 1250–1318, 2000.

DAI, J; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**. Volume 15, pp. 7313-7352, 2010.

DAS, K; TIWARI, R. K. S; SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DAVIS, C. C; ANDERSON, W. R; & DONOGHUE, M. J. Phylogeny of Malpighiaceae: evidence from chloroplast *ndhF* and *trnL-F* nucleotide sequences. **American Journal of Botany**. v. 88, p.1830-1846,2001.

DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. **Medicinal Natural Products**. 3 ed. Chichester: John Wiley & Sons. Cap.5, p.187-306, 2009.

DIAS, A. L. S; SOUZA, J. N. S; ROGEZ, H. Purification of phenolic compounds from *Inga edulis* leaves using solid-phase extraction: major compounds quantification and antioxidant capacity evaluation. **Química Nova**.v. 33,p. 38-42, 2010.

EMAN. European Mycotoxins Awareness Network. **Sample Preparation Techniques for the Determination of Mycotoxins**. 2008.

FAI, A. E. C; STAMFORD, T. C. M; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Iberoamericana de polímeros**. v.9 (5), p.435-451, 2008.

FALCÃO, M. A; CLEMENT, C. R. Phenology and Productivity of Ingá (*Inga edulis*) in Central Amazonia. **ACTA AMAZONICA**. 30(2):173-180,2000.

FERREIRA, M. G. R. **Murici (*Byrsonima crassifolia* (L.) Rich.)**. Porto Velho: Embrapa, 2005. 2 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

GARCIA, P. C. Resistencia bacteriana en Chile. **Rev Chil Infectol** .20(Suppl. 1):11–23, 2003.

GORDON, A; JUNGFER, E; SILVA, B. A; MAIA, J. G. S; MARX, F. Phenolic Constituents and Antioxidant Capacity of Four Underutilized Fruits from the Amazon Region. **J. Agric. Food Chem.** v. 59, n.14, p.7688–7699, 2011.

GUILHON-SIMPLÍCIO, F; PINHEIRO, C. C. S de; CONRADO, G. G; BARBOSA, G. S; SANTOS, P. A dos; PEREIRA, M. M; LIMA E. M. Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). **Journal of Ethnopharmacology.** v.140, p. 282–286, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova.** vol. 33, No. 3, p, 667-679, 2010.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine.** Volume 27, pp. 1–93,2006.

HAIDA, K. S; PARZIANELLO, L; WERNER, S; GARCIA, D. R; INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq Cienc Saude Unipar.** 11: 185-192, 2007.

HARADA, K., ASAI, T. Role of Antimicrobial Selective Pressure and Secondary Factors on Antimicrobial Resistance Prevalence in *Escherichia coli* from Food-Producing Animals in Japan. **Journal of Biomedicine and Biotechnology.** 12 p, 2010.

HARRIS, R. Sinergism in the essential oil world. **The International Journal of Aromatherapy,** v.12, p.179-186. 2003.

HARVEY, A. L. An introduction to drugs from natural products. In: HARVEY, A. L. **Drugs from Natural Products Pharmaceuticals and Agrochemicals.** London: Ellis Horwood, p. 1-6, 1999.

HERRERA-RUIZ, M; ZAMILPA, A; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M; REYES-CHILPA, R; LEÓN, E; GARCÍA, M. P; TORTORIELLO, J; HUERTA-REYS, M. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifoli.* **Phytomedicine.** v.18, p.1255-1261, 2011.

HOPKINS W.G. **Physiologie végétale.** Editions De Boeck, Bruxelles, 2003.

HUSSAIN, H; AL-HARRASI, A; KROHN, K; KOUAM, S. F; ABBAS, G; SHAH, A; IKEDA, Y; MURAKAMI, A; OHIGASHI, H. Ursolic acid: anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research,** v.52, p. 26-42, 2008.

IVANOVIC, J.; MISIC, D.; ZIZOVIC, I.; RISTIC, M. In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control.** v. 25, p. 110-116, 2012.

JIN Y, XUE X, SHI H, XIAO Y, ZHANG F, LIANG X. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. *Mode. Tradit. Chin. Med. Mater. Med.*10(1): 80 - 84, 2008.

JORGENSEN, J. H; TURNIDGE, J. D; WASHINGTON, J. A. **Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods.** In: Murray, R.P. et al. *Manual of Clinical Microbiology.* 7. ed. American Society for Microbiology, Washington DC, p.1526-43, 1999.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition: an International Review Journal.** v.2, p. 32–50, 2011.

KHAYOON, W. S.; SAAD, B.; YAN, C. B.; HASHIM, N. H.; ALI, A. S. M.; SALLEH, M. I.; SALLEH, B. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. **Food Chem.** vol. 118, no. 3, pp. 882–886, Feb. 2010.

LEWIS, G.P; SCHRIRE, B. D; MACKINDER, B. A. LOCK, J. M. Leguminosae of the world. **Royal Botanic Gardens Kew.** P.577, 2005.

LIMA, H. G. P; KAPLAN, M. A. C; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenoides em plantas. **Floresta e Ambiente.** v.10, n. 2, p.71-77, 2003.

LOGUERCIO, A. P; BATTISTIN, A; VARGAS, A. C; WITT, N. M. Antibacterial activity of hydro-alcoholic extract leaves of jambolan (*Syzygium cumini* (L)). **Ciência Rural.** v.35, n.2, p.371-376, 2005.

LORENCE, A.; NESSLER, E. Molecules of interest. Camptothecin over four decades of surprising findings. **Phytochemistry.** v.65, p.2735-49, 2004.

MADIGAN, M. T; MARTINICO, J. M; DUNLAP, P. V; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock.** 12ª ed. São Paulo: Artmed,P. 1128, 2008

MALDINI, M; MONTORO, P; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** v. 56, p. 1–6, 2011.

MALDINI, M; SOSA, S; MONTORO, P; GIANGASPERO, A; BALICK, M. J; PIZZA, C; DELLA LOGIA, R. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 122, p. 430–433, 2009.

MARÇO, P. H; POPPI, R. J; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Quim. Nova.** v.31, n.5,p.1218-1223, 2008.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R; CAZARES-LUNA, L; MORENO-GUTIÉRREZ, M. N; GARCÍA-ARGAÉZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.)H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 66, p.79-82, 1999.

MAU, J. L.; TSAI, S. Y.; TSENG, Y. H.; HUANG, S. J. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**. v. 93, p. 641-649, 2005.

MELO, J. AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Native medicinal plants commercialized in Brazil – priorities for conservation. **Environ Monit Assess**. 156: 567-580, 2009.

MICHELIN, D. C.; SANNOMYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C. dos; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, P. 690-695, 2008.

MOURE, A.; FRANCO, D.; DOMINGUES, J. M.; SINEIRO, J.; DOMINGUES, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**. v. 72, p. 145-171, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 19^o Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, 26(1), USA, 2006.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. **Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos**. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí, 2003.

NIKAIDO H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annu Rev Biochem**. v. 78, p.119-46, 2009.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2. Ed, p. 11-24. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

NOVAIS, A. S.; RIBEIRO FILHO, J. F.; AMARAL, E. M. F.; FARIA, A. M. Novo sorvente de hidrofobicidade reduzida para extração em fase sólida: preparação e caracterização. **Química Nova**, vol.38, n^o.2 274-279, 2015.

OKEKE, N.; KLUGMAN, K. P.; BHUTTA, Z. A.; DUSE, A. G.; JENKINS, P.; O'BRIEN, T. F. Antimicrobial resistance in developing countries: Part II. Strategies for containment. **Lancet Infect Dis**.v. 5:568–80, 2005.

OKOBA, D. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcóolicos de frutos do pantanal: *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (Canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (Laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã). Campo Grande -MS, 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) - Programa em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-Campo Grande, 2016.

OLIVEIRA, V. B.; FREITAS, M. S. M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma*(Apocynaceae): uma revisão. **Rev Bras Pi Med**, v. 11, n. 1, p.92-99, 2009.

OSTROSKY, E. A; MIZUMOTO, M. K; LIMA, M. E. L; KANEKO, T. M; NISHIKAWA, S. O; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev.Bras. Farmacogn.** João Pessoa, v. 18, n. 2, 301-307, 2008.

PARK, Y. S; LEE, H.; CHIN, B. S; HAN, S. H; HONG, S. G; HONG, S. K; KIM, H. Y; UH, Y; SHIN, H. B; CHOO, E. J; HAN, S. H; SONG, W; JEONG, S. H; LEE, K; KIM, J. M. Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems. **Journal of hospital infection.** v. 79, p. 54–58, 2011.

PELLEGRINI, N; COLOMBI, B; SALVATORE, S; BRENNNA, O. V; SALVATORE, S; BRENNNA, O. V; GALAVERNA, G; DEL RIO, D; BIANCHI, M; BENNET, R. N; BRIGHENTI. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetables foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v. 87, p. 103-111, 2007.

PERAZA-SÁNCHEZ, S. R; PELLEGRINI, N; COLOMBI, B; SALVATORE, S; BRENNNA, O. V; SALVATORE, CEN-PACHECO, F; NOH-CHIMAL, A; MAY-PAT, F; SIMÁ-POLANCO, P; DUMONTEIL, E; GARCÍA-MISS, M. R; MUTMARTÍN, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. **Fitoterapia,** v.78, p. 315–318, 2007.

PETROVIC, O; KNEZEVIC, P. Antibiotic resistance of commensal *Escherichia coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia. **International Journal of Antimicrobial Agents.** v.31, p.360–363, 2008.

POMPEU, D. R; ROGEZ, H; MONTEIRO, K. M; TINTI, S. V; CARVALHO, J. E. Capacidade antioxidante e triagem farmacológica de extratos brutos de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. **Acta Amazonica.** v. 42(1), p. 165-172, 2012.

POMPEU, D; SILVA, E; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology.** v. 100, p. 6076-6082, 2009.

PRAKASH, A. S; PEREIRA, T. N; REILLY, P. E; SEAWRIGHT, A. A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Mutat Res* 5: 53- 67, 1999.

QUEIROZ, S. C. N; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. **Quimi. Nova.** v.24, n.1, 2001.

RADJI, M; AGUSTAMA, R. A; ELYA, B; TJAMPAKASAN, C. R. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resitent *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistente *Pseudomonas aeruginosa*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** v.3 (8), p. 663-667, 2013.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.** 6°ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. p.906, 2001.

RICARDO, S. B. Elevação de MIC para a vancomicina no *S. aureus*. **Prática Hospitalar**. Ano X, n. 60, p. 46-48, 2008.

RODRIGUES, I. A; AZEVEDO, M. M. B; CHAVES, F. C. M; ALVIANO, C. S; ALVIANO, D. S; VERMELHO, A. B. Arrabidaea chica hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on Leishmania spp. **Bio Med Res. Int.** v. pp. 7, 2014.

RUFINO, M. S. M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. 2008. 263 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2008.

SANTOS, R. C; KUSHIMA, H; RODRIGUES, M. C; SANNOMIYA, M; ROCHA, L. G. M; BAUAB, T. M; TAMASHIRO, J; VILEGAS, W; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima intermedia* A. Juss.: Gastric and duodenal anti-ulcer, antimicrobial and antidiarrheal effects in experimental rodent models. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 140, p. 203–212, 2012.

SASIDHARAN, S; CHEN, Y; SARAVANAN, D ; SUNDRAM, K. M; YOGA, L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**. Volume 8(1), pp. 1-10,2011.

SCHAECHTER, M; ENGLEBERG, N. C; EISENSTEIN, B. L; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismo das Doenças Infecciosas**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2002.

SCHRIPSEMA, J; DAGNINO, D; GOSMANN, G. Alcaloidesindólicos. In: SIMÕES, SEIJAS, L. M; SILBERT, S; REIS, A. O; SADER, H. S. Evaluation of the quality of antimicrobial agentes disks used in disk-difusion tests commercially available in Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.39, n.1, 2009.

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

SHI, J; KASSAMA L. S; KAKUDA, Y. In: **Functional Food Ingredients and Nutraceuticals Processing Technologies**. Ed. Shi, J. Taylor And Francis, CRC Press , Boca Raton, Fl, p. 371, 2007.

SILVA, E. M; ROGEZ, H; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**. v.55, p. 381–387, 2007.

SILVA, E. M; SILVA, J. S; PENA, R. S; ROGEZ, H. A combined approach to optimize the drying process of flavonoid-rich leaves (*Inga edulis*) using experimental design and mathematical modelling. **Food and Bioproducts Processing**. v.89, p. 39-46, 2011.

SILVA, E. M; SOUZA, J. N. S; ROGEZ, H; REES, J. F; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chem**. v.101, p. 1012–1018, 2007.

SILVA, J. G; SOUZA, I. A; HIGINO, J. S; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P; PEREIRA, J. V; PEREIRA, M. S. V. Antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of *Anacardium occidentale* Linn. Against multi-drug resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of pharmacognosy**.17 (4), p. 572-577, 2007.

SILVA, J. J. M; ROGEZ, H. Evaluation of oxidative stability of crude açai (*euterpe oleracea*) oil in the presence of pure phenolic compounds or amazonian plant extracts. **Química Nova**. vol, 36. n,3. p, 400-406,2013.

SILVA, N. C. C; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SILVA, R. L.; DE MELO, G. B.; ANTONIOLLI, A. R.; LIMA, S. O.; DE MELO, V. A.; RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S; DE CASTRO E SILVA JÚNIOR, O. Effect the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 17, p. 101-105, 2002.

SILVEIRA, L. M. S; OLEA, R. S. G; MESQUITA, J.S; CRUZ, A. L.N; MENDES, J. C. Antimicrobial activity methodologies applied to plants extracts: comparison between two agar diffusion techniques. **Rev. Bras. Farm.** 90(2):124-128,2009.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SOTTOMAYOR, M; CARDOSO, I. L; PEREIRA, L. G; BARCELÓ, A. L. Peroxidases and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Phytochemistry Reviews**. v.3, p.159-71, 2004.

SOUSA, E. O; BARRETO, F. S; RODRIGUES, F. F. G; COSTA, J. G. M. Antibacterial activity and interference of *Lantana camara* L. and *Lantana montevidensis*(Spreng) in the resistance of aminoglycosides. **Brazilian Journal of Biosciences**. v.9, n.1, p. 1-5, 2011.

SOUZA, J. N. S; SILVA, E. M; LOIR, A; REES, J. F; ROGEZ, H; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**. 106, p331-339, 2008.

SOUZA, J. N. S; SILVA, E. M; SILVA, M. N; ARRUDAL M. S. P; LARONDELLE, Y; ROGEZ, H. Identificación and antioxidante activity of Several flavonoids of *Inga Edulis* leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 18, No. 6, 1276-1280, 2007.

SOUZA, M. M; BELLA CRUZ, A; SCHUMACHER, M. B; KREUGER, M. R. O; FREITAS, R. A; BELLA CRUZ, R. C. **Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos**. **Ciências Farmacêuticas : Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí : Editora da UNIVALI, 2003.

STOBIECKI, M; MATYSIAK-KATA, I; FRANSKI, R; SKALA, J; SZOPA, J. Monitoring changes in Anthocyanin and Steroid Alkaloid Glycoside Content in Lines of Transgenic

Potato Plants Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. **Phytochemistry**. v.62, n.1, p.959-969, 2003.

SULTANBAWA, Y. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances Plant antimicrobials in food applications: Minireview, in MéndezVilas. **Communicating current research and technological advances**. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, p. 1084 – 1093, 2011.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

VANDEN BERGHE, D. A; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M. & HARBONE, J.D. (eds), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, London, p.47-69,1991.

VERPOORTE, R; VANDER HEIJDEN, R; MEMELINK J. Engeneering the plant cell factory for secondary metaboliteproduction. **Transgenic Res**. V.9, p.323-343, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food Safety and foodborneIllness. Disponível em: <http://www.who.int/inf-fs/en/fact237.html>. Acesso em 31/07/2016, 2003.

YAMAMOTO, T; SASHINAMI, H; NAKANE, A. The cytokine in the maintenance of a persistent infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. **Cytokine**. v. 33, p. 212-218, 2006.

YOSSA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 in organic soil. **Food Control**. v. 21, p. 1458 – 1465, 2010.

Determinação de compostos fenólicos com capacidade antimicrobiana dos extratos de folhas de murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) e ingazeiro (*Inga edulis*)

(Configuração conforme normas da revista)

Determination of phenolic compounds with antimicrobial capacity of extracts of leaves of murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) and ingazeiro (*Inga edulis*)

O objetivo do presente estudo foi determinar compostos com capacidade antimicrobiana de extratos brutos e frações de folhas de *Byrsonima crassifolia* e de *Inga edulis*. Foi realizado uma extração sólido-líquido utilizando três sistemas de solventes (acetato, metanol e metanol:água). Os extratos e frações foram submetidos aos testes de suscetibilidade antimicrobiana para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas através dos métodos de disco-difusão e Concentração Inibitória Mínima-CIM. Para identificação dos compostos fenólicos foi realizada Extração em Fase Sólida (SPE), para pré-concentração e pré-purificação dos extratos e frações que apresentaram potencial antimicrobiano. A fração metanólica conseguiu extrair maior conteúdo de fenólicos totais, e apresentou os maiores halos no teste de disco-difusão. A concentração inibitória mínima variou de 125 a 500 $\mu\text{gES mL}^{-1}$ e de 12,5 a 200 $\mu\text{gES mL}^{-1}$ para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. Após SPE, os extratos brutos e frações apresentaram halos de inibição frente a todos os micro-organismos testados em uma concentração menor que a dos antibióticos padronizados. O ácido gálico, ácido ferrúlico, miricetina e quercetina apresentaram atividade antimicrobiana quando testados isoladamente. Foram identificados e quantificados nos extratos bruto e frações ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido ferrúlico, quercetina, além de outros 4 compostos majoritários para *Byrsonima crassifolia* e 3 compostos para *Inga edulis*.

Palavras-Chave: Matrizes vegetais; Resistência microbiana; Compostos fenólicos; Muruci; Ingá.

INTRODUÇÃO

O surgimento de cepas resistentes vem aumentando e acarretando prejuízos econômicos nas indústrias alimentícias além de colocar em risco a saúde dos consumidores pela grande capacidade de adaptação e resistência que os micro-organismos vêm adquirindo ao longo dos anos com uso abusivo de antibióticos no tratamento de pessoas e animais (FAI, 2008; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O estudo de agentes antimicrobianos possui enorme abrangência, sendo ponto crucial em vários setores e a busca por compostos em óleos essenciais e extratos de plantas como uma abordagem alternativa vem se intensificando e ganhando destaque (PARK et al., 2011; RADJI, et al., 2013).

Extratos naturais vêm sendo utilizados para aumentar a vida de prateleira e melhorar as características dos alimentos. Esses extratos e/ou seus princípios ativos possuem atividade antibacteriana demonstrada em estudos laboratoriais (ALVES et al., 2008; YOSSA et al., 2010; IVANOVIC et al., 2012).

A região amazônica se destaca por sua biodiversidade, possuindo matrizes vegetais que são utilizadas pelas comunidades nativas nas mais variadas formas, como chás, infusões, banhos, ou misturas das partes desses vegetais, no tratamento de variadas infecções, no entanto, poucas espécies foram estudadas e descritas em publicações científicas (BRAZ-FILHO, 1999; RODRIGUES et al., 2014).

O estudo destas plantas amazônicas e de seus compostos bioativos pode favorecer a descoberta de novos compostos antimicrobianos, auxiliando assim no crescimento tecnológico da região (CAVALCANTE, 2011).

Pesquisas têm mostrado o potencial dos compostos em relação à capacidade antimicrobiana nas folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* (PERAZA-SÁNCHEZ, 2007; CAVALCANTE 2011; OKOBA, 2016), entretanto são necessários estudos mais aprofundados para a identificação e isolamento desses componentes, utilizando técnicas que permitam obter resultados de forma eficiente.

Assim, o presente estudo visou identificar os principais compostos fenólicos responsáveis pela capacidade antimicrobiana de folhas de murucizeiro (*Byrsonima crassifolia*) e ingazeiro (*Inga edulis*).

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes químicos

No presente estudo foram utilizados os seguintes reagentes: acetato de etila P.A (Êxodo Científica, Brasil), metanol P.A (Sigma Aldrich, Brasil), Metanol Grau HPLC (Sigma Aldrich, Brasil), ácido fórmico (Tedia, EUA), reagente de Folin(Sigma- Aldrich), ácido gálico (Sigma-Aldrich 98% de pureza), catequina (Sigma-Aldrich 98% de pureza), epicatequina (Sigma-Aldrich 98% de pureza), ácido ferrúlico (Sigma-Aldrich 93% de pureza), delfinidina (Sigma-Aldrich 98% de pureza), quercetina (Sigma-Aldrich 95% de pureza) e miricetina (Sigma-Aldrich).

Matéria-prima

Foram coletadas amostras de duas espécies vegetais (*Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*) na cidade de Bonito, município pertencente à mesorregião nordeste do Estado do Pará.

A identificação taxonômica foi realizada no herbário do museu paraense Emílio Goeldi, pelo método de comparação de exsicatas depositadas no banco de dados do mesmo, possuindo como número de registro 220955 para *Byrsonima crassifolia* e 220956 para *Inga edulis*.

Cepas de micro-organismos utilizadas

Os micro-organismos utilizados foram cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) procedentes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os micro-organismos selecionados foram bactérias Gram-negativas: *Salmonella* Typhimurium INCQS 00150 (ATCC 14028); *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922); e bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* INCQS 00039 (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* INCQS 00234 (ATCC 2912).

Foi realizado teste de confirmação de espécies microbianas e do perfil de sensibilidade aos antibióticos, pelo método automatizado utilizando cartões para identificação Vitek 2® ID. A partir dos dados prévios de perfil de sensibilidade, foram feitas as escolhas dos antibióticos utilizados como controle positivo para cada cepa microbiana.

Obtenções dos extratos vegetais

Pré-tratamento da matéria-prima

As amostras de folhas foram encaminhadas para o Centro de Valorização de Compostos Bioativos da Amazônia-CVACBA (UFPA) e posteriormente submetidas às etapas de seleção manual, lavagem com água corrente, secagem em estufa com circulação de ar (60 °C por 8 horas) e moídas (5 mm de granulometria). Em seguida foram acondicionadas em recipientes plásticos e armazenadas a (± 4 °C) até utilização nos experimentos, conforme metodologia utilizada por Cavalcante (2011).

Preparação dos extratos vegetais

Foi realizado um processo de extração sólido-líquido utilizando três sistemas sequenciais de solventes: acetato de etila, seguido por metanol e por último uma mistura de metanol e água (1:1 v: v) (Pellegrini et al. 2007; Pompeu et al. 2009). Foi realizada extração dupla de uma hora para cada solvente à temperatura de 28 °C, na proporção de 1:6 (massa: volume) de planta seca e solvente. Os extratos obtidos para cada solvente foram misturados e concentrados em evaporador rotativo. Para verificar se existe efeito sinérgico entre as frações, um extrato bruto foi obtido através da junção de volumes iguais das três frações.

Determinação de fenólicos totais e padronização dos extratos vegetais

O teor de polifenóis totais foi determinado pelo método de Folin- Ciocalteu (LAMUELA-RAVENTOS, 1999), expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de extrato seco (mgEQ gES⁻¹). Para avaliação da capacidade antimicrobiana, os extratos foram padronizados para uma concentração de 200 µgEQ mL⁻¹ de extrato seco, diluído em água ultrapura.

Testes de suscetibilidade antimicrobiana: Disco-difusão

A atividade antimicrobiana foi avaliada por meio do método de disco-difusão em ágar de acordo com metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute -CLSI* (2015), sendo realizadas no Instituto Evandro Chagas (IEC), seção de Bacteriologia e Micologia. As suspensões bacterianas foram cultivadas por 18 horas a 36 °C em caldo Mueller-Hinton (Oxoid). Posteriormente uma nova inoculação foi realizada nas mesmas condições, porém incubadas somente por 6 horas (para uso do inoculo recente). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada a escala 0,5 de *McFarland* ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e com o auxílio de *swab* estéril, o inoculo bacteriano foi distribuído uniformemente sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton. Em seguida, utilizando pinça estéril os discos (6mm de papel filtro), foram distribuídos uniformemente sobre a superfície do ágar e impregnados com 10 µL (2 µgEQ- microgramas de equivalentes de quercetina) e 20 µL (4 µgEQ- microgramas de equivalentes de quercetina) dos extratos bruto e frações (Acetato de etila, Metanol e Metanol: água) padronizadas de cada matriz. Para as bactérias Gram-negativas foi utilizado como controle positivo ampicilina (10µg) e para as Gram-positivas vancomicina (30µg). As placas foram incubadas a 36°C por 24 horas e avaliado os halos de inibição formados. Somente os halos com diâmetros ≥ 8 mm foram considerados com atividade antimicrobiana (FIGUEIREDO e SÁBER, 2016; OKOBA, 2016).

Foram utilizados os seguintes padrões para a identificação dos compostos presentes nos extratos, através de cromatografia: ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido ferrúlico, delphinidina, quercetina e miricetina, todos com concentração de 100 µg mL⁻¹ e também realizada avaliação do potencial antimicrobiano de cada padrão e em forma conjunta (mix), pelo método de disco-difusão, utilizando 20 µL (2 µg por disco) de cada composto, como descrito por CLSI, (2015).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, utilizando placa de 96 poços de fundo U contendo 100 µL de caldo Mueller-Hinton (oxoid) segundo metodologia descrita pelo CLSI (2015). Diluições

sucessivas dos extratos brutos e frações foram realizadas de modo a se obter poços com concentrações entre 1,56 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os testes com bactérias Gram-negativas e entre 3,90 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os testes com bactérias Gram-positivas e adicionado 100 μL de cada diluição nos poços correspondentes. Posteriormente 100 μL da suspensão bacteriana ajustada à escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL^{-1}) foi adicionado aos poços. As microplacas foram incubadas a 36 °C por 24 horas e as análises realizadas em triplicata. Após o tempo de incubação, 10 μL de resazurina (0,1mg mL^{-1}) foram adicionados aos poços para facilitar a observação de crescimento microbiano, e no período de 4 a 6 horas observada se houve mudança da coloração. A coloração azul indica ausência de crescimento microbiano e a cor vermelha/rósea indica a presença de células viáveis em crescimento. Foram reservados poços onde foram efetuados os controles da microplaca, para o controle de esterilidade do meio, controle do inóculo, controle do extrato e controle do indicador resazurina.

Os níveis de Concentração Inibitória Mínima utilizados foram de potencial inativo (>100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), potencial fraco (entre 550 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), potencial moderadamente ativo (entre 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e potencial ativo (<100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), segundo Cavalcante (2011) e Okoba (2016).

Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

Extração em Fase Sólida (SPE)

Para extração dos compostos fenólicos, os extratos brutos e frações (4 μgEQ -microgramas de equivalentes de quercetina) que obtiveram resultados positivos na avaliação da atividade antimicrobiana (halos ≥ 8 mm) foram submetidos à extração em fase sólida (*clean up*), utilizando cartucho SPE Strata C18-E (Phenomenex) 55 μm , 200mg 3mL^{-1} , previamente condicionados com 10 mL de metanol com 1% ácido fórmico. Em seguida, 200 μL do extrato bruto e frações foram adicionados a 800 μL de água ultrapura. O *clean-up* foi realizado com 5 mL água ultrapura, e a eluição final foi realizada com metanol 100% (DIAS et al., 2010). A amostra foi seca, pesada e ressuspensa em 5 mL de metanol 40 % com 1% ácido fórmico. Posteriormente foi realizado o teste de atividade antimicrobiana (CLSI, 2015) para os extratos brutos e frações impregnados com 20 μL /disco. As concentrações de fenólicos após SPE impregnadas nos discos foram: 10 μg

gES⁻¹, 12,9 µg gES⁻¹ e 12,2 µg gES⁻¹ por disco de extrato bruto, fração metanólica e fração metanol:água, respectivamente, para *Byrsonima crassifolia* e de 9 µg gES⁻¹, 12,2 µg gES⁻¹ e 8 µg gES⁻¹ por disco de extrato bruto, fração metanólica e fração metanol:água, respectivamente, para *Inga edulis*.

Perfil cromatográfico

Para as análises cromatográficas foi utilizado sistema UHPLC *Thermo Scientific* (EUA) equipado com bomba quaternária (LPG-3400RS), injetor automático (WPS-3000SL Analytical), utilizando como detector um sistema detector de arranjo de diodos-DAD (DAD-3000), software de leitura de dados (Chromoleon 7.1 SR2), célula de fluxo (Standard Analytical) e coluna Kinetex C18 2,6µm, 100x4,6 mm (Phenomenex). Foi injetado 20 µL de amostra (filtradas em filtros de PVDF de 0,45 µm de porosidade e as fases móveis utilizadas foram água ultrapura com 1% de ácido fórmico (solução A) e acetonitrila com 1% ácido fórmico (solução B). Estas foram preparadas e filtradas com membranas de nylon (0,22 µm de porosidade) e submetidas ao banho ultrassônico por 15 minutos para degaseificação.

O gradiente utilizado foi baseado em Dias et al., 2010, com as seguintes modificações: 3% B (0 a 13 minutos); 16% B (18 minutos); 16% B (24 minutos); 19% B (24,5 minutos); 22% B (26 minutos); 36% B (27 minutos); 36% B (34 minutos); 90% B (39 minutos); 90% B (40 minutos); 3% B (43 minutos).

A identificação e quantificação dos compostos nas matrizes foram realizadas através das comparações dos tempos de retenção e área formada com os padrões utilizados. Foi também realizada escolha de picos majoritários, não identificados pelos padrões utilizados, que foram quantificados através da área formada e relacionados a uma possível classe de fenólicos. Os resultados foram expressos em mgEM gES⁻¹ (miligramas de equivalentes miricetina por grama de extrato seco) para *Byrsonima crassifolia* e em mgEQ gES⁻¹ (miligramas de equivalentes quercetina por grama de extrato seco) para *Inga edulis*.

Análise estatística

Os resultados das médias obtidas na análise de atividade antimicrobiana foram submetidos da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de significância de 5% com auxílio do programa Statistica® versão 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do teor de Fenólicos Totais

Os extratos obtidos a partir de *Byrsonima crassifolia* apresentaram maior conteúdo de fenóis totais que os de *Inga edulis* (Tabela 1). Verificou-se que as frações polares, metanol e metanol:água, conseguiram extrair maiores concentrações de fenólicos. Segundo OH et al. (2013), os extratos alcoólicos apresentaram maiores teores de compostos fenólicos, sendo o etanol e o metanol citados como melhores extratores em relação a solventes menos polares e a água pura.

Tabela1. Teor de Fenólicos Totais do extrato bruto e frações de folhas de muruci (*Byrsonima crassifolia*) e Ingá (*Inga edulis*)

Extrato/Frações	Fenólicos Totais (mg EQ gES ⁻¹)	
	<i>Byrsonima crassifólia</i>	<i>Inga edulis</i>
E.B	124,39±4,11	59,49±2,55
F.A.E	43,54±2,21	35,26±2,12
F.M	341,47±5,10	183,65±7,20
F.M:A	210,80±1,56	163,92±2,88

E.B= Extrato bruto. F.A.E = Fração acetato de etila. F.M = Fração metanol. F.M:A = Fração Metanol:água; mg EQ gES⁻¹ = (miligramas de equivalentes de quercetina por grama de extrato seco).

Neste estudo constatou-se que a fração apolar (Acetato de etila) foi a que extraiu menor quantidade de compostos fenólicos. Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos presentes nos alimentos. A solubilidade dos compostos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização e suas interações com outros constituintes dos alimentos (ANGELO, 2007).

Atividade antimicrobiana

Os maiores halos de inibição de crescimento bacteriano foram observados nos discos com maior concentração (4 µg) em equivalentes de quercetina impregnada, visto que esses valores diferiram estatisticamente ($p < 0,5$) dos discos com menor concentração (Tabela 2 e 3). A fração metanol foi a que apresentou maiores halos de inibição, seguida pela fração hidrometanólica e extrato bruto. Isso pode estar relacionado à quantidade de compostos fenólicos extraídos por essas frações, como demonstrados na Tabela 1. A fração acetato de etila não apresentou halos de inibição nos parâmetros utilizados nesse estudo, pois sua característica apolar não conseguiu extrair grande quantidade de fenólicos ou compostos que apresentem atividade antimicrobiana.

Tabela 2. Diâmetro dos halos de inibição obtidos para extrato bruto e frações de *Byrsonima crassifolia*

Micro-organismos	µg EQ/ disco	Extrato Bruto e Frações/Halos de inibição (mm)				Controles (mm)	
		E.B	F.A.E	F.M	F.M:A	AMP	VAN
<i>S.Typhimurium</i>	2	6,89±0,1 ^{bB}	0,00±0,0 ^d	10,95±0,2 ^{aB}	9,33±0,3 ^{bB}	18,60±0,1	
	4	9,13±0,1 ^{cA}	0,00±0,0 ^d	13,02±0,1 ^{aA}	12,00±0,2 ^{bA}		
<i>E.coli</i>	2	6,00±0,4 ^{cB}	0,00±0,0 ^d	10,21±0,4 ^{aB}	8,27±0,1 ^{bB}	15,22±0,1	
	4	7,35±0,2 ^{cA}	0,00±0,0 ^d	14,00±0,2 ^{aA}	11,00±0,2 ^{bA}		
<i>S.aureus</i>	2	10,81±0,2 ^{bB}	0,00±0,0 ^d	12,75±0,4 ^{aB}	7,30±0,3 ^{cB}	17,14±0,1	
	4	14,55±0,3 ^{bA}	0,00±0,0 ^d	19,47±0,2 ^{aA}	10,80±0,2 ^{cA}		
<i>E.faecalis</i>	2	9,10±0,3 ^{bB}	0,00±0,0 ^d	11,39±0,32 ^{aB}	6,83±0,4 ^{cB}	16,13±0,1	
	4	11,86±0,2 ^{bA}	0,00±0,0 ^d	13,79±0,2 ^{aA}	9,83±0,45 ^{cA}		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas (entre frações) e mesma letra maiúscula nas colunas (entre concentrações de mg equivalentes de quercetina por disco) não diferem estatisticamente entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey; Extratos em 2 e 4 microgramas equivalentes quercetina por disco; E.B= Extrato bruto; F.A.E= Fração acetato de etila; F.M= Fração metanol; F.M:A= Fração Metanol:água; AMP= Ampicilina (10 µg); VAN= Vancomicina (30µg).

Tabela 3. Diâmetro dos halos de inibição obtidos para extrato bruto e frações de *Inga edulis*

Micro-organismos	µg EQ/ disco	Extrato Bruto e Frações/Halos de inibição (mm)				Controles (mm)	
		E.B	F.A.E	F.M	F.M:A	AMP	VAN
<i>S.Typhimurium</i>	2	6,48±0,1 ^{cB}	0,00±0,0 ^d	10,55±0,2 ^{aB}	8,33±0,3 ^{bB}	18,60±0,1	
	4	7,81± 0,1 ^{cA}	0,00±0,0 ^d	14,04±0,1 ^{aA}	10,10±0,2 ^{bA}		
<i>E.coli</i>	2	6,91±0,2 ^{cB}	0,00±0,0 ^d	10,21±0,4 ^{aB}	9,37±0,1 ^{bB}	15,22±0,1	
	4	8,71±0,4 ^{cA}	0,00±0,0 ^d	14,00±0,2 ^{aA}	11,60±0,2 ^{bA}		
<i>S.aureus</i>	2	6,48±0,2 ^{cB}	0,00±0,0 ^d	13,00±0,4 ^{aB}	8,60±0,3 ^{bB}	17,14±0,1	
	4	10,19±0,3 ^{cA}	0,00±0,0 ^d	15,77±0,2 ^{aA}	13,00±0,2 ^{bA}		
<i>E.faecalis</i>	2	6,12±0,2 ^{cB}	0,00±0,0 ^d	9,00±0,2 ^{aB}	7,03±0,4 ^{bB}	16,13±0,1	
	4	8,10±0,3 ^{cA}	0,00±0,0 ^d	11,00±0,3 ^{aA}	9,00±0,4 ^{bA}		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas (entre frações) e mesma letra maiúscula nas colunas (entre concentrações de mg equivalentes de quercetina por disco) não diferem estatisticamente entre si, a 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey; Extratos em 2 e 4 microgramas equivalentes quercetina por disco; E.B= Extrato bruto; F.A.E= Fração acetato de etila; F.M= Fração metanol; F.M:A= Fração Metanol:água; AMP= Ampicilina (10 µg); VAN= Vancomicina (30µg).

Os extratos de plantas são importantes fontes de agentes antimicrobianos devido à presença de metabólitos secundários das plantas, especialmente os compostos fenólicos. Esses compostos com propriedades biológicas, e seu uso no bem-estar humano são mais frequentemente preferidos em relação às drogas sintéticas, por serem menos prejudiciais na saúde humana (BHATTACHARYA et al., 2016). Em geral foram encontrados, halos de inibição satisfatórios nas duas matrizes, principalmente pela utilização de concentrações de equivalentes de quercetina menores (2 e 4 µg) do que os padrões utilizados, ampicilina e vancomicina, 10 e 30 µg por disco, respectivamente. Isso demonstra o grande espectro de ação antimicrobiana e a ação considerável dos componentes bioativos presentes nas duas matrizes.

Gellen e Silva (2016), não observaram atividade antimicrobiana ao estudarem raízes de *Byrsonima crassifolia*. Cavalcante (2011) e Dutra (2016) observaram ação antimicrobiana ao utilizarem folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* respectivamente.

A leitura da atividade antimicrobiana pode ser influenciada por diversos fatores tais como, composição química da espécie vegetal, época de colheita, parte da planta utilizada em estudo, origem geográfica e forma de extração. Além disso, deve-se salientar os diferentes padrões de resistência apresentados pelos micro-organismos, a origem de sua obtenção (isolamento) e características ao gênero em questão podem influenciar no efeito inibitório do material testado (MOURA et al., 2013).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A fração metanólica foi a que obteve menor CIM, seguida da fração metanol:água e extrato bruto (Tabela 4). Isso pode estar diretamente ligado ao fato da capacidade que a fração metanólica demonstrou de concentrar maior teor de fenólicos, compostos que estão diretamente correlacionados com várias propriedades biológicas, inclusive atividade antimicrobiana (ANGELO, 2007; SOUZA, et al., 2008).

As frações metanólica e hidrometanólica nas duas matrizes demonstraram-se como ativas (< 100 µg mL⁻¹) para os micro-organismos Gram-negativos e moderadamente ativas para os Gram-positivos. Os Extratos brutos das duas matrizes vegetais apresentaram potencial moderadamente ativo (100 a 500 µg mL⁻¹) para todas as bactérias testadas. Okoba (2016),

ao avaliar raízes de *Byrsonima cydonifolia* encontrou CIM de 703 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente a espécies de *Salmonella* e *E.coli*, em extratos a 20 e 30% hidroalcoólicos. Já Cavalcante (2011), encontrou valores entre 83 a 267 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*S.typhi*); 233 e 467 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*E.coli*); 133 e 367 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*S.aureus*) e 303 e 333 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (*E.faecalis*), em extratos bruto de folhas de *Byrsonima* e *Inga edulis*, respectivamente, a uma concentração de 50 mg mL^{-1} .

Tabela 4. Valores de Concentração Inibitória Mínima dos extratos bruto e frações de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*

Matrizes vegetais	Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{gES mL}^{-1}$ para extrato bruto e frações de folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i> e <i>Inga edulis</i>				
	Extratos/ frações	Micro-organismos			
		<i>S. Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
<i>Byrsonima crassifolia</i>	E.B	100,00	100,00	500,00	500,00
	F.M	12,5	12,5	125,00	125,00
	F.M:A	50,00	50,00	250,00	250,00
<i>Inga edulis</i>	E.B	200,00	200,00	500,00	500,00
	F.M	12,5	12,5	125,00	125,00
	F.M:A	25,00	25,00	125,00	125,00

Os níveis de CIM utilizados foram: > 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (inativo); CIM entre 500 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (fraco); CIM entre 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (moderadamente ativo); CIM < 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ativo).

Os resultados do presente estudo demonstram uma considerável ação dos extratos brutos e frações, sendo necessárias baixas concentrações para inibição dos micro-organismos testados, principalmente os Gram-negativos (*S. Typhimurium* e *E. coli*). Deve-se levar em consideração o fato de que existe uma gama de compostos atuando nessas matrizes, podendo este efeito inibitório ser ainda maior a partir de uma purificação de compostos de interesse, que possuem atividade frente as cepas microbianas.

Teste disco-difusão após Extração em Fase Sólida (SPE)

Os extratos brutos e frações das duas matrizes apresentaram halos com atividade antimicrobiana (\Rightarrow 8mm) para todos os micro-organismos testados (Tabela 5). A fração metanol apresentou os maiores halos tanto para os micro-organismos Gram-negativos como para os Gram-positivos.

Esses resultados podem ser explicados pela maior concentração e purificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos brutos e frações, já que um dos princípios deste tipo de extração é a retirada de compostos interferentes e a concentração de

compostos de interesse através do uso de diferentes solventes em contato com partículas de adsorvente e amostra (QUEIROZ et al., 2000).

Tabela 5. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de disco-difusão para o extrato bruto e frações de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* após pré-purificação por SPE

Matrizes Vegetais	Halos de inibição (mm) para extrato bruto e frações de folhas de <i>Byrsonima crassifolia</i> e <i>Inga edulis</i> após Extração em Fase Sólida				
	Extratos/Frações µg ES ⁻¹ /disco	<i>Micro-organismos</i>			
		<i>S.Typhimurium</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>
<i>Byrsonima crassifolia</i>	E.B (10,0)	9,00±0,2	9,20±0,2	12,00±0,1	11,12±0,2
	F.M(12,9)	16,00±0,1	14,50±0,2	14,75±0,1	16,01±0,3
	F.M:A(12,2)	12,00±0,2	12,88±0,2	12,60±0,1	12,54±0,2
<i>Inga edulis</i>	E.B(9,0)	9,23±0,2	8,88±0,2	12,02±0,1	10,00±0,1
	F.M(12,2)	15,56±0,2	12,89±0,3	15,89±0,1	13,95±0,1
	F.M:A(8,0)	12,01±0,4	11,01±0,3	13,00±0,1	12,00±0,2
AMP		19,11±0,1	17,00±0,1		
VAN				17,23±0,1	15,00±0,1

E.B= Extrato bruto. F.-M= Fração metanol. F.M:A=Fração Metanol:água. AMP= Ampicilina (10 µg). VAN= Vancomicina (30µg).

Os extratos brutos e frações das duas matrizes apresentaram considerável efeito inibitório sobre as bactérias em estudo (Tabela 5), e em concentrações equivalentes a ampicilina (10 µg) e menores que a vancomicina (30 µg), utilizados como controle. Mais estudos devem ser feitos para a melhor elucidação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais com compostos mais concentrados e purificados, para possível utilização como antibiótico natural em substituição das drogas sintéticas utilizadas atualmente, que apresentam cada vez menos efeito bactericida, pela resistência que os micro-organismos têm adquirido ao longo dos anos.

Teste disco-difusão para padrões de compostos fenólicos

Os resultados demonstraram que o ácido gálico, ácido ferrúlico, quercetina e miricetina apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas de micro-organismos testadas, comprovando seu potencial quando aplicados de forma isolada (Tabela 6). O mix dos compostos fenólicos também apresentou potencial antimicrobiano, demonstrando halos maiores que 8 mm para os micro-organismos Gram-negativos como para os Gram-positivos, evidenciando seu efeito sinérgico. Os compostos foram eficazes na formação

de halos inibitórios, pois estavam em uma concentração menor (2 µg) do que os padrões que foram utilizados como controle, ampicilina (10 µg) e vancomicina (30 µg).

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é variável de acordo com a espécie microbiana testada e estrutura da molécula. Em relação a sua estrutura química, o grau de hidroxilação do composto é o fator de maior impacto na toxicidade para determinados micro-organismos. No entanto, os mecanismos de ação destes compostos ainda não foram totalmente esclarecidos (CAMPOS; COUTO; HOGG, 2003).

Tabela 6. Diâmetro dos halos de inibição obtidos pelo método de disco-difusão para padrões de compostos fenólicos isolados e em forma de MIX

Padrões de compostos fenólicos	Halos de inibição (mm)/ Micro-organismos			
	<i>S.Typhimurium</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>
Ácido Gálico	7,0±0,4	8,0±0,3	8,0±0,4	9,0±0,4
Ácido ferrúlico	10,0±0,1	10,0±0,1	12,0±0,3	10,0±0,3
Catequina	0,00	0,00	0,00	0,00
Epicatequina	0,00	0,00	0,00	0,00
Quercetina	9,0±0,3	9,0±0,1	8,5±0,1	8,0±0,2
Miricetina	12,0±0,2	12,4±0,3	16,0±0,3	14,0±0,2
MIX ¹	10,0±0,3	11,20±0,3	14,30±0,2	13,11±0,1
AMP	19,21±0,1	17,34±0,1		
VAN			17,00±0,1	15,45±0,1

Padrões concentrados em 2µg por disco; Mix¹= Junção de todos os padrões; AMP= Ampicilina (10 µg). VAN= Vancomicina (30µg).

A miricetina foi o composto que apresentou maior capacidade de inibição, sendo observados os maiores halos nas bactérias testadas, e próximos aos halos obtidos pelos antibióticos padrões quando testados frente a *S. aureus* e *E. faecalis*. A literatura relata este composto como tendo uma potente atividade antimicrobiana quando encontrada em matrizes vegetais (NANA et al., 2014; BHATTACHARYA, et al., 2016).

Perfil cromatográfico

O perfil cromatográfico de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis* estão representados nas Tabelas 7 e 8, respectivamente. Constatou-se a presença de catequina, epicatequina, quercetina e ácido ferrúlico nos extratos bruto e frações, além de ácido gálico presentes nos extratos bruto das duas matrizes. Esses compostos, no entanto, apresentaram-se em baixas concentrações e não se encontraram dentro do limite da curva de calibração

realizada para a quantificação dos mesmos. Apenas na fração metanol:água foram quantificados os conteúdos de catequina e epicatequina, fato que pode estar relacionado ao solvente mais polar utilizado nesta fração, que segundo a literatura consegue uma melhor extração de flavanóis, classe de compostos fenólicos em que se encontram a catequina e epicatequina (ALVARENGA, 2013). Os compostos majoritários observados na *Byrsonima* apresentaram tempo de retenção de 20,30 minutos (composto 1), 17,58 minutos (composto 2), 18,70 minutos (composto 3) e 23,00 minutos (composto 4), e para *Inga edulis* tempos de 13,56 minutos (composto 1), 13,82 minutos (composto 2) e 17,2 minutos (composto 3), com picos de absorção em espectros ultravioleta em 350 nm.

Tabela 7. Concentração dos compostos fenólicos do extrato bruto e frações de *Byrsonima crassifolia*

Extratos e frações	Composto fenólico	Classe de fenólicos	Comprimento de onda de leitura (nm)	Tempo de retenção (min)	Quantificação dos compostos (mgEM gES ⁻¹)
Extrato bruto	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	3,20	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,87	n.q
	Epicatequina	Flavanol	280	10,40	n.q
	Ácido ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	n.q
	Quercetina	Flavanol	350	27,47	n.q
	Composto B1	Flavanol	350	20,30	20,00±0,35
	Composto B2	Flavanol	350	17,58	23,00±0,40
	Composto B3	Flavanol	350	18,70	23,00±0,45
Fração metanólica	Composto B4	Flavanol	350	23,00	20,00±0,45
	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	n.i	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,87	n.q
	Epicatequina	Flavanol	280	10,40	n.q
	Ácido ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	n.q
	Quercetina	Flavanol	350	27,47	n.q
	Composto B1	Flavanol	350	20,30	81,00±0,25
	Composto B2	Flavanol	350	17,58	70,00±0,35
Fração metanol:água	Composto B3	Flavanol	350	18,70	58,00±0,40
	Composto B4	Flavanol	350	23,00	38,00±0,40
	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	n.i	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,84	1,00±0,40
	Epicatequina	Flavanol	280	10,39	1,00±0,35
	Ácido ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,20	n.q
	Quercetina	Flavanol	350	27,41	n.q
	Composto B1	Flavanol	350	20,30	36,90±0,50
Composto B2	Flavanol	350	17,58	39,10±0,50	
Composto B3	Flavanol	350	18,70	25,00±0,45	
Composto B4	Flavanol	350	23,00	23,80±0,45	

Os desvios padrões representam as variações nas concentrações da análise em triplicata. n.i=não identificado; n.q= não quantificado; nm= nanômetros; min=minutos; mgEM gES⁻¹=miligramas equivalentes miricetina por grama de extrato seco.

Souza et al. (2007) encontraram concentrações de 0,82; 9,67 e 25,43 mg EAG gES⁻¹ (miligrama equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco) para ácido gálico, catequina, epicatequina, respectivamente, em frações de extratos de *Inga edulis*. Dias et al. (2010) ao avaliarem o perfil de folhas de *Inga edulis* observaram concentrações de 1,98, 13,61, 6,32 e 1,76 mg g FS⁻¹ (miligrama por grama de fração seca) para ácido gálico, catequina, epicatequina e quercetina, respectivamente. Foram ainda identificados por esses autores a presença de procianidina B1, procianidina B2, quercetina raminapiranosídeo, miricetina nos extratos de *Inga edulis*.

Tabela 8. Concentração dos compostos fenólicos do extrato bruto e frações de *Inga edulis*

Extratos e frações	Composto fenólico	Classe de fenólicos	Comprimento de onda de leitura (nm)	Tempo de retenção (min)	Quantificação dos compostos (mgEQ gES ⁻¹)
Extrato bruto	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	3,20	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,87	n.q
	Epicatequina	Flavanol	280	10,40	n.q
	Ác. ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	n.q
	Quercetina	Flavonol	350	27,47	2,00±0,45
	Composto I1	Flavonol	350	13,56	7,00±0,30
	Composto I2	Flavonol	350	13,82	5,20±0,50
	Composto I3	Flavonol	350	17,2	5,73±0,25
Fração metanólica	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	n.i	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,87	n.q
	Epicatequina	Flavanol	280	10,40	n.q
	Ác.ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	n.q
	Quercetina	Flavonol	350	27,47	n.q
	Composto I1	Flavonol	350	13,56	79,00±0,40
	Composto I2	Flavonol	350	13,82	49,00±0,50
	Composto I3	Flavonol	350	17,2	6,40±0,40
Fração metanol:água	Ácido gálico	Ác.benzóico	280	n.i	n.q
	Catequina	Flavanol	280	7,84	2,00±0,40
	Epicatequina	Flavanol	280	10,39	2,00±0,55
	Ác.ferrúlico	Ác.cinâmico	280	14,21	1,00±0,45
	Quercetina	Flavonol	350	27,39	n.q
	Composto I1	Flavonol	350	13,56	10,00±0,65
	Composto I2	Flavonol	350	13,82	8,00±0,50
	Composto I3	Flavonol	350	17,2	110,00±0,70

Os desvios padrões representam as variações nas concentrações da análise em triplicata. n.i=não identificado; n.q= não quantificado; nm= nanômetros; min=minutos; mgEQ gES⁻¹=miligramas equivalentes quercetina por grama de extrato seco.

Gordon et al. (2011), observaram a presença de 19 tipos diferentes de compostos fenólicos em *Byrsonima crassifolia*, incluindo o ácido gálico, proantocianidinas e derivados de quercetina. Souza et al. (2008), observaram como composto majoritário em folha de *Inga edulis* a miricetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo com concentrações de 16,51 mg EAG gES⁻¹ (equivalente ácido gálico por grama de extrato seco). Assim como Dias et al.

(2010), que observaram a miricetina-3-O- α -L-raminopiranosídeo em concentrações de 18,52 e 26,82 mg g FS⁻¹ (miligramas por grama de fração seca).

A variação na identificação e quantificação de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, quantidade de metabólitos secundários presentes na planta, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes (ANGELO, 2007).

Os compostos majoritários presentes nas duas matrizes possivelmente estão inseridos na classe dos flavonóis, pelo tempo de retenção e espectro de absorção, fato que pode estar diretamente ligada a atividade antimicrobiana apresentada pelas matrizes, já que compostos dessa classe têm sido relacionados a inúmeras propriedades biológicas, inclusive atividade antimicrobiana (RAMOS et al., 2002; SOARES; PROENÇA, 2008). É necessário, mais pesquisas que possam identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nessas matrizes vegetais, além do isolamento desses compostos por cromatografia preparativa e avaliações de atividade antimicrobiana para elucidação de sua eficiência de forma isolada e em sinergismo com a matriz vegetal.

CONCLUSÃO

Os extratos brutos e frações metanólica e metanol:água apresentaram atividade antimicrobiana nas duas matrizes no teste de disco-difusão, em concentrações menores do que a utilizada nos antibióticos padrões, apresentando valores de CIM com potencial ativo a moderado para as frações metanólica e metanol:água e potencial moderado para os extratos brutos. A técnica de SPE conseguiu purificar/ concentrar maiores conteúdos de compostos fenólicos apresentando halos de inibição satisfatórios para todos os micro-organismos testados. Os padrões de compostos fenólicos, com exceção da catequina e epicatequina, apresentaram atividade antimicrobiana para todos os micro-organismos testados. Na análise cromatográfica foram identificados 4 compostos majoritários para *Byrsonima crassifolia* e 3 para *Inga edulis*, pertencentes possivelmente a classe dos flavonóis. De forma geral, as matrizes vegetais apresentam-se com um enorme potencial antimicrobiano, necessitando, mais pesquisas para isolamento e purificação desses compostos e sua influência sobre as bactérias, para possíveis utilizações como por exemplo, formulação de antibiótico natural em substituição das drogas sintéticas.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, F. Q.; MOTA, B. C. F.; LEITE, M. N.; FONSECA, J. M. S.; OLIVEIRA, R. V. A. In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal Ethnopharmacol.** v.150(1), p. 280-284, 2013.
- ALVES, E. G. A. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova.** v. 31, n. 5, p. 1224 – 1229, 2008.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Phenolic Compounds in foods- A brief review. **Ver. Inst. Adolfo Lutz.** 66(1): 1-9, 2007.
- BHATTACHARYA, S.; MAITY, S.; PRAMANICK, D.; HAZRA, A. K.; CHOUDURY, M. Hplc of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activity of bulbs from three ornithogalum species available in india. **International Journal of Pharmacy and Phamaceutical Sciences.** vol. 8, n.7, 2016.
- BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure and Appleid Chemistry.** v. 71, n. 9, p. 1663-1672, 1999.
- CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; HOGG, T. A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **Journal of Applied Microbiology.** v. 94, p. 167–174, 2003.
- CAVALCANTE, M. A. Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas. Belém, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Pará- Belém, 2011.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI).Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement.v.35, n. 3, 2015.
- DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Purification of phenolic compounds from *Inga edulis* leaves using solid-phase extraction: major compounds quantification and antioxidant capacity evaluation. **Química Nova.**v. 33,p. 38-42, 2010.
- DUTRA, F. S. G.; CARLOS, L. A.; MOTTA, O. V.; VIANNA, A. P.; PEREIRA, S. M. F. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente à bactérias de importância médica. **Biol.& Saúde.** 20(6): 1-13, 2016.
- FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosona em sistemas de conservação de alimentos. **Iberoamericana de polímeros.** v.9 (5), p.435-451, 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; SÁBER, M. L. Antimicrobial activity of ethanol extracts of *Caesalpinia pulcherrima*. **Electronic Journal Collection Health**. vol. 8 (2), 853-860, 2016.

GELLEN, L. F. A.; SILVA, E. H. C. Antimicrobial activity of extracts of *Byrsonima crassifolia* roots. **J. Bioen. Food Sci**, 03 (2): 63-71, 2016.

GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B. A.; MAIA, J. G. S.; MARX, F. Phenolic Constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon Region. **Agricultural and Food Chemistry**.v.59, p. 7688-7699, 2011.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. vol. 33, No. 3, p. 667-679, 2010.

IVANOVIC, J.; MISIC, D.; ZIZOVIC, I.; RISTIC, M. In vitro control of multiplication of some food-associated bacteria by thyme, rosemary and sage isolates. **Food Control**. v. 25, p. 110-116, 2012.

LAMUELA – RAVENTOS ;SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P; GOSMANN, G. MELLO, J. C. P; MENTZ, L. A; SINGLETON, V.L; ORTHOFER, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin- Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzimology**. 299: 152-178, 1999.

MOURA, F. M. L; BAPTISTA, R. I. A. A; SANTOS, V. V. M; MOURA, A. P. B. L; COSTA, M. M. Use of plants Caatinga in control of pathogens of interest food área-A review. **ACTA Veterinária Brasilica**. v.7, n.2, p.125-136, 2013.

NANA, V. K. A; NADEEM, M. D; PARDHA, S. M; MAHENDRAN, B. S. Cumulative activity of the p-coumaric acid and syringaldehyde for antimicrobial activity of different microbial strains. **Eur J Exp Biol**. v. 4, p. 40-3, 2014.

OH, J; JO,H; CHO, A. R; KIM, S. J; HAM, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**.v.31, n.2, p. 263-620, 2013.

OKOBA, D. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de frutos do pantanal: *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (Canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (Laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã).Campo Grande -MS, 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste)- Programa em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-Campo Grande, 2016.

PARK, Y. S; LEE, H.; CHIN, B. S; HAN, S. H; HONG, S. G; HONG, S. K; KIM, H. Y; UH, Y; SHIN, H. B; CHOO, E. J; HAN, S. H; SONG, W; JEONG, S. H; LEE, K; KIM, J. M. Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems. **Journal of hospital infection**. v. 79, p. 54–58, 2011.

PELLEGRINI, N; COLOMBI, B; SALVATORE, S; BRENNNA, O. V; SALVATORE, S; BRENNNA, O. V; GALAVERNA, G; DEL RIO, D; BIANCHI, M; BENNET, R. N; BRIGHENTI. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetables foods:

efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 87, p. 103-111, 2007.

PERAZA-SÁNCHEZ, S. R; PELLEGRINI, N; COLOMBI, B; SALVATORE, S; BRENN, O. V; SALVATORE, CEN-PACHECO, F; NOH-CHIMAL, A; MAY-PAT, F; SIMÁ-POLANCO, P; DUMONTEIL, E; GARCÍA-MISS, M. R; MUTMARTÍN, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. **Fitoterapia**, v.78, p. 315–318, 2007.

POMPEU, D; SILVA, E; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 6076-6082, 2009.

QUEIROZ, S. C. N; COLLINS, C. H; JARDIM, I. C. S. F. Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids subsequent chromatographic determination. **Quimica Nova**. v.24, n.1, p.68-76, 2000.

RADJI, M; AGUSTAMA, R. A; ELYA, B; TJAMPAKASAN, C. R. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistanci *Pseudomonas aeruginosa*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.3 (8), p. 663-667, 2013.

RAMOS, T. M. M; DURAN, J. D. G; ONTIVEROS, O. A; ESPINOSA, J. M; PEREA-CARPIOR, M; CHIBOWSKI, E. Investigation of alumina/ (+)-catechin system properties. Part I: a study of the system by FTIR-UV-Vis spectroscopy. **Colloids Surf B Biointerfaces**. 2002 Apr;24(3-4):297-308. [http://dx.doi.org/10.1016/S0927-765\(01\)00284-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0927-765(01)00284-3).

RODRIGUES, I. A; AZEVEDO, M. M. B; CHAVES, F. C. M; ALVIANO, C. S; ALVIANO, D. S; VERMELHO, A. B. Arrabidaea chica hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on Leishmania spp. **BioMed Res. Int.** v. pp. 7, 2014.

SOARES-SILVA, L. H; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Psidium* L.(Myrtaceae) from southern Brazil.**Bot. J. Linn Soc.** v.158(1), p.51-54, 2008.[http:// dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00727.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.2008.00727.x).

SOUZA, J. N. S; SILVA, E. M; LOIR, A; REES, J. F; ROGEZ, H; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**. 106, p331-339, 2008.

SOUZA, J. N. S; SILVA, E. M; SILVA, M. N; ARRUDAL M. S. P; LARONDELLE, Y; ROGEZ, H. Identificacion and antioxidante activity of Several flavonoids of *Inga Edulis* leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 18, No. 6, 1276-1280, 2007.

YOSSA, N. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 in organic soil. **Food Control**. v. 21, p. 1458 – 1465, 2010.