



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

MARÍLIA DE ALMEIDA CAVALCANTE

**Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de
espécies vegetais amazônicas**

**BELÉM
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

MARÍLIA DE ALMEIDA CAVALCANTE

Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas

Dissertação de mestrado IV apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito necessário à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza

Co-orientadora: Dr. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

BELÉM

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

I.1.1 Biblioteca do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Cavalcante, Marília de Almeida

Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies vegetais amazônicas / Marília de Almeida Cavalcante; orientador, Jesus Nazareno Silva de Souza e Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco._ Belém - 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2011

1. Química orgânica 2. Antioxidantes 3. Microbiologia 4. Plantas-composição I. Título

CDD 22.ed. 547.2



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

MARÍLIA DE ALMEIDA CAVALCANTE

Estudo do potencial antimicrobiano e antioxidante de espécies
vegetais amazônicos

DATA DA AVALIAÇÃO: ____ / ____ / ____.

CONCEITO: _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jesus N. S. de Souza
(PPGCTA/FEA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof^a. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
(FCF/USP – co-orientadora)

Profa. Dra. Vanessa A. B. da Cunha
(FEA/ITEC/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Hervé L. G. Rogez
(PPGCTA/FEA/ITEC/UFPA – Membro)

Dedico a realização deste trabalho principalmente a Deus e a Nossa Senhora de Nazaré, aos meus pais Fernando e Ana Cavalcante, aos meus irmãos Marcelo e Marina e a minha filha Paola. Ninguém um dia recebeu mais amor e apoio incondicional do que eu tive de vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) e ao Projets Interuniversitaires Ciblés (PIC) pelo suporte financeiro para execução deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Jesus Souza pela orientação durante esses dois anos de mestrado. Sempre lembrarei a primeira conversa sobre este trabalho, no qual você disse: “A atividade antimicrobiana é um desafio!”. Então...desafio lançado, aceito e vencido!!!!Obrigada Jesus pelos ensinamentos!

A minha co-orientadora Prof. Bernadette Franco pela orientação, oportunidade, conhecimentos passados e por conceder o espaço físico e estrutura para o aprendizado das técnicas de atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Hervé Rogez pela orientação, apoio, oportunidade de aprendizado, disponibilidade de ajuda e sugestões, contribuindo sempre com o melhor de si para o desenvolvimento deste trabalho!

A Prof. Vanessa Cunha pelo conhecimento repassado, amizade e importante auxílio dado para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

*A Deus e a Nossa Senhora de Nazaré pelas bênçãos dadas durante todos esses anos e por sempre darem força e coragem para superar todos os momentos difíceis ao longo desse mestrado. **“Toda honra e glória é dada a ti Senhor!”***

Aos meus pais Fernando e Ana Cavalcante que sempre foram o alicerce na minha vida e que me ensinaram a vencer todos os obstáculos com dignidade e perseverança. Saibam que todas as vezes que pensei em desistir foi por causa de vocês que levantei a cabeça e segui em frente. Serei eternamente grata! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos Marcelo e Marina Cavalcante pelo amor, carinho, apoio e amizade. A minha filha Paola Damasceno, que é um presente de Deus. Vocês são essenciais na minha vida! Amo demais vocês!

Ao meu namorado Jonas Mangabeira pelo amor, amizade, respeito, incentivo, carinho e dedicação. Obrigada principalmente pelas palavras e apoio nos momentos mais difíceis! Você me faz a cada dia querer ser melhor em tudo! Te amo e te admiro muito!

A minha cunhadinha Lia Bastos pelo carinho e respeito!

A todos os bolsistas e técnicos do laboratório de microbiologia de alimentos da USP, em especial ao Matheus Barbosa pela paciência e conhecimentos compartilhados.

As minhas queridas Blenda Divino e Larissa Margalho por me ajudarem no desenvolvimento deste trabalho. A amizade, o carinho e o respeito que vocês sempre demonstraram foi incentivador para cada dia de manipulação no laboratório. Obrigada por terem trazido tão bons momentos durante nossa intensa convivência!

Aos meus colegas de trabalho do Centro de Valorização Agroalimentar de Compostos Bioativos da Ammazônia (CVACBA), Ana Caroline Oliveira, Caroline Santos, Fagner Aguiar, Gyorgy Ferreira, Lílian Saito, Lívia Miagawa, Rafael Holanda, Rafaelle Oliveira, Rivaldo Amaral, Socorro Lopes, Verena Rebelo. Em especial ao Aureliano Dias, Elem Caramês, Fernanda Damin, Fernanda Wariss e Luciana Silva, pelo auxílio técnico, amizade e momentos agradáveis vivenciados.

A todos do laboratório de microbiologia de alimentos da UFPA, em especial a Prof. Consuelo, Dona Célia Costa e Suefy.

Aos meus colegas de mestrado, em especial a Josilene Lima e a Liana Andrade que participaram do processo inicial de desenvolvimento deste trabalho.

A todos vocês que participaram direta ou indiretamente na realização desta dissertação deixo os meus sinceros agradecimentos:

*“Vocês que com seu amor me fizeram livre,
Que com sua amizade me fizeram forte,
Que com sua companhia me fizeram feliz,
Sois o sopro que guia minha mente,
A energia que move minhas mãos,
O impulso que gera minha voz e o meu canto,
Em minha conquista, sua presença.”*

(Autor desconhecido)

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Fl 4, 13

“É preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas.”

Antoine de Saint-Exupéry

“É um paradoxo a Terra se mover ao redor do Sol e a água ser constituída por dois gases altamente inflamáveis. A verdade científica é sempre um paradoxo, se julgada pela experiência cotidiana que se agarra a aparência efêmera das coisas.”

Karl Marx

RESUMO

Extratos vegetais ricos em compostos biologicamente ativos vêm sendo utilizados em diversos segmentos industriais, principalmente pela presença de substâncias naturais em substituição às sintéticas, pois estas sintéticas estão relacionadas com diversos efeitos danosos a saúde. Atualmente, a Região Amazônica, em função da sua biodiversidade apresenta um crescente interesse na busca por espécies vegetais que sintetizem esses compostos. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos de folhas, cascas, e ramos de dezessete plantas amazônicas. Os extratos foram obtidos por extração sequencial com acetato de etila, metanol e metanol:água (1:1 v/v) acidificados com 0,1% de HCl, na proporção de 1g de material seco para 6 mL de solvente durante uma hora, sem agitação e a temperatura ambiente. A fase orgânica foi evaporada, obtendo os extratos acetato de etila (EAE), metanólico (EM) e hidrometanólico (EHM), sendo que metade da massa de cada extrato obtido foi misturada para obtenção do extrato bruto (EB). Foram determinados os teores de polifenóis, flavonóis e proantocianidinas totais; a capacidade antioxidante pelos métodos ORAC e DPPH; a atividade antimicrobiana em seis cepas bacterianas pelo teste de difusão em disco e a concentração mínima inibitória (CMI) pelo método de microdiluição. Os EB apresentaram importante capacidade antioxidante pelo método ORAC e elevado teor de polifenóis totais, sendo 17% correspondendo a flavonóis totais e 8% as proantocianidinas totais. EB de onze plantas apresentaram atividade antimicrobiana em pelo menos uma cepa estudada e as folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Inga edulis*, as cascas de *Cedrela odorata*, os ramos de *Stryphnodendron barbatiman* e as partes aéreas de *Phyllanthus niruri* apresentaram atividade para todas as cepas. A CMI para os EB indicou que a maioria são considerados ativos. O EB das folhas de *Byrsonima crassifolia* destacou-se por apresentar o maior conteúdo em polifenóis totais, uma das maiores capacidade antioxidante e amplo espectro de ação antibacteriana. Os extratos EM e EHM de nove vegetais selecionados apresentaram elevados teores em polifenóis totais e capacidade antioxidante. Sendo os EAE, EM e EHM das folhas de *Byrsonima crassifolia* que apresentaram menor CMI para todas as cepas estudadas. Os resultados demonstraram que os vegetais amazônicos possuem potencial antioxidante e antimicrobiano, indicando seu possível uso nas indústrias alimentícias.

ABSTRACT

Plant extracts rich in biologically active compounds have been used in various industrial segments, mainly by the presence of natural substances to replace the synthetic, because they synthetic are related to various adverse health effects. Nowadays, the Amazon Region, due to its biodiversity presents a growing interest in the search for plant species containing these compounds. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant potential of extracts from leaves, bark, stems and roots of seventeen Amazonian plants. The extracts were obtained by sequential extraction with ethyl acetate, methanol and methanol: water (1:1 v / v) acidified with 0.1% HCl in a proportion of 1g of dry material to 6 mL of solvent for an hour without agitation. After the evaporation of the organic phase, extracts of ethyl acetate (EAE), methanol (ME) and hydromethanolic (MHE) were obtained, and half of each extract was mixed to obtain the crude extract (CE). It was determined the content of polyphenol, flavonols and total proanthocyanidins; the antioxidant capacity by ORAC and DPPH methods; the antimicrobial activity of six bacterial strains by disc diffusion test and minimum inhibitory concentration (MIC) by microdilution method. On the average, the EB presented a significant antioxidant capacity by ORAC method and a high content of polyphenols, 17% corresponding to flavonols and 8% total proantocinidinas. The CE of eleven plants showed activity in at least one strain studied and the leaves of *Byrsonima crassifolia* and *Inga edulis*, the bark of *Cedrela odorata*, the branches of *Stryphnodendron barbatiman* and aerial parts of *Phyllanthus niruri* showed activity for all strains. The MIC for CE indicated that the majority are considered active. The CE of the leaves of *Byrsonima crassifolia* stood out for having the highest content of total polyphenols, one of the greatest antioxidant capacity and broad spectrum of bacterial action. The EAE, ME and MHE extracts from nine selected plants showed the highest levels of polyphenols and antioxidant capacity. Being that the EAE, ME and MHE of *Byrsonima crassifolia* leaves had the lower MIC for all strains. The results showed that the Amazonian plants have antioxidant and antimicrobial potential, which indicates its possible use in food industries.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAPH	2,2'-azinobis(-amidinopropano)-dihidrocloro
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Cell Collectin
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHI	Infusão de sangue e coração
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
EAE	Extrato acetato de etila
EAG	Equivalentes Ácido Gálico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECat	Equivalentes Catequina
ECia	Equivalentes Cianidina
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EB	Extrato Bruto
EM	Extrato metanólico
EHM	Extrato hidrometanólico
ERRO	Espécies Reativas do Oxigênio
ERut	Equivalentes Rutina
ES	Extrato seco
ET	Equivalentes Trolox
ETA	Enfermidade Transmitida por Alimentos
FC	Folin-Ciocalteu
FOT	Flavonóis Totais
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
G	Grama
HCl	Ácido clorídrico
IAL	Instituto Adolfo Lutz
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

μL	Microlitros
μg	Micrograma
μM	Micromol
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
mL	Mililitros
MeOH	Metanol
MHC	Caldo Mueller-Hinton
MPS	Matéria Prima Seca
N_{2(g)}	Nitrogênio gasoso
NaOH	Hidróxido de sódio
NCCLS	National Commitee for Clinical Laboratory Standards
Nm	Nanômetro
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
pH	Potencial de Hidrogênio
PG	Propil-galato
PROT	Proantocianidinas Totais
PT	Polifenóis Totais
AS	Sem Atividade
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
TBARS-LDL	Thiobarbituric Acid Reactive Substances-Low Density Lipoprotein
TBHQ	Ter-butil-hidroquinona
Trolox	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-ácido carboxílico
TSA	Agar Triptona de Soja
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
UCL	Universidade Católica de Louvain
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultravioleta
V	Volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
CAPÍTULO I. OBJETIVOS E ESCOPO DO TRABALHO.....	17
I.1 OBJETIVO GERAL.....	18
I.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
I.3 ESCOPO DO TRABALHO	18
CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
II.1 MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS	21
II.2 COMPOSTOS BIOATIVOS EM MATRIZES VEGETAIS	22
II.2.1 <i>Compostos fenólicos</i>	24
II.2.2 <i>Alcalóides</i>	25
II.2.3 <i>Terpenóides</i>	26
II.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	26
II.3.1 <i>Considerações gerais</i>	26
II.3.2 <i>Medidas da capacidade antioxidante</i>	29
II.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	31
II.4.1 <i>Mecanismo de ação</i>	32
II.4.2 <i>Medidas da atividade antimicrobiana</i>	33
II.4.3 <i>Bactérias selecionadas para os testes antimicrobianos</i>	36
II.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MATRIZES VEGETAIS.....	39
II.6 APLICAÇÕES DOS EXTRATOS VEGETAIS RICOS EM COMPOSTOS BIOATIVOS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA	41
CAPÍTULO III. METODOLOGIAS.....	52
III.1 SELEÇÃO, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS MATERIAIS VEGETAIS	53
III.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS.....	54
III.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO EM COMPOSTOS FENÓLICOS.....	55
III.3.1 <i>Polifenóis totais</i>	55
III.3.2 <i>Flavonóis totais</i>	56
III.3.3 <i>Proantocianidinas totais</i>	56
III.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	56

III.4.1	<i>Método ORAC</i>	56
III.4.2	<i>Método DPPH</i>	56
III.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	57
III.5.1	<i>Cepas de microrganismos utilizados</i>	57
III.5.2	<i>Ativação e manutenção das cepas</i>	57
III.5.3	<i>Preparo do inóculo contendo os microrganismos</i>	58
III.5.4	<i>Preparo dos extratos para os ensaios antimicrobianos in vitro</i>	58
III.5.5	<i>Método de difusão em disco</i>	58
III.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO.....	59
III.6.1	<i>Preparo dos extratos</i>	59
III.6.2	<i>Metodologia de microdiluição</i>	59
III.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
CAPÍTULO IV. SCREENING DE ESPÉCIES VEGETAIS AMAZONICAS SOBRE O POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE.....		64
IV.1	INTRODUÇÃO	65
IV.2	MATERIAL E MÉTODOS	67
IV.2.1	<i>Material vegetal</i>	67
IV.2.2	<i>Reagentes químicos</i>	68
IV.2.3	<i>Preparação dos extratos vegetais</i>	69
IV.2.4	<i>Determinação do conteúdo em compostos fenólicos</i>	69
IV.2.5	<i>Avaliação da capacidade antioxidante</i>	70
IV.2.6	<i>Determinação da atividade antibacteriana</i>	70
IV.2.7	<i>Análise estatística</i>	73
IV.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
IV.3.1	<i>Avaliação do extrato bruto</i>	73
IV.3.2	<i>Avaliação dos extratos com diferentes polaridades</i>	84
CAPÍTULO V. CONCLUSÕES GERAIS		93

INTRODUÇÃO

Muitas espécies vegetais são estudadas objetivando-se entender as propriedades biológicas e o mecanismo de ação dos compostos responsáveis pela propriedade. O interesse em estudar os vegetais vem aumentando devido os mesmos constituírem a base energética e estrutural da cadeia alimentar e pelo seu uso como matéria prima na elaboração de remédios (VIEGAS Jr; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Os terpenóides, compostos fenólicos, alcalóides, entre outros são substâncias sintetizadas no metabolismo secundário dos vegetais para proteção contra as adversidades do habitat. Esses compostos com atividade biológica constituem uma estratégia de inovação em diversos segmentos industriais, destacando-se os setores alimentício, farmacêutico, cosmético, sanitizante e agroquímico. Assim, diversas pesquisas que buscam encontrar plantas com potencial antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatória entre outros têm sido desenvolvidas (BRAZ-FILHO, 1999; AHMAD; BEG, 2001; OTHMAN et al., 2011; NEWMAN; CRAGG, 2007).

Neste contexto, a Região Amazônica se destaca em virtude da quantidade e variedade de espécies vegetais nativas e exóticas de importância econômica, muitas das quais são utilizadas pelas comunidades nativas na medicina popular, entretanto poucas espécies são estudadas e descritas em publicações científicas (BRAZ-FILHO, 1999). O estudo destas plantas amazônicas, ricas em compostos biologicamente ativos, pode favorecer a descoberta de novos compostos antioxidantes e antimicrobianos, fato que auxiliaria no desenvolvimento da região.

Os antioxidantes são compostos que em baixas concentrações quando comparadas ao substrato oxidável apresentam a capacidade de inibir ou bloquear os processos oxidativos. Para prolongar a estabilidade dos produtos alimentícios durante processamento e estocagem são adicionados antioxidantes sintéticos, como butil-hidroxi-tolueno (BHT) e o butil-hidroxi-anisol (BHA), entretanto estas substâncias vêm sendo relacionadas com efeitos danosos a saúde. Assim, a busca por antioxidantes de fontes naturais que possam substituir os sintéticos tem recebido muita atenção por parte do segmento industrial e acadêmico (DECKER, 2008; MATKOWSKI, 2008; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008; BOTTERWECK et al., 2000; DAHANUKAR; KULKANI; REGE, 2000).

A deterioração de alimentos por ação microbiana é outro fator de grande importância nas indústrias alimentícias, devido acarretar prejuízos econômicos, além de colocar em risco a

saúde dos consumidores. A fim de se tentar solucionar tal problema, conservantes sintéticos são utilizados para aumentar a vida de prateleira e manter a qualidade e o frescor dos produtos. No entanto, a partir da década de 80, a busca por agentes antimicrobianos naturais aumentou consideravelmente, devido à restrição dos conservantes químicos sintéticos principalmente pelo seu potencial carcinogênico (RAUHA, 2000).

Além da deterioração dos alimentos, recentes surtos de intoxicações alimentares têm promovido uma busca por formas inovadoras de inibir o crescimento microbiano, para este fim, são empregados alguns métodos de conservação, como o uso de embalagens com inserção de materiais com propriedades antimicrobianas ou adição de conservantes naturais (APPENDINI; HOTCHKISS, 2002; DUARTE, 2006).

Dentro desse contexto, fez-se necessário um estudo sobre espécies vegetais amazônicas visando determinar a capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana, e em seguida em uma etapa posterior, caracterizar e identificar os compostos responsáveis por estas atividades.

No decorrer deste trabalho de dissertação, o leitor encontrará: no capítulo I, os objetivos e o escopo do trabalho; no capítulo II, uma revisão bibliográfica contextualizando o conhecimento atual sobre os temas em estudo e os aspectos teóricos mais importantes para compreensão dos experimentos, resultados e conclusões que serão tiradas; no capítulo III, serão apresentadas as metodologias empregadas para o desenvolvimento deste trabalho; no capítulo IV, serão apresentados na forma de artigo, os resultados e a discussão relacionados ao estudo do potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies vegetais amazônicas. O último capítulo (Capítulo V) será dedicado à apresentação das conclusões gerais e perspectivas.

CAPÍTULO I
OBJETIVOS E ESCOPO DO TRABALHO

I.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de extratos obtido de espécies vegetais amazônicas.

I.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as espécies vegetais da flora amazônica;
- Avaliar a concentração em compostos fenólicos totais, flavonóis totais e proantocianidinas totais,
- Avaliar a capacidade antioxidante pelos métodos ORAC e DPPH;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos frente às bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*) pelo método de difusão em disco e,
- Determinar a concentração mínima inibitória pelo método de microdiluição dos extratos brutos e dos extratos acetato de etila, metanólico e hidrometanólico.

I.3 ESCOPO DO TRABALHO

A floresta amazônica é a maior floresta tropical do mundo e abrange nove países, Brasil, Equador, Venezuela, Colômbia, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Bolívia e Peru, onde o primeiro apresenta maior porção da floresta. A flora amazônica brasileira apresenta um grande número de espécies vegetais ricas em compostos biologicamente ativos, que são utilizadas há anos pelas comunidades nativas no tratamento de diversas enfermidades (SILVA et al., 2007).

Desta forma, o estudo aprofundado dos compostos bioativos contidos nas diferentes espécies vegetais amazônicas tem despertado o interesse da comunidade científica em determinar seus usos e aplicações, no entanto, é importante proteger, gerenciar e desenvolver de forma sustentável esses recursos vegetais.

As espécies vegetais amazônicas, como todas as outras do mundo, sintetizam metabólitos secundários para proteção contra os efeitos danosos do habitat, participação nos processos de detoxificação e regulação do crescimento. Estudos vêm sendo desenvolvidos para determinação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas e caracterização química e bioquímica desses compostos (SIMÕES et al., 2000; MARTINI et al., 2009, SELMA; ESPÍN; TOMAS-BARBERA, 2009).

Neste trabalho, a pré-seleção das espécies vegetais foi realizada através das informações obtidas do projeto PIC (Projets Interuniversitaires Ciblés) intitulado “Estudos químicos, nutricionais e tecnológicos de antioxidantes naturais a partir de plantas amazônicas” (2002-2006) cujas instituições parceiras foram a Universidade Católica de Louvain (UCL) da Bélgica e, Universidade Federal do Pará (UFPA). Os pesquisadores deste projeto criaram um banco de dados com aproximadamente 300 plantas utilizando como principais critérios: (i) presença de flavonóides como principais constituintes em plantas de mesmo gênero; (ii) a espécie vegetal deveria ser exclusivamente amazônica e (iii) uso no tratamento de enfermidades pela população local. Dentre essas plantas foram selecionadas dezessete espécies vegetais que são utilizadas pela população local contra algumas enfermidades, sendo muitas destas causadas por bactérias.

CAPÍTULO II
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 MATRIZES VEGETAIS AMAZÔNICAS

A floresta amazônica possui a maior biodiversidade do planeta, onde a Amazônia brasileira, com seus 5.056.107 Km², abrange a maior área desta floresta. Sua economia é baseada no extrativismo vegetal e mineral e na extensa criação de bovinos (RIOS et al., 2001).

Na Região Amazônica, os habitantes reproduzem há várias gerações os mesmos métodos de produção e hábitos alimentares, com destaque para a caça e a pesca, além da utilização de diversas plantas medicinais. Diversos vegetais amazônicos são utilizados na forma de chá, infusões e tintura pela população local no tratamento de infecções, no entanto, não há evidências científicas concretas da eficácia desses vegetais. Nos últimos anos, o estudo da caracterização fitoquímica de plantas medicinais e seus efeitos farmacológicos tem aumentado (BRAZ-FILHO, 1999; SILVA et al., 2007).

A construção de uma Amazônia sustentável passa por uma exploração racional dos seus recursos naturais, principalmente os originados do extrativismo e da agricultura familiar. Além disso, a Região Amazônica possui uma grande variedade de plantas que apresentam atividade biológica devido ao clima, a extensão territorial e sua grande diversidade da fauna e flora. Esse interesse por produtos vegetais tem favorecido o conhecimento das suas características e potencialidades, incluindo morfologia, composição química, propriedades nutricionais e farmacológicas (SILVA, 2006; FOGLIO et al., 2006; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

A exploração racional do potencial das matrizes vegetais amazônicas poderá proporcionar 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, deve-se considerar a comercialização de extratos vegetais ricos em substâncias com potencial antioxidante e antimicrobiano como estratégia de desenvolvimento da 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).

Neste contexto, Silva et al. (2007) avaliaram a atividade antioxidante e o conteúdo em compostos fenólicos de extratos obtidos de 15 espécies vegetais da região Amazônica. Estes autores observaram que as espécies *Byrsonima crassifolia*, *Bauhinia macrostachya*, *Cecropia palmata*, *Cedrela odorata*, *Cordia exaltata*, *Davilla kunthii*, *Davilla rugosa*, *Inga edulis* e *Stryphnodendron barbatiman* podem ser consideradas como fontes de antioxidantes, principalmente devido aos seus elevados teores em compostos fenólicos.

Na Tabela 1 é apresentado o nome popular, a parte da planta usada no tratamento de enfermidades e o uso terapêutico de algumas espécies vegetais amazônicas.

Tabela 1. Espécie, nome popular, parte da planta utilizada na medicina popular e uso terapêutico de plantas amazônicas.

Espécie	Nome popular	Parte	Uso terapêutico
<i>Acmella oleracea</i>	Jambu	Folha	Analgésico
<i>Annona montana</i>	Guanabana	Folha	Antiinflamatório
<i>Arrabidaea chica</i>	Pariri	Folha, casca, raiz	Analgésico, antiinflamatório, antianêmico
<i>Bixa orellana</i>	Urucum	Folha	Antiinflamatório
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Muruci	Folha, casca	Diurético, antiinflamatório
<i>Cedrela odorata</i>	Embaúba	Folha, casca	Antiinflamatório
<i>Connarus perrotetti</i>	-	Folha	Antiinflamatório
<i>Croton cajucara</i>	Sacaca	Folha, casca	Antiinflamatório
<i>Dalbergia monetaria</i>	Verônica	Folha, casca	Antiinflamatório, antianêmico
<i>Davilla kunthii</i>	Cipó-fogo	Folha, casca	Antiinflamatório, purgante
<i>Davilla rugosa</i>	Cipó-caboco	Folha, casca	Antiinflamatório, purgante
<i>Inga edulis</i>	Ingá-cipó	Folha, casca	Antiinflamatório, antiarrético
<i>Phyllanthus niruri</i>	Quebra-pedra	Planta	Antiinflamatório, antiinfecção urinária
<i>Scoparia dulcis</i>	Vassourinha	Planta	Antiinflamatório
<i>Solanum juripeba</i>	Jurubebinha	Folha	Antiinflamatório
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Barbatimão	Folha, casca	Antiinflamatório
<i>Tabernaemontana angulata</i>	Grão de cachorro	Folha	Antiinflamatório

Fonte: Silva et al, 2007; Diop, 2003.

II.2 COMPOSTOS BIOATIVOS EM MATRIZES VEGETAIS

Compostos bioativos são constituintes ‘extranutricionais’ que ocorrem naturalmente em pequenas quantidades nos vegetais. Estes compostos são classificados de acordo com sua estrutura química e função biológica. Exibem um amplo espectro de efeitos biológicos, incluindo o antibacteriano, antiinflamatório e hepatoprotetor, ação antitrombótica, antiviral,

anticancerígena e vasodilatadora; sendo que muitas dessas funções biológicas relatadas são conferidas principalmente por sua atividade antioxidante (PENNY et al., 2002; SOOBRAATTEE et al., 2005; PAIXÃO et al., 2007).

Compostos biologicamente ativos são divididos em dois grupos distintos, de acordo com o metabolismo, em primários e secundários (NIERO et al., 2003). Os metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos e são essenciais ao crescimento e a vida, como os aminoácidos, os carboidratos, os lipídeos, entre outros. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, com distribuição em todas as partes dos vegetais e caracterizados por uma grande diversidade de estruturas químicas (NODARI; GUERRA, 2000; NIERO et al., 2003).

Metabólitos secundários, como terpenóides, carotenóides, ácidos fenólicos, flavonóides, fitoesteróis, cumarinas, antraquinonas, e alcalóides são sintetizados em diferentes vias metabólicas através de contínuas transformações bioquímicas. Nos vegetais, estes compostos possuem como função: a proteção contra predadores e radiação ultravioleta; a participação nos processos de alelopatia em outras espécies e nos processos de detoxificação; regulação do crescimento e atrativos para agentes polinizadores (HERRMANN; WILLENS; JANKE, 2001; RON; WILLS; MORGAN, 2000; SIMÕES et al., 2000).

A síntese dos metabólitos secundários pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores que apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, como exemplo, da sazonalidade, índice pluviométrico, temperatura, altitude, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Estudos vêm sendo realizados para aplicação destes compostos bioativos em diferentes setores industriais, devido à sua ação antimicrobiana em microrganismos resistentes aos antibióticos comerciais; à atividade antioxidante; à ativação de enzimas hepáticas contra intoxicações; à inibição da agregação plaquetária e a inibição do crescimento de bactérias gastrointestinais indesejáveis (LEE et al.; 2003; HERRMANN et al., 2001).

A composição química das matrizes vegetais amazônicas selecionadas para este trabalho ainda não foi elucidada completamente, porém conforme descrito por Silva et al. (2007) essas plantas são relativamente ricas em compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, os quais podem apresentar atividade antioxidante. No entanto, outros compostos

como os alcalóides e terpenóides podem também estar presentes nesses vegetais e estar envolvidos nessas ações biológicas.

II.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são sintetizados a partir das vias bioquímicas do ácido chiquímico e a do ácido malônico e suas estruturas químicas são derivadas do anel aromático (C₆) ligado a um ou mais grupos hidroxilas. Mais de 10.000 estruturas já foram identificadas, que vão desde simples monômeros a complexos polímeros. Com base em sua estrutura e na forma como os anéis fenólicos ligam-se entre si são classificados em fenóis simples, ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos, estilbenos, flavonóides, bi-flavonóides, taninos, ligninas, entre outras conforme Tabela 2 (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Tabela 2. Classes e estrutura química dos compostos fenólicos.

Classes	Estrutura química
Fenóis simples	C ₆ -
Ácidos benzoicos	C ₆ -C ₁
Acetofenonas, Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos cinâmicos	C ₆ -C ₃
Naptoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, Isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanans	(C ₆ -C ₃) ₂
Bi-flavonóides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados ou proantocianidinas	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Fonte: Balasundram; Sundram; Samman, 2006.

Compostos fenólicos estão presentes no caule, casca, ramo, folha, flor e frutos das plantas e sua principal função é proteção aos ataques externos. No entanto, a composição destes compostos para variar qualitativa ou quantitativamente dentro de uma mesma planta e em diferentes plantas (BEART; LILLEY; HALSAM, 1985; CHEYNIER, et al.; 2005).

Estudos científicos têm demonstrado os efeitos benéficos dos compostos fenólicos tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esses compostos proporcionam as características sensoriais dos produtos à base de vegetais e são sidos descritos pela propriedade de inibir a propagação de células cancerígenas (DEL RIO et al., 2010; SELMA; ESPIN; TOMAS-BARBERA, 2009).

Uma das principais características dos compostos fenólicos é a sua capacidade antioxidante, no entanto estudos têm demonstrado sua atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos e vírus (ALMAJANO, 2008).

A atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos depende da espécie microbiana e da 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 microrganismos. No entanto, os mecanismos de ação destes compostos sobre os microrganismos ainda não foi totalmente esclarecido (CAMPOS; COUTO; HOGG, 2003; TAGURI; TANAKA; KOUTO, 2004).

II.2.2 Alcalóides

Alcalóides são compostos nitrogenados e amplamente distribuídos nas plantas. Constituem uma grande família com mais de 15.000 metabólitos secundários, entre os quais destacam-se a morfina, a codeína e a heroína. Algumas famílias de plantas, como Annonaceae e Solanaceae, são conhecidas por serem ricas em alcalóides (TAIZ; ZEIGER, 2004; BRUNETON, 2009).

Apesar da diversidade de suas estruturas, os alcalóides são derivados principalmente dos aminoácidos triptofano, lisina e tirosina. Além do seu papel no metabolismo do nitrogênio e seu armazenamento dentro do vegetal, estes compostos possuem diversas propriedades biológicas, confirmando seu papel de proteção das plantas. A maioria dos alcalóides tem sabor amargo agindo como repelente aos ataques externos e outros, como a nicotina, são tóxicos. Esses compostos são principalmente conhecidos pela sua atividade antimicrobiana com um amplo espectro de ação (LOUIS, 2005; MOREL et al., 2005; SINGH, 2002; SCAZZOCHIO et al., 2001).

As partes das plantas que acumulam os alcalóides são geralmente aquelas responsáveis pela sobrevivência da espécie ou aqueles expostos na periferia do vegetal e, portanto mais propenso aos ataques externos (HOPKINS, 2003). Nos vegetais, esses compostos estão principalmente na forma de sais ou ligados aos taninos nos vacúolos. Em geral, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos apolares e em alcoóis (BRUNETON, 2009).

II.2.3 Terpenóides

Os terpenos são responsáveis pelo odor das plantas, sua estrutura química de base é $C_{10}H_{16}$ e podem ser classificados de acordo com a quantidade de carbonos em hemiterpenos (C_5), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Quando estes compostos contêm elementos adicionais, como o oxigênio, são denominados de terpenóides (COWAN, 1999).

Terpenóides são sintetizados a partir de unidades de acetato e deste modo compartilham suas origens com os ácidos graxos. Estes compostos se diferenciam dos ácidos graxos devido as suas extensas ramificação e aos seus ciclos. Os terpenóides comumente encontrados em espécies vegetais são a canfora (monoterpeno) e o farnesol (sesquiterpeno) (COWAN, 1999).

Assim como os dois grupos de moléculas citados anteriormente nas seções 3.2.1 e 3.2.3, os sesquiterpenos são geralmente sintetizados pela planta para formar uma defesa natural contra os ataques de agentes externos. Esses compostos são solúveis em solventes orgânicos apolares (BRUNETON, 2009).

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 que ocorra uma ruptura da membrana pelos compostos lipofílicos (COWAN, 1999). Neste contexto, Mendoza et al. (1997) encontraram que o aumento da hidrofiliicidade dos terpenóides pela adição de um grupo metil reduziu drasticamente sua atividade antibacteriana.

II.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

II.3.1 Considerações gerais

Os antioxidantes são compostos que, presentes em baixas concentrações quando comparadas ao substrato oxidável, apresentam a capacidade de inibir ou bloquear os processos oxidativos (DECKER, 2008; MATKOWSKI, 2008; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Em condições normais, os antioxidantes são sintetizados pelas células vegetais ou animais, e constituem uma defesa natural contra os danos causados pelas espécies reativas do oxigênio (ERO), onde as moléculas alvo do processo de oxidação são os lipídeos, as proteínas e os hidratos de carbono (RICE-EVANS et al., 1997; ROBARDS et al., 1999).

Os radicais livres são ERO que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, tornando-os altamente reativos. Estes radicais livres possuem uma tendência para completar sua órbita através da captura de um elétron para ser tornar mais estável e, portanto, esses radicais serão reduzidos pela oxidação de outros compostos. Em particular, são capazes de interagir com vários substratos biológicos, tornando-os tóxicos. Essas interações podem levar a desnaturação protéica ou quebra no DNA, tendo efeitos graves e irreversíveis para a célula e consequentemente ao organismo exposto a essas moléculas (SOUZA, 2007).

As plantas e os animais apresentam mecanismos de defesa natural contra os danos causados pelos ERO's. No entanto, é possível que essas defesas endógenas não sejam eficientes e a oferta exógena de antioxidante torna-se necessária. Assim, a ingestão de compostos bioativos com atividade antioxidante poderá aumentar a proteção do corpo ou dos alimentos contra os ataques do ERO.

Do ponto de vista alimentar, a oxidação lipídica é indesejável, pois esta alteração é responsável pela perda da qualidade de inúmeros alimentos. Um antioxidante para uso em alimentos deve apresentar as seguintes características: não afetar a cor, sabor e odor, ter um custo baixo, ser atóxico, eficaz em baixas concentrações, estável e capaz de resistir ao processamento. A escolha do uso de antioxidante depende da compatibilidade com o produto e com as orientações das agências reguladoras (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com sua origem em sintéticos e naturais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Os antioxidantes sintéticos apresentam uma estrutura fenólica, que permite a doação de um próton ao radical livre, regenerando assim compostos oxidados e interrompendo o processo de oxidação. Como exemplos de sintéticos temos: o butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA), ter-butil-hidroquinona (TBHQ), propil galato (PG), palmitato de ascorbila, entre outros (Figura 1) (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

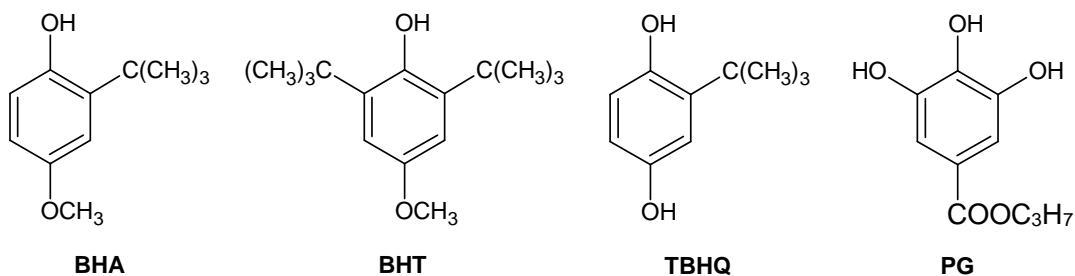


Figura 1. Estrutura química de antioxidantes sintéticos; BHA: butil-hidroxi-anisol, BHT: butil-hidroxi-tolueno, TBHQ: ter-butirl-hidroquinona, PG: propil galato.

Os naturais são aqueles encontrados nos organismos vivos, como as enzimas glicose oxidase, superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase presentes em animais; ou o ácido ascórbico, compostos fenólicos, tocoferóis, tocotrienóis e carotenóides presentes em vegetais (Figura 2) (RAMALHO; JORGE, 2006; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

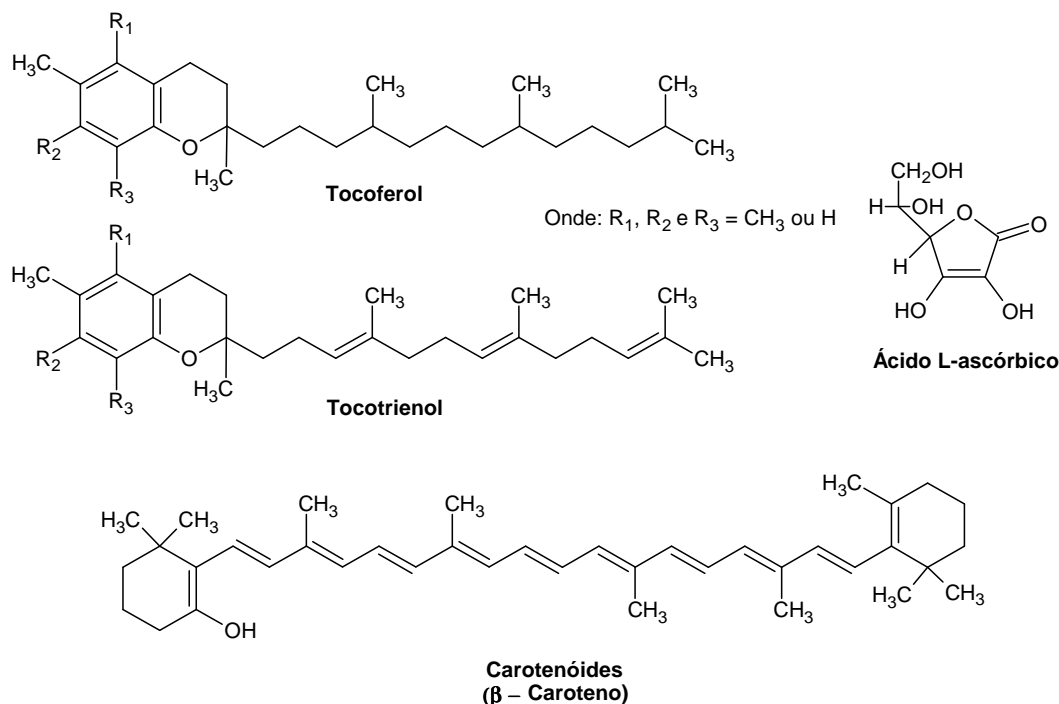


Figura 2. Estrutura química de antioxidantes naturais.

Os mecanismos de ação dos compostos com atividade antioxidante são quimicamente atribuídos à capacidade de capturar os radicais livres, à doação de átomos de hidrogênio ou

elétron, à captura do oxigênio singleto, à inibição de enzimas oxidantes ou quelação de íons metálicos (PIETTA, 2000; PAIXÃO et al., 2007; MAQSOOD; BENJAKUL, 2010).

II.3.2 Medidas da capacidade antioxidante

Diversos métodos são descritos para medir a atividade antioxidante de uma amostra, porém nenhum reflete verdadeiramente esta propriedade, uma vez que nenhum método existente contemple todos os mecanismos de ação de um determinado antioxidante. Uma maneira geral para analisar a atividade antioxidante é a avaliação da produção de radicais livres e sua inibição pelos antioxidantes (ROBARDS et al., 1999). Assim, diferentes metodologias têm sido propostas para mensurar a atividade antioxidante de amostras vegetais, como o ORAC (Oxygen Radical Absorbance), o TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), o de Folin-Ciocalteu, o FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma), o TBARS-LDL (Thiobarbituric Acid Reactive Substances-Low Density Lipoprotein), entre outros (OU et al., 2002; ALMAJANO et al., 2008).

As principais características para os testes antioxidantes são: um substrato adaptado, um iniciador de oxidação (indutor) e uma medida apropriada do ponto final da reação. No entanto, são numerosas as combinações de substratos, indutores e ponto final. Estes métodos podem ser baseados na transferência de elétrons, que medem a habilidade de redução do substrato (antioxidante) ou de átomos de hidrogênio, os quais avaliam a habilidade do substrato em doar hidrogênio (ROBARDS et al., 1999; MacDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006).

Nos itens a seguir, serão detalhados os métodos utilizados no presente trabalho para medir a atividade antioxidante de extratos vegetais amazônicos.

II.3.2.1 Método ORAC

Este método foi desenvolvido por Cao; Alessio; Culter (1993) e é baseado na medida dos danos causados pelos radicais livres a uma prova fluorescente, por meio da mudança na intensidade da sua fluorescência. A inibição desses danos por um antioxidante é uma medida

do seu potencial antioxidante contra o radical livre (CAO; ALESSIO; CULTER, 1993; OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001; HUANG et al., 2002).

No método ORAC, diferentes geradores podem ser utilizados para produzir diferentes radicais, como por exemplo, o radical peroxila e o hidroxila. Entretanto, o método utiliza o radical peroxila como padrão, pois é o mais comum nos sistemas biológicos. Cao; Alessio; Culter (1993) inicialmente propuseram a β -ficoeritrina (proteína) como substrato alvo, cuja perda da fluorescência era um indicador da extensão dos danos causados pela sua reação com o radical peroxila. Entretanto devido à baixa reprodutibilidade do método com esta substância, adotou-se uma nova prova fluorescente, a fluoresceína, molécula estável e com melhores resultados para reação de degradação (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

O método ORAC consiste na reatividade do substrato oxidável (fluoresceína) com radicais peroxil produzidos pela decomposição térmica a 37°C do AAPH (2,2-azinobis(-amidinopropano)-dihidrocloreto) em fase aquosa e a pH 7,4. A diminuição induzida na fluorescência do substrato pela decomposição do AAPH é medida na presença e na ausência da amostra antioxidante no decorrer de 50 minutos de reação. O trolox (equivalente hidrossolúvel da vitamina E) é comumente utilizado como o antioxidante padrão (PRIOR et al., 2003).

II.3.2.2 Método DPPH

O método DPPH baseia-se na facilidade com que a forma radicalar recebe um elétron ou um átomo de hidrogênio retirado de um substrato. A quantidade do radical DPPH removida do meio, acompanhada pela diminuição na absorbância da solução do radical, é proporcional a atividade “seqüestradora” da amostra, sendo possível, assumir que a inibição do DPPH é equivalente a atividade antioxidante dos compostos presentes na amostra (ESPÍN; GARCÍA-CONESA; TOMÁS-BARBERÁN, 2000). A inibição pode ser comparada ao antioxidante sintético (trolox, BHA, entre outros) e a descoloração, perda da cor púrpura para o amarelo, resultante é monitorada por espectrofotometria (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Alguns autores sugerem que o método de redução do radical DPPH é uma reação de transferência de elétrons. Entretanto, neste método pode ter também a transferência de hidrogênio, onde a transferência de elétrons inicial ocorre muito rapidamente, e a subsequente

transferência de hidrogênio ocorre mais lentamente (FOTI; DAQUINO; GERACI, 2004; PRAKASH, 2001).

II.3.2.3 Método de Folin-Ciocalteu

O método de Folin-Ciocalteu é empregado para estimar o teor de fenóis totais em amostras vegetais. Entretanto, o reagente de Folin-Ciocalteu (FC) não é específico para os compostos fenólicos, já que pode ser reduzido por diversos compostos não fenólicos. Os compostos fenólicos reagem com o reagente FC somente em condições alcalinas (pH~10), onde a dissociação do próton fenólico favorece a formação de um ânion fenolato, o qual reduz o FC. Assim, o método consiste em uma reação de transferência de elétrons (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004). É um método relativamente de simples execução, reprodutível e tem sido utilizado em estudos de antioxidantes fenólicos (MacDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006).

II.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os agentes antimicrobianos são considerados como todas as substâncias (de origem natural, sintética ou semi-sintética), que inibem o crescimento dos microrganismos exercendo a sua ação a nível molecular, no processo metabólico ou na estrutura celular dos microrganismos (TAVEIRA et al., 2008).

O agente antimicrobiano pode atuar especificamente sobre uma etapa essencial do metabolismo das bactérias (agentes antibacterianos) ou dos fungos (agentes antifúngicos) e pode ser classificado de acordo com a sua estrutura química ou modo de ação. Para ser considerada como ideal, o agente antimicrobiano deve exibir toxicidade relativa, podendo ser uma função de um receptor específico necessário para ligação do composto ou depender da inibição de eventos bioquímicos essenciais para o microrganismo, no entanto tais efeitos não devem ser observados no hospedeiro (MIMS et al., 1999; TAVEIRA et al., 2008).

II.4.1 Mecanismo de ação

Conforme o mecanismo de ação, os agentes antimicrobianos podem possuir efeitos microbiostáticos ou microbicida. Os agentes microbiostáticos induzem bloqueios reversíveis da síntese protéica dos microrganismos; este fenômeno impede a sua multiplicação e em seguida o organismo os elimina por intermédio de mecanismos imunológicos. Os agentes microbicidas podem inibir a síntese protéica dos microrganismos ou destruir a membrana citoplasmática provocando lesões profundas e irreversíveis nas células dos microrganismos (TAVEIRA et al., 2008).

De modo geral, os agentes antibacterianos podem inibir a respiração e/ou a fosforilação oxidativa; as funções da membrana celular; a síntese de ácidos nucléicos e a síntese protéica (FONSECA, 1999; SCHAECHTER et al., 2002; SOUZA et al., 2003). Enquanto que, os agentes antifúngicos podem inibir os esteróides da membrana celular; atuar intracelularmente interrompendo processos celulares vitais, como síntese de DNA, RNA ou proteínas e inibir a parede celular (TAVEIRA et al., 2008; SCHAECHTER et al., 2002; ZACCHINO et al., 2003).

A atividade antimicrobiana de uma substância pode ser dividida em três etapas: [1] as substâncias associam-se aos microrganismos e penetram nas suas células; [2] são transportadas para um sítio ativo intracelular e [3] liga-se a sítios bioquímicos específicos, executando suas ações bioquímicas. A resistência a essas substâncias pode ocorrer em cada uma dessas etapas. O mecanismo de resistência relevante inclui a síntese de enzimas que inativam o composto, a prevenção e a modificação do sítio alvo (SCHAECHTER et al., 2002).

Diversos estudos foram realizados com a finalidade de conhecer o sítio de ação dos agentes antimicrobianos, porém estes estudos são relativamente complexos, pois várias modificações ocorrem nos microrganismos expostos a estes compostos, tornando-se difícil estabelecer o local primário da lesão celular, o que leva a deterioração das atividades vitais (PELCZAR; CHAN, 1993).

II.4.2 Medidas da atividade antimicrobiana

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a susceptibilidade *in vitro* de microrganismos a agentes antimicrobianos. Estes testes são de grande importância em estudos sobre epidemiologia de resistência e em investigações sobre compostos bioativos com atividade antimicrobiana (NCCLS, 2006).

A atividade antimicrobiana pode ser determinada *in vitro* através de dois métodos principais: diluição para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e/ou de difusão em disco para determinar a susceptibilidade antimicrobiana (ALVES et al., 2008).

O pH, a composição do meio, a estabilidade do composto, a concentração do inóculo e a atividade metabólica dos microrganismos são fatores que afetam todos os métodos *in vitro* aplicados para determinar a atividade antimicrobiana (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

II.4.2.1 Teste de difusão em disco

O teste de difusão em disco é um método qualitativo e fundamenta-se na difusão da substância em estudo em um meio de cultura sólido inoculado com um microrganismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, onde não há o crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição (NCCLS, 2006).

Diferentes tipos de reservatório podem ser empregados, incluindo os discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e orifícios feitos no meio de cultura (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991). A substância ou extrato a ser testado é colocado em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método de difusão em disco, método dos cilindros ou método dos orifícios. Após incubação, os diâmetros dos halos de inibição (Figura 3) produzidos são medidos com régua, paquímetro ou leitor de halos. Dentre estes, o método de difusão em disco de papel é o mais adequado para se trabalhar com extratos vegetais extraídos com solventes orgânicos (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

O teste de difusão é indicado para estabelecer a sensibilidade do microrganismo, 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).

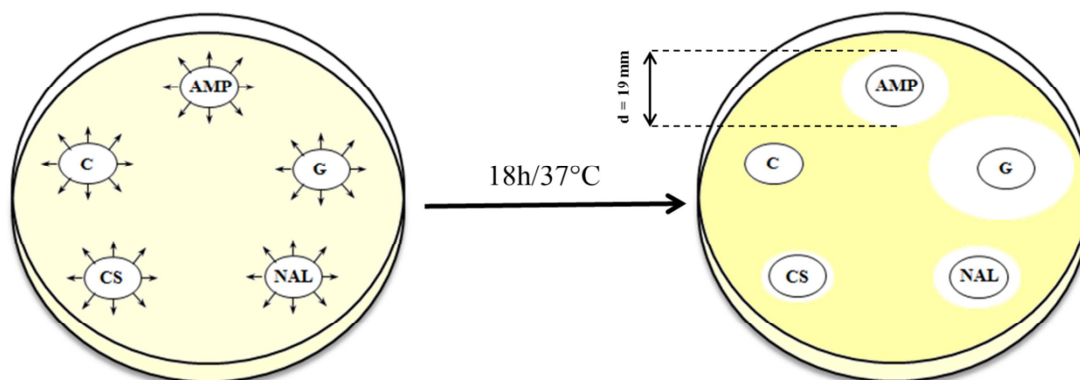


Figura 3. Representação do método de difusão em disco de antibióticos comerciais. Fonte: Taveira et al, 2008.

A presença de matéria particulada pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no agar. Entretanto, o pequeno volume de amostra necessário e a possibilidade de testar cinco a seis amostras por placa, frente a um único microrganismo, são as vantagens do teste de difusão em agar (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991).

Ao utilizar um microrganismo padrão apropriado para teste e uma amostra conhecida do antibiótico para comparação, esses métodos antimicrobianos podem ser empregados para estimar a eficiência do antimicrobiano na amostra ou a sensibilidade do microrganismo (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000). Os microrganismos diferem quanto ao grau de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos; além disso, a sensibilidade de um organismo em particular para um determinado agente pode alterar-se com o tempo da análise (PELCZAR Jr; CHAN; KTIEG, 1996).

II.4.2.2 Determinação da CMI

Em inúmeros trabalhos científicos, tanto a concentração mínima bactericida quanto a concentração mínima bacteriostática tem sido denominada como concentração mínima inibitória (CMI). Smith-Palmer et al. (1998) descreveram concentração bacteriostática como a menor concentração na qual a bactéria deixa de crescer, mas desenvolve quando o caldo é repicado para outro meio de cultura e concentração bactericida quando não se desenvolve.

A concentração mínima inibitória é determinada por métodos *in vitro* e usada como parâmetro para avaliar a atividade antimicrobiana por vários autores. A CMI é a menor

concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do microrganismo em tubos ou microplacas em um tempo específico (CLSI, 2009).

Os métodos de diluição são aqueles nos quais os extratos ou substâncias a serem testados são adicionados ao meio de cultura líquido (Figura 4a) ou sólido (Figura 4b), previamente inoculado com o microrganismo teste. Após a incubação, o crescimento microbiano é determinado pela comparação direta ou turbidimétrica da cultura teste com o controle negativo (meio de cultura inoculado sem a adição do agente antimicrobiano) ou pelo uso de espectrofotômetro em comprimento de onda apropriado (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991).

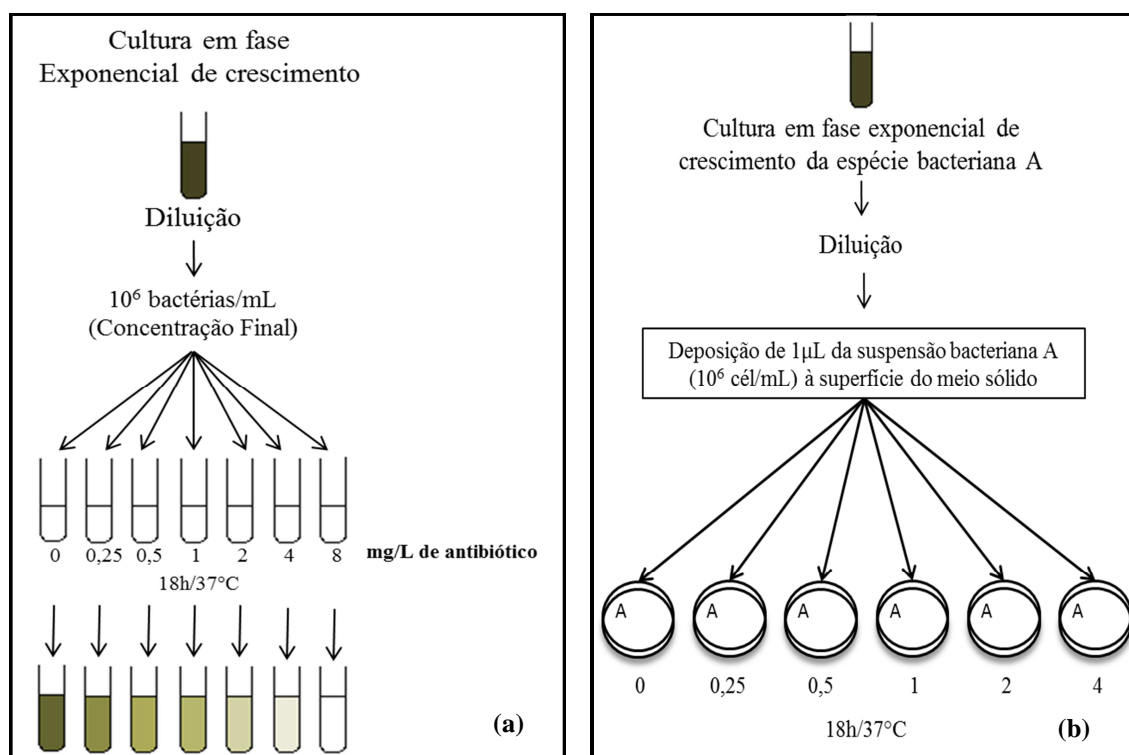


Figura 4. Representação esquemática da CMI de um agente antimicrobiano pelo método de diluição em meio líquido (a) e sólido (b) (Taveira et al, 2008).

O método de diluição em meio líquido pode ser feito em macro ou microdiluição em microplacas, porém o de microdiluição é o mais econômico por permitir avaliar simultaneamente diversas concentrações da substância antimicrobiana (ALVES et al., 2008; SOUZA et al., 2003).

II.4.3 Bactérias selecionadas para os testes antimicrobianos

II.4.3.1 Considerações gerais

As bactérias são seres procarióticos com organização relativamente simples, que se reproduzem por divisão assexuada. Esses microrganismos são formados por diversas estruturas, que diferem de uma espécie para outra (MURRAY et al., 2000).

As células bacterianas possuem a membrana citoplasmática e envolvendo-a tem uma rígida e espessa parede celular. Esta parede pode ter uma terceira camada denominada de cápsula. Na parte interna da célula, encontra-se o citoplasma, o nucleóide e diversas organelas. Frequentemente ocorrem prolongamentos filamentosos que partem da superfície bacteriana, os flagelos e as fímbrias (JAY, 2005).

A principal função da membrana é atuar como uma barreira seletiva para a entrada de substâncias na célula, sendo responsável assim pela absorção e transporte dos nutrientes. A parede celular consiste em uma estrutura rígida, que mantém a forma característica (esférica ou cocos, bastonetes ou bacilos e espiraladas ou hélices) de cada célula bacteriana. A função da parede celular é prevenir a expansão e eventualmente o rompimento da célula devido à entrada de água para o meio intracelular. Além disso, esta estrutura é essencial para o crescimento e divisão celular (MIMS et al., 1999).

De acordo com as características da parede celular, as bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas ou Gram-negativas. As diferenças entre esses grupos são baseadas principalmente nas suas propriedades de permeabilidade nos componentes de superfície (JAY, 2005).

O principal constituinte estrutural da parede celular é o peptideoglicano, um polímero misto de açúcares e aminoácidos. Nas bactérias Gram-positivas, o peptideoglicano forma uma camada espessa (20-80nm), externa a membrana celular e pode conter outras moléculas. Nas Gram-negativas a camada peptideoglicana é delgada (5-10nm) e superposta por uma membrana externa, ancorada a moléculas lipoproteicas no peptideoglicano. As principais camadas externas são lipossacarídeos e lipoproteínas (TRABULSI et al., 1999).

Os aminoácidos carregados e os polissacarídeos tornam a camada de peptideoglicano altamente polar, proporcionando a bactéria uma superfície hidrofílica. É esta propriedade que

permite que os organismos Gram-positivos impeçam a passagem de substâncias hidrofóbicas (TRABULSI et al., 1999).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas é hidrofílica, mas os componentes lipídicos das moléculas constituintes conferem propriedades hidrofóbicas. Devido à membrana externa apresentar características lipoprotéicas, as bactérias Gram-negativas precisam dispor de mecanismos que permitem a entrada de substâncias hidrofílicas; em virtude disso, sua membrana externa possui canais especiais denominado de porinas (TRABULSI et al., 1999).

As bactérias Gram-negativas são frequentemente resistentes a muitos agentes antimicrobianos, pois entre a membrana externa e plasmática há um compartimento chamado de periplasma. Essa estrutura contém uma camada de peptidoglicano e uma solução de componentes que facilitam a nutrição. Além disso, o periplasma contém proteínas transportadoras de solutos que participam do transporte de substâncias para o interior da célula e contêm enzimas que são capazes de inativar algumas drogas, tornando a célula resistente (SCHAECHTER et al., 2002; TRABULSI et al., 1999).

Nos alimentos, as bactérias podem desempenhar importantes funções e são classificadas em três grupos distintos: causadoras de alterações químicas prejudiciais, proporcionando “deterioração microbiana”; as que representam risco à saúde do consumidor, denominado de patogênicas e as que modificam as características originais do alimento de forma a transformá-lo em um novo produto (FRANCO; LANDGRAF, 2008; FORSYTHE, 2002).

Bactérias deterioradoras são grupos ou espécies que indicam a ocorrência de alguns contaminantes fecais, provável presença de patógenos, deterioração potencial do alimento ou indicam condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. Porém, as bactérias patogênicas e as toxinas produzidas por algumas cepas bacterianas são foco dos agentes de saúde pública, pois além de comprometer a segurança dos alimentos, eles promovem as enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005).

Assim, serão foco deste estudo as bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e as Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*) descritas a seguir.

II.4.3.2 Bactérias Gram-positivas

O gênero *Bacillus* inclui espécies patogênicas (*B. cereus*), deterioradoras de alimentos (*B. subtilis*) e espécies empregadas na elaboração de produtos alimentícios (FORYSTHE, 2002). A maioria das espécies são microrganismos saprófitas que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação. Pode desenvolver-se em alimentos e produzir enterotoxina ou toxina emética, causando intoxicação alimentar. Algumas vezes, estas bactérias produzem patologias nos seres humanos imunocomprometidos (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Assim como o *Bacillus*, *Listeria monocytogenes* encontra-se amplamente difundida em vegetais, solo e água, sendo também encontrada em silagens, esgotos, resíduos de abatedouros, em leite de vacas saudáveis ou com mastite, e em fezes humanas e de animais. A resistência do patógeno à diversidade do meio, aliada à capacidade de colonizar, multiplicar e sobreviver em equipamentos de plantas de processamento faz com que essa bactéria desperte a atenção das indústrias de alimentos (FORSYTHE, 2002).

A presença de *Enterococcus faecalis* em números elevados indica práticas sanitárias inadequadas ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação microbiana. Entretanto, nos alimentos fermentados por outras bactérias do gênero *Enterococcus*, o número elevado desses microrganismos não tem o mesmo significado (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Staphylococcus aureus está amplamente distribuído na natureza e encontrado principalmente na região da pele, nasofaringe e fossas nasais. É o agente mais comum de intoxicação alimentar, provocada pela ingestão de enterotoxinas previamente formadas no alimento contaminado. Esta bactéria tem despertado a atenção das indústrias alimentícias pela resistência a altas temperaturas, a desinfetantes e a soluções anti-sépticas, além de apresentar elevada capacidade em desenvolver resistência a diversos antibióticos ativos contra bactérias Gram-positivas (TRABULSI et al., 1999; FORSYTHE, 2002).

II.4.3.3 Bactérias Gram-negativas

Escherichia coli é a espécie bacteriana mais comumente isolada nos laboratórios clínicos e já foi associada a doenças infecciosas envolvendo todos os tecidos e sistemas orgânicos humanos. Esta bactéria pertence ao grupo dos coliformes fecais e indica a contaminação de alimentos durante ou no pós-processamento. Pode causar reações indesejáveis nos produtos alimentícios e possui várias linhagens que são patogênicas para o homem e para os animais (JAY, 2005; FORSYTHE, 2002).

O gênero *Salmonella* possui uma ampla variedade de espécies, compreendendo mais de 2300 variedades sorológicas. A patogenicidade deste gênero varia de acordo com o tipo sorológico da bactéria, idade e estado imunológico do hospedeiro. Existem algumas síndromes clínicas associadas a este gênero: gastroenterite, infecção fecal do endotélio vascular e febre tifóide (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SCHAECHTER et al.; 2002).

II.5 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE MATRIZES VEGETAIS

A extração de compostos bioativos em matrizes vegetais constitui uma importante etapa para o estudo e para fabricação de produtos ricos nesses compostos. A aplicação de uma tecnologia extrativa de baixo custo para obter moléculas a serem utilizadas como aditivos alimentares ou produtos nutracêuticos pode ser uma estratégia racional para obtenção dos compostos bioativos (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

A extração consiste em uma operação de separação de um ou mais constituintes de uma mistura através do contato com uma fase líquida ou gasosa. A extração aplicada para retirar os compostos bioativos de suas matrizes vegetais consiste normalmente em um processo sólido-líquido, o qual se baseia na transferência de massa dos solutos da matriz sólida para o solvente, processo este que pode ser denominado de lixiviação. A eficácia do processo é diretamente relacionada às características químicas das moléculas, aos procedimentos de extração e ao tipo de solvente utilizado (GEANKOPOLIS, 1983; BIMBENET; DUQUENOY; TRYSTAM, 2002; WATERMAN; MOLE, 1994).

Antes da extração, o material vegetal é normalmente desidratado e triturado, e durante o processo alguns cuidados devem ser tomados para favorecer a extração e conservar os compostos que normalmente são sensíveis à ação da luz, do oxigênio e do calor (AZIZAH; RUSLAWATTI; TEE, 1999; JUNTACHOTE; BERGHOFER, 2005).

O conhecimento do comportamento dos fatores que influenciam as condições do processo é necessário para melhorar a eficiência da extração de qualquer composto bioativo. Fatores, tais como solvente, tempo de extração, temperatura, pH, razão sólido-líquido e tamanho da partícula podem influenciar significativamente o processo extrativo (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1997).

O tempo de extração pode variar de 1 minuto a 24 horas. No entanto, longos períodos aumentam a possibilidade de oxidação dos compostos, necessitando a adição de agentes redutores. A temperatura apesar de influenciar significativamente na extração, pode também afetar a estabilidade do composto e a volatilização do solvente (SHAIDI; NACZK, 1995; CONDE et al., 1998).

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; TSUDA et al., 1994; MAU et al., 2005; PELLEGRINI et al., 2007; PESSINI et al., 2003).

Nessa et al. (2004) determinaram a atividade antioxidante de extrato de folhas de *Blumea balsamifera*, mediante extração sequencial com éter, clorofórmio e metanol. Os autores verificaram que o extrato de metanol foi o que apresentou maior atividade antioxidante, seguido pelo extrato de clorofórmio.

Pessini et al. (2003) avaliando a atividade antibacteriana das frações hexânicas e clorofórmicas das folhas de *Piper regnelli*, demonstraram boa atividade contra bactérias Gram-positivas e baixa atividades contra bactérias Gram-negativas. Enquanto que as frações

de acetona, metanol (MeOH), MeOH:água e clorofórmio:acetato de etila, não apresentaram nenhuma atividade tanto para as Gram-positivas quanto para as Gram-negativas.

II.6 APLICAÇÕES DOS EXTRATOS VEGETAIS RICOS EM COMPOSTOS BIOATIVOS NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA

Os consumidores vêm exigindo cada vez mais produtos alimentícios minimamente processados, com maior qualidade, conveniência, maior vida útil e isento de conservantes sintéticos (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

A utilização de agentes químicos sintéticos na conservação de alimentos não é compatível com a idéia de produtos “frescos” ou naturais e podem ter efeitos indesejáveis a saúde humana (RODGERS, 2001; BRUL; COOTE, 1999). Uma solução para esta problemática seria a utilização de agentes antimicrobianos naturais (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

As tecnologias estudadas nos últimos anos para a inativação de microrganismos incluem os processos não térmicos, como uso de alta pressão hidrostática, pulsos eletromagnéticos, sistemas de embalagens ativas ou com atmosfera modificada, compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Compostos antimicrobianos naturais como ácidos orgânicos, bacteriocinas e extratos de plantas têm sido testados em virtude do seu potencial controle na contaminação microbiana de produtos alimentícios (PRANOTO; RAKSHIT; SALOKHE, 2005). A Tabela 3 apresenta alguns exemplos de agentes antimicrobianos naturais.

Tabela 3. Agentes antimicrobianos naturais.

Tipo	Agentes antimicrobianos
Animal	Leite: lactoperoxidase, lactoferrina, lactoglobulinas. Ovo: lisozima, ovotransferrina, ovoglobulina, avidina
Planta	Saponinas, compostos fenólicos, tiosulfinafos, glucosinolatos
Microrganismos	Bactérias lácticas: bacteriocinas
Ácidos	Lático, sórbico, acético e cítrico

Fonte: Gould, 1996.

Para aplicação dos agentes antimicrobianos naturais como conservantes dois aspectos devem ser considerados: as mudanças nas características sensoriais do produto e as interações entre os compostos antimicrobianos e os demais ingredientes e nutrientes, pois essas interações podem afetar o potencial antimicrobiano resultando em efeitos moderados ou até insignificantes na conservação dos alimentos (DEVLIEGHERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

Considerando a quantidade de superfícies de contato que podem ser contaminadas durante o processamento dos alimentos, torna-se claro que o uso de desinfetantes constitui uma das principais etapas de assepsia efetiva na indústria alimentícia. A limpeza e desinfecção das superfícies de contato fixas e partes expostas do equipamento reduz, significativamente, a contaminação cruzada. Para tanto, o produto químico escolhido deve realizar, efetivamente, as funções de descontaminação e desinfecção (BRASIL, 1994).

Para a desinfecção de superfícies, vários agentes desinfetantes podem ser utilizados. A etapa inicial para desinfecção é determinar o mecanismo de ação sobre os microrganismos, toxicidade para o manipulador e ação deletéria para o equipamento a ser desinfetado (SILVA; JORGE, 2002).

Os agentes químicos desinfetantes comumente utilizados são os álcoois, compostos clorados, glutaraldeído, formaldeído, peróxido de hidrogênio, ácido peracético, compostos fenólicos e quartenários de amônia. Sendo o álcool e o hipoclorito de sódio mais recomendados para superfícies (SILVA; JORGE, 2002).

Neste contexto, extratos vegetais ricos em compostos bioativos que apresentam amplo espectro de ação antimicrobiana podem também ser aplicados como agentes desinfetantes de superfícies em diversos setores industriais.

REFERENCIAS

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.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L. A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. 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, p. 1224-1229, 2008.

ALMAJANO, M.P.; CARBÓ, R.; JIMÉNEZ, A.L.; GORDON, M. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, p. 55-63, 2008.

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J. Review of antimicrobial food packaging. **Food Chemistry**, v. 3, p. 113-126, 2002.

AZIZAH, A.H.; RUSLAWATTI, N.M.; TEE, T.S. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chemistry**, v. 64, p. 199-202, 1999.

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.

BEART, J.E.; LILLEY T.H.; HALSAM E. Plant polyphenols-secondary metabolism and chemical defense: some observations. **Phytochemistry**, v. 24, p.33-38, 1985.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evolution protocols: Food quality or health effects. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 561-571, 2004.

BIMBENET, J.J; DUQUENOY, A; TRYSTAM, G. **Génie des procédés alimentaires: des bases aux applications**, v. 58, p. 554, Paris, 2002.

BOTTERWECK, A.A.M., VERHAGEN, H., GOLDBOHM, R.A., KLEINJANS, J., BRANDT, P.A.V. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 38, p. 599-605 2000.

BRASIL. Ministério da saúde. **Processamento de artigos e superfícies em estabelecimentos**. Brasília, 1994.

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.

BROOKS, G.R.; BUTEL, J.S.; MORSE, A.S. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **Internationa Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

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

CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CULTER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical and Biological Medicine**, v. 73, p. 303-311, 1993.

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.

CHEYNIER, V. Polyphenols in food are more complex than often thought. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p.223-229, 2005.

CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. M07-A8, v. 29, 8th ed, 2009.

CONDE, E.; CADAHIA, E.; GARCIA-VALLEJO, M.C.; SIMÓN, B.E. Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different spanish provenances. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3166-3171, 1998.

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

DAHANUKAR, S.A., KULKARNI, R.A., REGE, N.N. Pharmacology of medicinal plants and natural products. **Indian Journal Pharmacology**, v. 32, p. 81–118, 2000.

DECKER, E.A. Antioxidant Mechanisms. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3^a Ed. Boca Raton, FL – USA: CRC Press. p. 475-492, 2008.

DEL RIO, D.; COSTA, L.G.; LEAN, M.E.J ; CROZIER, A. Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**,v. 20, p.1-6, 2010.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273-285, 2004.

DIOP, M. **Evaluation du pouvoir antimicrobien de végétaux typiquement amazoniens**. Mémoire de fin d'étuds, UCL, Louvain-la-Neuve, 2003.

DUARTE, M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, v. 7, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais livres DPPH•. **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446,452, 2006.

ESPÍN, J.C.; GARCÍA-CONESA, M.T.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, p. 648-656, 2000.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FONSECA, A.L. **Antibióticos na Clínica Diária**. 6 ed. Rio de Janeiro: EPUB, 1999.

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

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FOTI, M.C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with DPPH radical in alcoholic solutions. **Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 2309-2314, 2004.

GEANKOPLIS, C.J. **Transport process and unit operations**. 2nd ed. Boston: Allyn and Bacon, 1993.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOULD, G.W. Methods for preservation and extension of shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 51-64, 1996.

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.

HERRMANN, A.P.; WILLEMS, M.; JANKE, H.D. Degradation of natural polyphenols by methanogenic consortia enriched from digested municipal sludge. **Water Research**, v. 35, p. 2575-2582, 2001.

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

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.F.; JUDITH, A.; PRIOR, R.L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4437-4444, 2002.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidant properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, v. 92, p. 193-202, 2005.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., M.W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LEE, E.W.; CHEN, J.; HUDA, M.N.; KURODA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Functional cloning and expression of *emeA*, and characterization of *emeA*, a multidrug efflux pump from *Enterococcus faecalis*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 266-270, 2003.

LOUIS, S. **Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de Légumineuses**. Tese (Instituto nacional de ciências aplicadas). 2005.

MacDONALD-WICKS, L.K.; WOOD, L.G.; GARG, M.L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, p. 2046-2056, 2006.

MAQSOOD, S.; BENJAKUL, S. Comparative studies of four different phenolic compounds on *in vitro* antioxidative activity and the preventive effect on lipid oxidation of fish oil emulsion and fish mince. **Food Chemistry**, v. 119, p. 123-132, 2010.

MARINOVA, E.M.; YANISHLIEVA, N.V.I. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 58, p. 245-248, 1997.

MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; COLACEVICH, A.; FOCARDI, S.; BORGHINI, F.; SANTUCCI, A.; FIGURA, N.; ROSSI C. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p.50-59, 2009.

MATKOWSKI, A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 548-560, 2008

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.

MENDOZA, L.M.; WILKENS, A.; URZUA, E. Antimicrobial study of terpenoid exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal Ethnopharmacology**, v. 58, p. 85-88, 1997

MIMS, C.; PLAYFAIR, J.; ROITT, I.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia médica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999.

MOREL, A.F.; MALDANER, G.; ILHA, V.; MISSAU, F.; SILVA, U.F.; DALCOL, I.I. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 66, p.2571-2576, 2005.

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.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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.

NESSA, F.; ISMAIL, Z.; MOHAMED, N.; HARIS, M.R.H.M. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. **Food Chemistry**, v. 88, p. 243-252, 2004.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-77, 2007.

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. In: BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí, 2003.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. eds SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. p. 11-24. 2. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

OTHMAN, M.; SAN LOH, H.; WIART, C.; KHOO, T.J.; LIM, K.H.; TING, K.N. Optimal methods for evaluating antimicrobial activities from plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v.84, p. 161-166, 2011.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using Fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4916-4926, 2001.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S.; Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. **Food Chemistry**, v. 105, p. 204-214, 2007.

PARCKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação da atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 102-107, 2007.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E.C.S. **Microbiology: Concepts and Applications**. New York: McGraw-Hill, 1993.

PELCZAR Jr, M. J.; CHAN, E. C. S., KTIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. Ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996.

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.

PENNY, M.K.; HECKER, M.S.; BANANOME, M.D.; STACIE, M.M.; COVAL, M.S. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, 2002.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G.; Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 1115-1120, 2003.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PRAKASH, A. Antioxidant activity. **Medallion Laboratories-Analytica Progress Press**, v. 16, p. 1-6, 2001.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S.K.; SALOKHE, V.M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 38, p. 859-865, 2005.

PRIOR, R.L.; HUANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Science and Food Agricultural**, v. 53, p. 4290-4302, 2005.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 26, p.755-760, 2006.

RAUHA, J.P. Antimicrobial effects of finish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, n.1, p.3-12, 2000.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 3^a Ed. Boca Raton, FL – USA: CRC Press. p. 409-430, 2008.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

RIOS, M.; MARTINS-DAS-SILVA, R.C.V.; SABOGAL, C.; MARTINS, J.; SILVA, R.N.; BRITO, R.R.; BRITO, I.M.; SILVA, J.R.; RIBEIRO, R.T. B. **Benefícios das plantas da**

capoeira para a comunidade Benjamim Constant, Pará, Amazônia brasileira. Belém: CIFOR, 2001.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TICKET, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruit. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

RODGERS, S. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 276-284, 2001.

RON, B.H.; WILLS, K.B.; MORGAN, M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. **Nutrition Research Reviews**, v. 36, p. 65-71, 2000.

SCAZZOCCHIO, F.; COMETA, M. F.; TOMASSINI, L.; PALMERY, M. Antibacterial activity of *Hydrastis canadensis* extract and its major isolated alkaloids. **Planta medica**, v. 67, p.561-564, 2001.

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

SELMA, M.V.; ESPIN, J.C.; TOMAS-BARBERA, N.F.A. Interaction between Phenolics and Gut microbiota: Role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p.6485-6501, 2009.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic. 331 p. New York, 1995.

SILVA, C.R.G.; JORGE, A.O.C. Avaliação de desinfetantes de superfície utilizados em odontologia. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, 2002

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.

SILVA, E.M. **Polyphenols from the Amazonian plant *Inga edulis*: Process optimization for the production of purified extracts with high antioxidant capacity**. Tese (Doutorado em Ciências Agrônomicas e Engenharia Biológica) – Faculte d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale, Université catholique de Louvain – Bélgica, 2006.

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

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

SINGH, B.; SAHU, P.M.; SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Fitoterapia**, v. 73, p.153-155, 2002.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett Food Microbiology**, v. 26, p.118-122, 1998.

SOOBRAATEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutations Reseach**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUZA, J.N.S. **Etude des propriétés antioxydantes *in vitro* d'extraits de feuilles de *Byrsonima crassifolia* et *Inga edulis* et caractérisation partille dès composés phénoliques**. Tese (Doutorado em Ciências Agrônômicas e Engenharia Biológica) – Faculte d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale, Université catholique de Louvain – Bélgica, 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.

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27 12, p. 1965-1969, 2004.

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

TAVEIRA, N.; OLIVEIRA, A.; GOMES, O.; NASCIMENTO, T. **Manual Prático de Microbiologia**. Instituto Superior de Ciências da Saúde. 2008.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

TSUDA, T.; WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; NORINOBU, S.; CHOL, S.W.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyaniding 3-O-b-D-glucoside and cyaniding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2509-2511, 1989.

VANDEN BERGHE, D.A.; VIENTINK, A.J. Screening methods of antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. **Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity**. London: Academic Press, 1991.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, p. 326-337, 2006.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites.**: Blackwell Scientific Publications; 238p. Oxford 1994.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147-152, 2001.

ZACCHINO, S.A.; YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V.; ENRIZ, R.D.; KOUZNETSOV, V.; RIBAS, J.C. The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall. In: RAI, M.; MARES, D. **Plant-derived antimycotics**: current trends and future prospects. The Haworth Press, p. 1-41, 2003.

CAPÍTULO III
METODOLOGIAS

III.1 SELEÇÃO, COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS MATERIAIS VEGETAIS

Foram coletadas amostras das 17 espécies vegetais (Tabela 1) nas cidades de Ananindeua, Belém e Igarapé Açu (Estado do Pará – Brasil). A identificação taxonômica de cada espécie foi realizada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal do Pará (Belém), onde foram submetidas às etapas de seleção manual, lavagem com água corrente, secagem em estufa com circulação forçada de ar (60°C/3h) e moídas (5 mm de granulometria) (Figura 1). Em seguida, as amostras foram armazenadas em potes plásticos sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até o procedimento de extração dos compostos bioativos.

A seleção das partes de cada espécie vegetal utilizada neste estudo foi baseada nas informações obtidas no banco de dados com 300 espécies nativas da Região Amazonica; nos dados científicos a respeito da capacidade antioxidante e atividade antibacteriana de extratos vegetais pertencentes ao mesmo gênero, baseando-se no fato que plantas de mesmo gênero costumam ter propriedades comuns e nos dados quanto ao conteúdo fenólico de espécies vegetais amazônicas obtidos por Silva et al (2007) e Souza et al. (2008).



Figura 1. Folhas moídas de *Inga edulis*.

Tabela 1. Espécie, família, nome vulgar, partes analisadas e código da excilcata do herbário dos vegetais amazônicos estudados.

Nome científico [#]	Família	Nome vulgar	Parte da planta	Código da excilcata
<i>Acmella oleracea</i> **	Asteraceae	Jambu	Folha	-
<i>Annona Montana</i>	Annonaceae	Guanabana	Folha	188556
<i>Arrabidaea chica</i>	Bignoniaceae	Pariri	Folha	0150701
<i>Bixa orellana</i>	Bixaceae	Urucum	Folha	160166
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Malpighiaceae	Muruci	Folha	144054
<i>Cedrela odorata</i>	Meliaceae	Embaúba	Casca, folha	172548
<i>Connarus perrotetti</i> *	Connaraceae	-	Folha	56489
<i>Croton cajucara</i>	Euphorbiaceae	Sacaca	Caule, folha	58703
<i>Dalbergia monetaria</i>	Fabaceae	Verônica	Folha	197718
<i>Davilla kunthii</i>	Dilleniaceae	Cipó-de-fogo	Folha	196781
<i>Davilla rugosa</i>	Dilleniaceae	Cipó cabloco	Folha	197797
<i>Inga edulis</i>	Fabaceae	Ingá cipó	Folha	125696
<i>Phyllanthus niruri</i>	Phyllanthaceae	Quebra-pedra	Planta ^{##}	191623
<i>Scoparia dulcis</i>	Plantagineaceae	Vassourinha	Planta ^{##}	197912
<i>Solanum juripeba</i>	Solanaceae	Jurubebinha	Folha	0150798
<i>Stryphnodendron barbatiman</i> **	Fabaceae	Barbatimão	Folha, ramo, casca	163804
<i>Tabernaemontana angulata</i> *	Apocynaceae	Grão de cachorro	Folha	-

[#]As amostras vegetais foram coletadas em triplicatas, porém determinadas espécies foram coletadas em uma (*) ou duas (**) replicatas; ^{##} A amostra consistiu em todas as partes aéreas da planta.

III.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Foi realizado um processo de extração sólido-líquido utilizando três sistemas sequenciais de solventes, seguindo procedimento proposto por Pozo-Insfran et al (2004), Pellegrini et al. (2007) e Pompeu et al. (2009). Para a seqüência de extração foi primeiramente utilizado acetato de etila P.A (Synth, São Paulo, Brail), seguido por metanol P.A (Synth, São Paulo, Brail) e por último uma mistura de metanol e água (1:1 v:v), todos acidificados com 0,1 % HCl P.A (Synth, São Paulo, Brail). As extrações foram realizadas a temperatura ambiente, durante 1 h e na proporção de 1:6 (massa : volume) de planta seca e solvente, sendo extraídas duas vezes cada sistema de solvente. O uso de solventes com diferentes polaridades permitiu extrair três frações de compostos com polaridades diferentes (NACZK; SHAHID, 2004) que foram concentradas em rota vapor, saturadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à -18°C em frascos de vidro âmbar até análises. A Figura 2 mostra o fluxograma do processo de extração aplicado neste trabalho. Para obtenção do extrato bruto foi misturada a metade de

cada fração obtida individualmente, sendo em seguida concentrado em rotavapor à vácuo(40°C), liofilizado durante 48h e armazenado sob refrigeração (-18°C) até o momento dos testes antioxidantes e antimicrobianos.

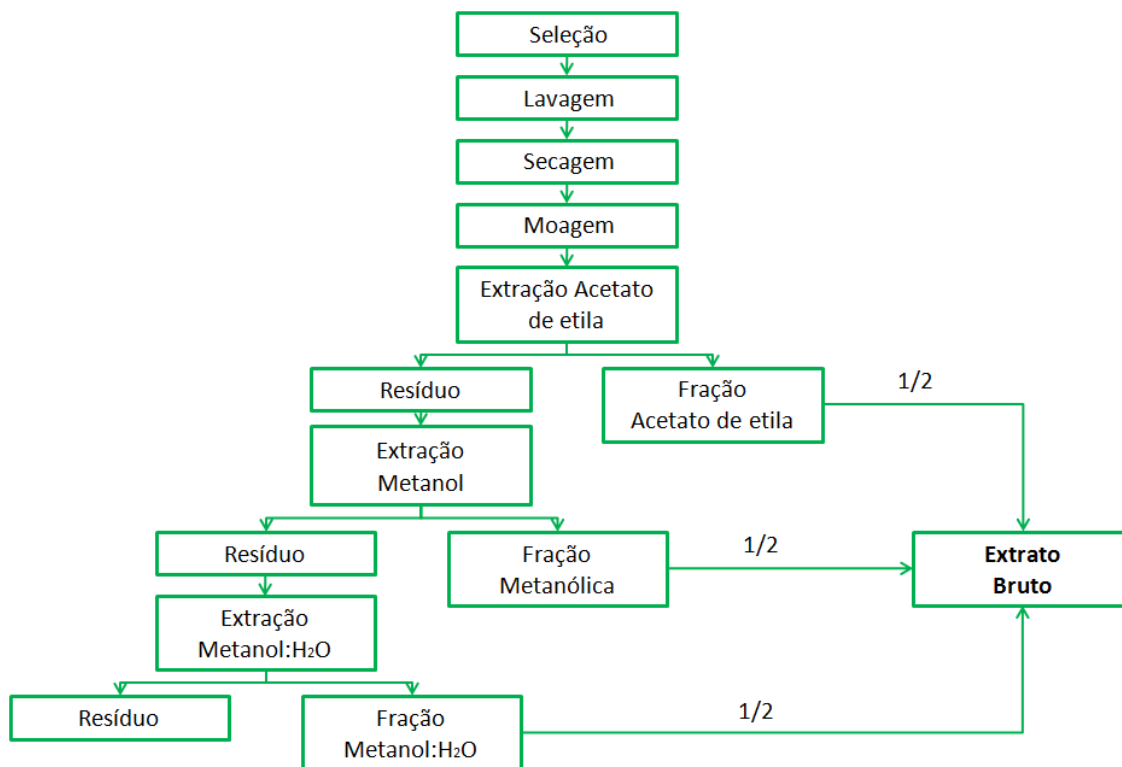


Figura 2. Fluxograma do processo de extração.

III.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO EM COMPOSTOS FENÓLICOS

III.3.1 Polifenóis totais

A dosagem do conteúdo em compostos fenólicos totais foi feita pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ORTHOFER e LAMUELA-RAVENTOS, 1999) adaptado por Silva (2006), o qual se baseia na reatividade comum dos compostos fenólicos quando colocados em contato com os ácidos fosfomolibdico fosfotúngstico durante 30 min. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes catequina (ECat) por grama extrato seco (ES) e em miligramas de ECat por grama de matéria-prima seca (MPS).

III.3.2 Flavonóis totais

A concentração em flavonóis totais (FOT) foi determinada através da reação destes compostos com cloreto de alumínio, conforme metodologia descrita por Quettier-Deleu et al. (2000). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes rutina (ERut) por grama de ES.

III.3.3 Proantocianidinas totais

A concentração em proantocianidinas totais (PROT) foi determinada pelo método butanol-HCl conforme proposto por Julkunen-Tiitto (1985). Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes cianidina (ECia) por grama ES.

III.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

III.4.1 Método ORAC

A dosagem da capacidade antioxidante dos extratos pelo método do ORAC foi desenvolvida como proposto por PRIOR et al (2003). Este método se baseia na reatividade do substrato oxidável, fluoresceína, com radicais peroxil produzidos pela decomposição térmica do AAPH (2,2'-azinobis (-amidinopropano) dihidrocloro) em fase aquosa. A diminuição induzida na fluorescência do substrato pela decomposição da fluoresceína é medida na presença e na ausência do antioxidante no decorrer do tempo (PRIOR et al., 2003).

O experimento foi conduzido a 37 °C em pH 7,4. Os resultados foram calculados usando as diferenças das áreas sob as curvas de decaimento da fluorescência entre o branco e a amostra e foram expressas como micromoles de equivalentes Trolox (ET) por grama de ES.

III.4.2 Método DPPH

A capacidade antioxidante pelo método DPPH foi determinada conforme proposto por Brand-Williams et al. (1995). Os resultados foram expressos em micromoles de ET por grama de ES.

III.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

III.5.1 Cepas de microrganismos utilizados

Os microrganismos utilizados foram *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Estas cepas foram adquiridas da empresa Interlab – Distribuidora de Produtos Científicos Ltda, São Paulo/SP, Brasil e padronizadas e distribuídas pelo American Type Cell Collectin (ATCC, Manassas/VA/USA).

Salmonella Typhi IAL 1251 foi gentilmente cedida pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, São Paulo/SP/Brasil) que padroniza e distribui esse microrganismo.

III.5.2 Ativação e manutenção das cepas

Os microrganismos foram ativados de acordo com as recomendações do fabricante contidas no rótulo do produto. Para isolar as colônias foram utilizados meios de cultura seletivos para cada cepa (Figura 3) e incubados a temperatura e tempo adequado para o crescimento de cada microrganismo.

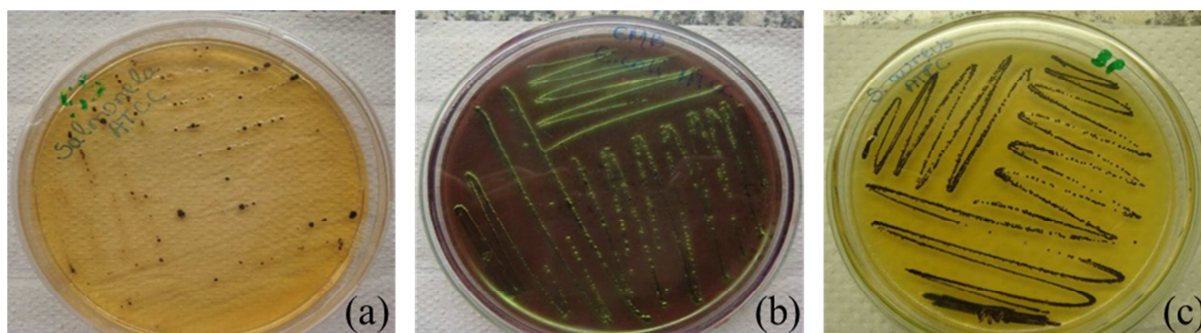


Figura 3. Cepas de *S. typhi* (a), *E. coli* (b), e *S. aureus* (c) isoladas em meio seletivo.

Em seguida foram mantidas em Agar triptona de soja (TSA) e conservadas sob refrigeração (4 °C), sendo repicados em intervalos de 15 a 30 dias para manter as colônias viáveis.

III.5.3 Preparo do inóculo contendo os microrganismos

As cepas bacterianas foram transferidas para tubos contendo 3 mL BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. Após cultivo recente o inóculo foi ajustado com solução salina (0,9 %) comparando a turbidez da suspensão com a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) (NCCLS, 2006).

Para os testes de difusão em disco 50 µL deste cultivo foi diluído em 4,95 mL de meio de cultura Muller-Hinton obtendo uma concentração de 10^6 UFC/mL e despejados nas placas de petri contendo agar.

III.5.4 Preparo dos extratos para os ensaios antimicrobianos *in vitro*

Os extratos foram diluídos em água até obtenção de uma concentração de 50 mM de equivalentes Catequina, de acordo com os resultados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu. A esta concentração o conteúdo de ácido clorídrico é elevado, e devido a sensibilidade dos microrganismos ao pH e acidez das soluções foi necessário uma etapa de neutralização dos extratos.

Como o HCl é um ácido forte o hidróxido de sódio, uma base forte, foi escolhido como agente neutralizador. Após a neutralização, o pH de cada solução estava entre 6,5 - 7.5.

III.5.5 Método de difusão em disco

O potencial antimicrobiano dos extratos brutos foi avaliado através do método de difusão em disco, de acordo com o descrito pela CLSI (2006) com modificações. Discos estéreis de papel filtro Whatman nº 42, com 6 mm de diâmetro, foram impregnados com 10 µL da solução das amostras, após absorção os discos foram levemente pressionados contra a superfície do meio de cultivo para garantir total contato com os microrganismos e foram distribuídos igualmente em placas de petri. O material foi deixado à temperatura ambiente durante aproximadamente uma hora para difusão dos extratos. Após esse período, as placas foram invertidas e incubadas a 35 °C durante 24 h. Os experimentos foram feitos em triplicata. A Figura 4 demonstra as etapas de manipulação realizadas durante os testes de difusão em disco.

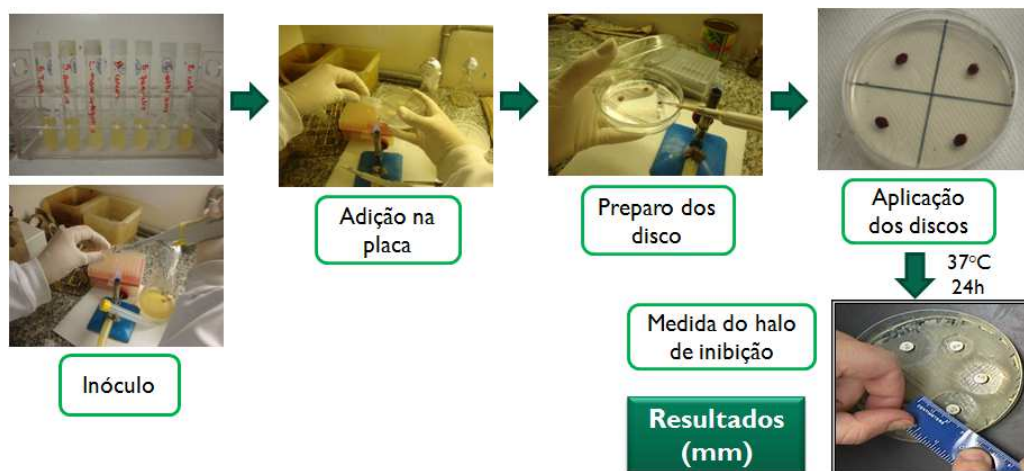


Figura 4. Fotografias do preparo dos discos e placas para o método de difusão.

Foram utilizados como controle positivo discos padronizados contendo o antibiótico e como controle negativo água ultrapura que solubilizou os extratos e a solução de hidróxido de sódio.

III.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO

III.6.1 Preparo dos extratos

A CMI foi determinada para os EB que apresentaram atividade antibacteriana no teste de difusão em disco, os mesmos foram diluídos a concentração de 2 mg.mL^{-1} em solução DMSO:H₂O 2:8 (v:v), enquanto que os extratos EAE e EM foram solubilizados em DMSO:H₂O 4:6 (v:v) a 2 e $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente, e o extrato EHM foi preparado em DMSO:H₂O 1:9 (v:v) a 2 mg.mL^{-1} .

III.6.2 Metodologia de microdiluição

A concentração mínima inibitória dos extratos foi determinada usando o método de microdiluição em microplacas estéreis de 96 poços como proposto pela CLSI (2009) com modificações. As microplacas foram preparadas da seguinte forma (Figura 5): no poço A1 foi adicionado 200 μL de caldo Mueller-Hinton (MHC) (controle de esterilidade), no A2

colocou-se 170 μL de MHC e 30 μL de inóculo (controle do crescimento), o A3 foi preenchido com 170 μL de MHC e 30 μL de amostra (branco para análise espectrofotométrica e controle de esterilidade da amostra), no A4 foi completado conforme o A3 e adicionou-se 30 μL de inóculo. Os demais poços foram preenchidos conforme o A3 e A4, com concentrações crescentes das amostras, na faixa de 0,05 a 1,00 mg.mL^{-1} para os extratos brutos, de 0,02 a 0,5 mg.mL^{-1} para os EAE e EHM e de 0,05 a 0,250 mg.mL^{-1} para o EM).

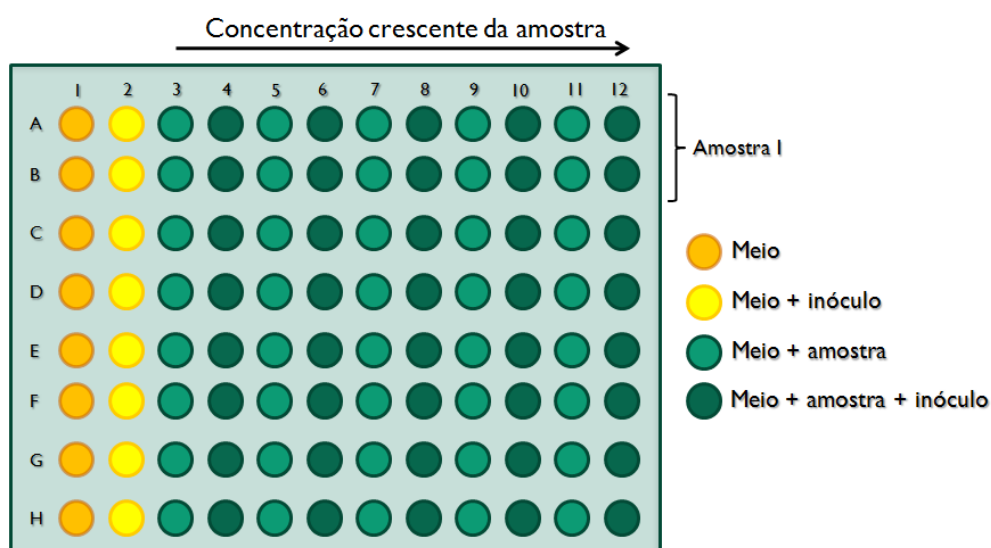


Figura 5. Preparo da microplaca para determinação da concentração mínima inibitória.

Amoxicilina (1 mg.mL^{-1}) e as soluções DMSO:H₂O utilizadas na solubilização das amostras foram analisadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Foi feito também o controle de esterilidade da solução salina utilizada no preparo do inóculo.

Após preparadas adequadamente, as microplacas foram seladas e incubadas a 37°C por 24 h. A CMI foi determinada por espectrofotometria a 600 nm após inibição nm e os resultados foram expressos em μg de ES. mL^{-1} de solução.

Após análise espectrofotométrica foi realizado o teste colorimétrico (Figura 6) utilizando a resazurina na concentração de ($0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$). Esta substância é um indicador de óxido-redução, utilizada para identificar a mudança de pH no meio pelo crescimento microbiano (MONTEJANO et al, 2005).

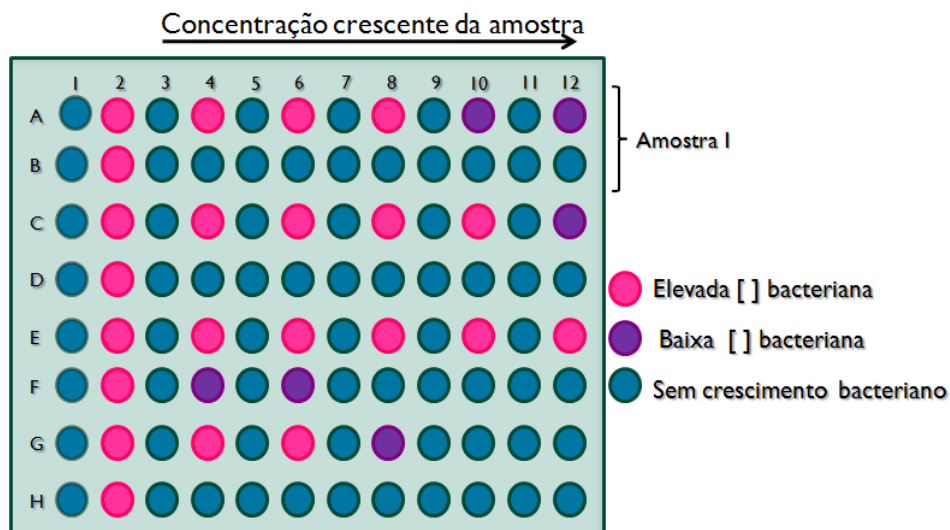


Figura 6. Preparo da microplaca para determinação da concentração mínima inibitória pelo método colorimétrico.

III.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os coeficientes de correlação foram determinados no Microsoft Office Excell 2007. Os resultados obtidos experimentalmente foram analisados usando ANOVA (análise de variância) e o teste de comparações múltiplas (Tukey-Kramer), utilizando o STATISTIC 7.0 (StartSoft, Tulsa, OK) sob Windows Vista Home Basic. Variáveis que apresentaram $p > 0,05$ foram consideradas estatisticamente insignificantes.

REFERENCIAS

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.

CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**, 19 ed, 26(1), USA, 2006.

CLINICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. M07-A8, v. 29, 8th ed, 2009.

JULKUNEN-TIITTO, R. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 33, 213, 1985.

NACZK, M.; SHAHID, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**. v. 1054, p. 95-111, 2004.

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

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.

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.

POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C.H.; TALCOTT, S.T. Phytochemical composition and pigment stability of açai. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1539-1545, 2004.

PRIOR, R.L.; HUANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, pp 3273-3279, 2003.

QUETTIER-DELEU, C.; GRESSIER, B.; VASSEUR, J.; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; CAZIN, M.; CAZIN, J.C.; BAILLEUL, F.; TROTIN, F. **Journal Ethnopharmacology**, 72, 2000.

SILVA E. M. **Polyphenols from the Amazonia plant *Inga edulis*: process optimization for the production of purified extracts with high antioxidant capacity**. Louvain, 2006. Tese (Doutorado em Ciências Agrônômicas e Engenharia Biológica) – Faculte d'ingénierie

biologique, agronomique et environnementale, Université catholique de Louvain – Belgique, 2006.

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

SINGLETON, V.L; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin- Ciocalteau Reagent. **Methods in Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

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**, v. 106, p. 331-339, 2008.

CAPÍTULO IV

**SCREENING DE ESPÉCIES VEGETAIS
AMAZÔNICAS SOBRE O POTENCIAL
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANO**

SCREENING DE ESPÉCIES VEGETAIS AMAZÔNICAS SOBRE O POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE

CAVALCANTE, M. A⁽¹⁾; SOUZA, J. N. S⁽¹⁾; FRANCO, B. D. G. M⁽²⁾; ROGEZ, H⁽¹⁾.

(1) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Av. Perimetral, s/n, 66095-780 Belém - PA, Brasil.

(2) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 58005508-900 São Paulo – SP, Brasil.

IV.1 INTRODUÇÃO

A busca por substâncias naturais que exerçam atividade biológica constitui uma estratégia de inovação em diversos segmentos industriais, destacando os setores farmacêuticos, alimentícios, cosméticos e sanitizantes. Os compostos bioativos exercem atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, entre outras. Portanto, estudos morfológicos, químicos, nutricionais e farmacológicas são desenvolvidos para o entendimento das características e potencialidades de inúmeras espécies (Newman; Cragg, 2007).

As plantas sintetizam diversos compostos químicos com diferentes atividades biológicas, que apresentam um importante papel ecológico, pois podem ser atrativos para agentes polinizadores, reguladores do crescimento e defensores químicos contra a radiação ultravioleta e ao ataque de insetos, de herbívoros e de microrganismos (Harbone; Willians; 2000).

Dentre as diferentes classes de compostos bioativos, os compostos fenólicos destacam-se por apresentar capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana e podem estar presentes em todas as partes da planta desde a raiz até aos frutos. Estes compostos apresentam diversas estruturas químicas e variam quantitativa e qualitativamente dentro de uma mesma planta e em diferentes plantas (Harbone; Willians, 2000; Cheynier, et al.; 2005).

A Região Amazônica se destaca em virtude da quantidade e da diversidade em espécies vegetais nativas e exóticas, muitas das quais são utilizadas pelas comunidades

nativas na medicina popular (Braz-Filho, 1999). Desta forma, o estudo aprofundado dos compostos bioativos contidos nas diferentes espécies vegetais amazônicas tem despertado o interesse da comunidade científica para determinar possíveis aplicações, fato que auxiliaria no desenvolvimento sustentável da Região.

Silva et al. (2007) e Souza et al. (2008) avaliaram a atividade antioxidante e o conteúdo em compostos fenólicos de extratos obtidos de diversas espécies vegetais da Região Amazônica. Estes autores observaram que as espécies *Byrsonima crassifolia*, *Bauhinia macrostachya*, *Cecropia palmata*, *Cedrela odorata*, *Cordia exaltata*, *Davilla kunthii*, *Davilla rugosa*, *Inga edulis* e *Stryphnodendron barbatiman* podem ser consideradas como fontes de antioxidantes, principalmente devido aos seus elevados teores em compostos fenólicos.

A extração de compostos bioativos em matrizes vegetais constitui uma importante etapa para o estudo e para fabricação de produtos ricos nesses compostos. A aplicação de uma tecnologia extrativa de baixo custo para obter moléculas a serem utilizadas como aditivos alimentares ou produtos nutracêuticos pode ser uma estratégia para a elaboração de novos produtos (Rice-Evans; Miller; Paganga, 1997).

A capacidade antioxidante e a atividade antimicrobiana de extratos de plantas ricas em compostos bioativos tem tornado a base de muitas aplicações, como agentes naturais para conservação na indústria de alimentos e farmacêutica (Cosentino et al., 1999; Kamel et al., 2007).

Os antioxidantes sintéticos são adicionados nos produtos alimentícios para prolongar a estabilidade destes durante processamento e estocagem. Porém, estas substâncias sintéticas vêm sendo relacionadas com efeitos danosos a saúde (Decker, 2008). Assim, a busca por antioxidantes de fontes naturais e a identificação destes compostos que podem substituir os sintéticos tem recebido muita atenção (Botterweck et al., 2000; Dahanukar et al., 2000).

Outro fator que influencia na estabilidade dos produtos alimentícios é a deterioração microbiana. Os alimentos contaminados principalmente com patógenos são frequentemente identificados como a principal fonte de intoxicações alimentares em humanos (Celiktas et al., 2007). Além disso, existe um crescente desenvolvimento da resistência dos microrganismos aos antibióticos comerciais. Neste contexto, estudos sistemáticos para identificação de

substâncias bioativas de plantas pode resultar no desenvolvimento de novos e eficazes compostos antimicrobianos e antioxidantes (Pranshanth et al., 2001).

Este estudo tem por objetivo determinar o conteúdo em compostos fenólicos, a atividade antioxidante pelos métodos ORAC e DPPH, o potencial antimicrobiano pelo teste de difusão em disco e a concentração mínima inibitória pelo método de microdiluição de extratos de dezessete espécies vegetais amazônicas.

IV.2 MATERIAL E MÉTODOS

IV.2.1 Material vegetal

Foram coletadas amostras das 17 espécies vegetais (Tabela 1) nas cidades de Ananindeua, Belém e Igarapé Açu (Estado do Pará – Brasil). A identificação taxonômica de cada espécie foi realizada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Engenharia Química e de Alimentos da Universidade Federal do Pará (Belém), onde foram submetidas às etapas de seleção manual, lavagem com água corrente, secagem em estufa com circulação forçada de ar (60°C/3h) e moídas (5 mm de granulometria). Em seguida, as amostras foram armazenadas em potes plásticos sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até o procedimento de extração dos compostos bioativos.

A seleção das partes de cada espécie vegetal utilizada neste estudo foi baseada nas informações obtidas no banco de dados com 300 espécies nativas da Região Amazonica; nos dados científicos a respeito da capacidade antioxidante e atividade antibacteriana de extratos vegetais pertencentes ao mesmo gênero, baseando-se no fato que plantas de mesmo gênero costumam ter propriedades comuns e nos dados quanto ao conteúdo fenólico de espécies vegetais amazônicas obtidos por Silva et al (2007) e Souza et al. (2008).

Tabela 1. Espécie, família, nome vulgar, partes analisadas e código da excilcata do herbário dos vegetais amazônicos estudados.

Nome científico [#]	Família	Nome vulgar	Parte da planta	Código da excilcata
<i>Acmella oleracea</i> **	Asteraceae	jambu	Folha	-
<i>Annona Montana</i>	Annonaceae	guanabana	Folha	188556
<i>Arrabidaea chica</i>	Bignoniaceae	pariri	Folha	0150701
<i>Bixa orellana</i>	Bixaceae	urucum	Folha	160166
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Malpighiaceae	muruci	Folha	144054
<i>Cedrela odorata</i>	Meliaceae	embaúba	casca, folha	172548
<i>Connarus perrotetti</i> *	Connaraceae	-	Folha	56489
<i>Croton cajucara</i>	Euphorbiaceae	sacaca	caule, folha	58703
<i>Dalbergia monetaria</i>	Fabaceae	verônica	Folha	197718
<i>Davilla kunthii</i>	Dilleniaceae	cipó-de-fogo	Folha	196781
<i>Davilla rugosa</i>	Dilleniaceae	cipó cabloco	Folha	197797
<i>Inga edulis</i>	Fabaceae	ingá cipó	Folha	125696
<i>Phyllanthus niruri</i>	Phyllanthaceae	quebra-pedra	planta ^{##}	191623
<i>Scoparia dulcis</i>	Plantagineaceae	vassourinha	Planta	197912
<i>Solanum juripeba</i>	Solanaceae	jurubebinha	Folha	0150798
<i>Stryphnodendron barbatiman</i> **	Fabaceae	barbatimão	folha, ramo, casca	163804
<i>Tabernaemontana angulata</i> *	Apocynaceae	grão de cachorro	Folha	-

[#] As amostras vegetais foram coletadas em triplicatas, porém determinadas espécies foram coletadas em uma (*) ou duas (**) replicatas; ^{##} A amostra consistiu em todas as partes aéreas da planta.

IV.2.2 Reagentes químicos

Acetato de etila P.A, metanol P.A, butanol P.A, ácido clorídrico P.A, acetona P.A (Synth-Brasil); padrões de catequina, cianidina e rutina (Extrasynthèse-França); 2,2'-azinobis-amidinopropano dihidrocloro (AAPH), fluoresceína, 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-ácido carboxílico (Trolox), 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich-EUA); fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico e hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec-Brasil); cloreto de alumínio (Merck-Alemanha); dimetilsulfóxido P.A (DMSO) (Nuclear-Brasil); caldo de Infusão de cérebro e coração (BHI), Mueller-Hinton caldo, agar e agar tripton de soja (Difco-EUA).

IV.2.3 Preparação dos extratos vegetais

Os extratos vegetais foram obtidos através de extração sólido-líquido a partir de métodos propostos por Pozo-Insfran et al. (2004), Pellegrini et al.(2007) e Pompeu et al. (2009). A extração foi realizada com três sistemas sequenciais de solvente com polaridade crescente: acetato de etila, metanol e solução hidrometanólica (1:1 v:v) todos acidificados com 0.1 % de ácido clorídrico.

As amostras foram pesadas e depositadas em frasco âmbar, em seguida foi adicionado o acetato de etila na razão de 1:6 (massa de planta seca:volume de solução extratora) e maceradas à temperatura ambiente durante 1 h. O extrato obtido foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1 e o resíduo foi macerado nas mesmas condições com o mesmo solvente, os extratos obtidos foram misturados. Este mesmo procedimento foi realizado para o metanol e para solução hidrometanólica.

O processo resultou nos seguintes extratos: [1] acetato de etila (EAE), [2] metanólico (EM) e [3] hidrometanólico (EHM), que foram concentrados com auxílio de evaporador rotativo a 40 °C e divididos em duas partes iguais. Uma parte de cada extrato foi misturada, reconcentrada, liofilizada por 48 h, saturada com N_{2(g)} e armazenada sob refrigeração, obtendo-se assim o extrato bruto seco (EBS); e a outra parte foi reconcentrada separadamente, liofilizada e armazenada (-18 °C). O rendimento da extração foi expresso em miligrama de extrato seco por grama de matéria-prima seca (mg EBS.g⁻¹ MPS).

IV.2.4 Determinação do conteúdo em compostos fenólicos

IV.2.4.1 Polifenóis totais

A concentração em polifenóis totais (PT) dos extratos obtidos foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos, 1999). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes catequina (ECat) por grama extrato seco (ES) e em miligramas de ECat por grama de matéria-prima seca (MPS).

IV.2.4.2 Flavonóis totais

A concentração em flavonóis totais (FOT) foi determinada através da reação destes compostos com cloreto de alumínio, conforme metodologia descrita por Quettier-Deleu et al. (2000). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes rutina (ERut) por grama de ES.

IV.2.4.3 Proantocianidinas totais

A concentração em proantocianidinas totais (PROT) foi determinada pelo método butanol-HCl conforme proposto por Julkunen-Tiitto (1985). Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes cianidina (ECia) por grama ES.

IV.2.5 Avaliação da capacidade antioxidante

IV.2.5.1 Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

A capacidade antioxidante pelo método ORAC foi determinada conforme metodologia proposta por Silva et al. (2007). Os resultados foram expressos como micromoles de equivalentes Trolox (ET) por grama de ES.

IV.2.5.2 Método DPPH

A capacidade antioxidante pelo método DPPH foi determinada conforme proposto por Brand-Williams et al. (1995). Os resultados foram expressos em micromoles de ET por grama de ES.

IV.2.6 Determinação da atividade antibacteriana

IV.2.6.1 Microrganismos de estudo

Foram utilizadas cepas de bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhi*

IAL 1251). Estas cepas foram ativadas em meios de cultura seletivos e mantidas sob refrigeração em Agar Triptona de Soja até o momento dos testes antimicrobianos.

IV.2.6.2 Teste de susceptibilidade antibacteriana

IV.2.6.2.1 Padronização e neutralização dos extratos brutos

Os extratos brutos (EB) foram padronizados a uma concentração de 50 mM de ECat.mL⁻¹ de água ultrapura a partir dos resultados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu. Após padronização, os extratos foram neutralizados com NaOH até pH 6,5-7,5.

IV.2.6.2.2 Preparo dos discos

Foram adicionados 10 µL da solução dos extratos brutos padronizados e neutralizados em discos estéreis de papel filtro Whatman n° 42 com 6 mm de diâmetro. Após 30 min para absorção, os discos foram distribuídos em placas de petri contendo o meio de cultura e o inóculo e deixados a temperatura ambiente durante aproximadamente uma hora para difusão dos extratos.

Como antibióticos de referência foram utilizados discos padronizados com ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ertitromicina (10 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 U.I) e tetraciclina (30 µg).

IV.2.6.2.3 Método de difusão em disco

O potencial antibacteriano dos extratos brutos vegetais foi avaliada através do método de difusão em disco, de acordo com o descrito pela CLSI (2006) com modificações. As bactérias foram ativadas em caldo BHI por 24h e ajustadas à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ determinada pela escala de 0,5 McFarland. Cinquenta microlitros (10^7 UFC.mL⁻¹) desta suspensão foram misturados com 4,95 mL de Mueller-Hinton agar e adicionados imediatamente na placa de petri. Após a solidificação do meio, quatro discos foram colocados e levemente pressionados contra a superfície do meio e incubadas a 37°C durante 24h.

A atividade antibacteriana foi avaliada pela medida do diâmetro da zona de inibição ao redor do disco com auxílio de paquímetro. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em milímetros (mm).

IV.2.6.3 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) por microdiluição

IV.2.6.3.1 *Preparo dos extratos*

A CMI foi determinada para os EB que apresentaram atividade antibacteriana no teste de difusão em disco, os mesmos foram diluídos a concentração de 2 mg.mL^{-1} em solução DMSO:H₂O 2:8 (v:v), enquanto que os extratos EAE e EM foram solubilizados em DMSO:H₂O 4:6 (v:v) a 2 e $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente, e o extrato EHM foi preparado em DMSO:H₂O 1:9 (v:v) a 2 mg.mL^{-1} .

IV.2.6.3.2 *Metodologia de microdiluição*

A concentração mínima inibitória dos extratos foi determinada usando o método de microdiluição em microplacas estéreis de 96 poços como proposto pela CLSI (2009) com modificações. As microplacas foram preparadas da seguinte forma: no poço A1 foi adicionado 200 μL de caldo Mueller-Hinton (MHC) (controle de esterilidade), no A2 colocou-se 170 μL de MHC e 30 μL de inóculo (controle do crescimento), o A3 foi preenchido com 170 μL de MHC e 30 μL de amostra (branco para análise espectrofotométrica e controle de esterilidade da amostra), no A4 foi completado conforme o A3 e adicionou-se 30 μL de inóculo. Os demais poços foram preenchidos conforme o A3 e A4, com concentrações crescentes das amostras, na faixa de 0,05 a $1,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ para os extratos brutos, de 0,02 a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ para os EAE e EHM e de 0,05 a $0,250 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o EM).

Amoxicilina (1 mg.mL^{-1}) e as soluções DMSO:H₂O utilizadas na solubilização das amostras foram analisadas como controle positivo e negativo, respectivamente. Foi feito também o controle de esterilidade da solução salina utilizada no preparo do inóculo.

Após preparadas adequadamente, as microplacas foram seladas e incubadas a 37°C por 24h. A CMI foi determinada por espectrofotometria a 600 nm após inibição nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{g de ES.mL}^{-1}$ de solução.

Após análise espectrofotométrica foi realizado o teste colorimétrico utilizando a resazurina na concentração de $(0,1 \text{ mg.mL}^{-1})$. Esta substância é um indicador de óxido-redução, utilizada para identificar a mudança de pH no meio pelo crescimento microbiano (MONTEJANO et al, 2005).

IV.2.7 Análise estatística

Os dados obtidos são expressos como média \pm desvio padrão (DP). Os coeficientes de correlação foram determinados no Microsoft Office Excell 2007. Os resultados obtidos experimentalmente foram analisados usando ANOVA (análise de variância) e o teste de comparações múltiplas (Tukey-Kramer), utilizando o STATISTIC 7.0 (StartSoft, Tulsa, OK) sob Windows Vista Home Basic. Variáveis que apresentaram $p > 0,05$ foram consideradas estatisticamente insignificantes.

IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.3.1 Avaliação do extrato bruto

Foram primeiramente avaliados os extratos brutos (EB), provenientes das misturas dos extratos acetato de etila, metanólico e hidrometanólico extraído sequencialmente conforme descrito no item III.2.3.

IV.3.1.1 Rendimento da extração, conteúdo em compostos fenólicos e capacidade antioxidante

A Tabela 2 apresenta os resultados do rendimento da extração, a concentração de polifenóis totais (PT), flavonóis totais (FOT) e proantocianidinas totais (PROT) e a capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC (valor ORAC) dos extratos brutos dos vegetais amazônicos.

Tabela 2. Rendimento da extração, conteúdo de polifenóis totais (PT), flavonóis totais (FOT), proantocianidinas totais (PROT) e capacidade antioxidante (valor ORAC) dos extratos brutos das espécies vegetais amazônica.

Espécie Vegetal	Parte da planta	Rendimento mg ES.g ⁻¹ MPS	PT			FOT	PROT	Valor ORAC
			mg ECat.g ⁻¹ MPS	mg ECat.g ⁻¹ ES	mg ERut.g ⁻¹ ES [#]	mg ECia.g ⁻¹ ES [#]	μM ET.g ⁻¹ ES	
<i>Acmella oleracea</i>	Folha	380 ± 115	8,76 ± 7,49	21,01 ± 13,49	-	-		
<i>Annona montana</i>	Folha	440 ± 51	9,30 ± 2,78	21,26 ± 6,09	-	-	2743 ± 877	
<i>Arrabidaea chica</i>	Folha	419 ± 32	19,55 ± 7,57	46,56 ± 16,58	-	-	1716 ± 30	
<i>Bixa orellana</i>	Folha	300 ± 8	52,78 ± 6,64	175,60 ± 21,50	-	-	776 ± 254	
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Folha	460 ± 56	126,52 ± 26,10	277,13 ± 58,14	31,26 ± 8,27	21,04 ± 1,33	4551 ± 1109	
<i>Cedrela odorata</i>	Folha	243 ± 103	70,37 ± 36,31	280,15 ± 71,59	-	-	2298 ± 1317	
	Casca	250 ± 58	39,00 ± 12,81	155,20 ± 41,15	9,89 ± 0,44	12,08 ± 4,87	828 ± 362	
<i>Connarus perrotteti</i>	Folha	203,04	75,37	371,20	55,73	19,32	3579 ± 208	
<i>Croton cajucara</i>	Folha	317 ± 178	19,47 ± 6,78	65,86 ± 15,56	-	-	1489 ± 45	
	Caule	174 ± 11	13,99 ± 4,94	81,32 ± 33,62	-	-	163 ± 2	
<i>Dalbergia monetaria</i>	Folha	638 ± 290	62,53 ± 24,71	103,32 ± 22,61	48,77 ± 7,64	6,83 ± 0,64	2239 ± 450	
<i>Davilla kunthii</i>	Folha	255 ± 47	81,43 ± 2,25	325,26 ± 53,80	56,41 ± 21,80	13,65 ± 3,19	286 ± 3	
<i>Davilla rugosa</i>	Folha	232 ± 40	72,17 ± 6,07	320,60 ± 87,77	61,48 ± 8,97	14,01 ± 22,76	737 ± 126	
<i>Inga edulis</i>	Folha	417 ± 44	57,67 ± 16,95	138,02 ± 33,74	61,84 ± 11,83	28,87 ± 5,89	898 ± 536	
<i>Phyllanthus niruri</i>	Planta	314 ± 51	60,82 ± 12,93	199,05 ± 60,36	26,45 ± 2,32	1,71 ± 0,76	1824 ± 189	
<i>Scoparia dulcis</i>	Planta	144 ± 28	30,12 ± 12,18	204,04 ± 41,34	-	-	331 ± 237	
<i>Solanum juripeba</i>	Folha	157 ± 67	25,18 ± 21,83	141,90 ± 63,22	-	-	800 ± 340	
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Folha	320 ± 57	25,58 ± 7,35	79,27 ± 8,75	-	-	764 ± 86	
	Casca	127 ± 94	51,56 ± 15,02	408,85 ± 24,44	11,48 ± 1,41	62,43 ± 7,36	308 ± 273	
	Ramo	442 ± 44	16,93 ± 6,72	37,51 ± 7,19	10,38 ± 1,88	27,79 ± 0,80	2006 ± 231	
<i>Tabernaemontana angulata</i>	Folha	53,08	14,15	266,59	-	-		

Valores referentes à média ± desvio padrão (DP), exceto para *Connarus perrotteti* e *Tabernaemontana angulata*; # O conteúdo em flavonóis e proantocianidinas totais foi determinado apenas para os extratos que apresentaram atividade antibacteriana; MPS: matéria prima seca, ES: extrato seco, PT: polifenóis totais, FOT: flavonóis totais, PROT: proantocianidinas totais, ECat: equivalente catequina, ERut: equivalente rutina, ECia: equivalente cianidina; ET: equivalente trolox.

O rendimento (massa de extrato por massa de matéria prima) obtido durante a etapa de extração variou de 53,10 (5,3%) a 638 (63,8%) mg de extrato seco por grama de material vegetal seco. Os conteúdos mínimos e máximos foram encontrados para as folhas de *Tabernaemontana angulata* e *Dalbergia monetaria*, respectivamente.

Diferentes fatores influenciam na extração de compostos em matrizes vegetais tais como a natureza química dos compostos a serem extraídos, o método de extração empregado, o tamanho de partícula do material vegetal, as condições de tempo e temperatura e a presença de compostos interferentes (Prior; Cao, 1999). Estes fatores podem explicar as diferenças no rendimento de extração das amostras analisadas.

Os resultados da concentração em PT foram apresentados em base seca de matéria prima, com o intuito de comparar o quanto estes compostos são produzidos por biomassa pelo vegetal e em extrato seco para avaliar o quanto foi extraído em cada etapa de extração.

Ao analisar os conteúdos de PT presentes nas matérias primas vegetais, observa-se que as folhas de *Byrsonima crassifolia* (12,6%) e *Davilla kunthii* (8,1%) apresentaram maior teor em relação à biomassa, isso sugere que estas folhas sintetizam mais esses compostos quando comparado com as demais espécies vegetais estudadas. A concentração elevada nas folhas sugere que a biossíntese dos compostos biativos é acelerada pela exposição aos raios ultravioleta e promovem a proteção da planta contra esses raios emitidos pelo sol (HARBONE e WILLIAMS, 2000). Entretanto, outras matrizes vegetais como as folhas de *Connarus perrotteti*, *Davilla rugosa* e *Cedrela odorata* podem ser fontes de compostos fenólicos, pois apresentam 7,5; 7,2 e 7,0% de PT, respectivamente.

Souza et al. (2008) determinaram o conteúdo fenólico de diferentes partes das espécies *Byrsonima crassifolia*, *Davilla kunthii*, *Davilla rugosa* e *Inga edulis*. Os teores encontrados para as folhas dessas plantas foram inferiores ao encontrado neste trabalho, essa diferença no teor de PT pode ser devido ao processo extrativo aplicado em cada trabalho, ao período de coleta, ao transporte, ao armazenamento, ao habitat e ao estágio de cada planta.

Em relação ao conteúdo de fenólicos nos extratos, verifica-se que o extrato bruto da casca de *Stryphnodendron barbatiman* apresenta o maior teor em PT (40,8%), entretanto estes compostos representam apenas 5,1% em relação as cascas secas, indicando que o procedimento de extração utilizado foi bastante efetivo nesta matriz. Os extratos das folhas

de *Connarus perrotteti*, *Davilla rugosa*, *Davilla kunthii*, *Cedrela odorata* e *Byrsonima crassifolia* também apresentaram um elevado conteúdo em PT com extratos enriquecidos a 37,0; 32,0; 32,5; 28,0 e 27,7%, respectivamente. Entretanto, no estudo realizado por Silva et al (2007), o extrato de folhas de *Byrsonima crassifolia* apresentou teores mais elevados em relação ao da casca de *Stryphnodendron barbatiman*.

FOT e PROT (Tabela 2) representam em média 17,5% e 8,6% dos teores em PT, respectivamente, indicando que os extratos contêm outras classes de compostos fenólicos, tais como flavanonas, flavonas, ácidos fenólicos ou outras classes de compostos bioativos que participam da reação que ocorre no método de Folin-Ciocalteu.

Para as folhas de *Byrsonima crassifolia*, *Connarus perrotteti*, *Dalbergia monetaria*, *Davilla kunthii*, *Davilla rugosa*, *Inga edulis*, *Phyllanthus niruri* e a casca de *Cedrela odorata* apresentaram conteúdo de FOT maior que de PROT, enquanto que para a casca e o ramo de *Stryphnodendron barbatiman* observou-se o contrário. Souza et al. (2008) verificaram que as folhas de *Davilla kunthii*, *Davilla rugosa* e *Inga edulis* apresentaram conteúdo de FOT superior que as folhas de *Byrsonima crassifolia*.

As folhas de *Davilla kunthii*, *Davilla rugosa* e *Inga edulis* apresentaram o maior conteúdo em FOT (aproximadamente 6%), o que corresponde a 17; 19 e 44% dos fenólicos totais, respectivamente. O extrato da casca de *Stryphnodendron barbatiman* destaca-se por apresentar o maior conteúdo de proantocianidinas totais, o que representa 15% dos PT.

A capacidade antioxidante dos extratos brutos determinada pelo método ORAC variou entre 163 a 4551 $\mu\text{M EqT.g}^{-1}$ EBS para *Croton cajucara* (caule) e *Byrsonima crassifolia* (folha), respectivamente. Estes valores foram superiores as fontes vegetais que são ricas em antioxidantes, como morango, batata, brócolis entre outras (Wu et al., 2004). As cascas e caule apresentaram valor ORAC menor que as folhas da mesma espécie ou quando comparado as folhas dos demais extratos, estando de acordo com os apresentados por Silva et al. (2007).

Os extratos brutos do ramo de *Stryphnodendron barbatiman* e as folhas de *Annona montana* têm baixo teor em polifenóis totais porém apresentam alto valor ORAC, indicando que os compostos fenólicos dessas plantas não possuem boa capacidade antioxidante e que

outros compostos podem apresentar esta propriedade. O efeito contrário foi observado para o extrato bruto da casca de *Stryphnodendron barbatiman*.

Os extratos obtidos das folhas de *Annona montana*, *Arrabidaea chica*, *Byrsonima crassifolia*, *Cedrela odorata*, *Connarus perrotteti*, *Dalbergia monetaria* e as partes aéreas de *Phyllanthus niruri* destacam-se por apresentar elevada capacidade antioxidante avaliada pelo método ORAC.

Em geral foram observados elevados valores de desvios padrão em relação à média em todas as análises realizadas, provavelmente devido à coleta do material vegetal estudado, ter sido realizada em locais distintos. Essas diferenças ocorrem, pois as características do habitat natural, como solo, clima, presença de microrganismo, ataques de agentes externos, exposição aos raios UV entre outros, influenciam na biossíntese dos compostos do metabolismo secundário das plantas (HARBONE e WILLIAMS, 2000).

IV.3.1.2 Atividade antimicrobiana e concentração mínima inibitória

A eficácia antibacteriana dos extratos obtidos dos vegetais amazônicos foi avaliada qualitativa e quantitativamente pela presença ou ausência de halo de inibição (Tabela 3) e pelo valor da concentração mínima inibitória (CMI) (Tabela 4), respectivamente.

Tabela 3. Halo de inibição (mm) dos extratos brutos das espécies vegetais e de diferentes antibióticos frente às cepas bacterianas.

Espécie Vegetal*	Parte da planta	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
<i>Bixa orellana</i>	Folha	7,22 ± 0,19	SA	9,00 ± 3,95	SA	7,86 ± 0,48	SA
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Folha	10,00 ± 1,00	8,25 ± 1,64	9,73 ± 0,58	8,08 ± 1,42	9,48 ± 1,13	9,03 ± 0,57
<i>Cedrela odorata</i>	Casca	9,83 ± 0,24	7,60 ± 0,57	9,25 ± 0,14	10,25 ± 0,82	9,30 ± 0,21	8,99 ± 0,48
<i>Conarus perrotteti</i>	Folha	8,67 ± 1,53	6,50 ± 0,58	7,32 ± 1,53	8,00 ± 0,20	SA	6,90 ± 0,05
<i>Dalbergia monetaria</i>	Folha	8,56 ± 0,69	SA	7,97 ± 0,25	SA	9,23 ± 1,11	8,16 ± 0,75
<i>Davilla kunthii</i>	Folha	6,83 ± 0,29	SA	7,00 ± 0,71	SA	SA	SA
<i>Davilla rugosa</i>	Folha	8,33 ± 0,58	SA	6,96 ± 0,41	7,47 ± 0,12	SA	SA
<i>Inga edulis</i>	Folha	8,67 ± 0,3	7,33 ± 1,04	8,61 ± 0,80	7,72 ± 0,74	10,93 ± 0,6	8,78 ± 0,66
<i>Phyllanthus niruri</i>	Planta	7,78 ± 0,96	6,73 ± 0,42	8,74 ± 0,67	7,87 ± 0,99	7,78 ± 0,83	8,28 ± 0,66
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Casca	8,68 ± 0,02	8,60 ± 0,28	8,00 ± 1,41	SA	SA	SA
	Ramo	7,83 ± 0,24	8,20 ± 1,41	9,17 ± 1,65	7,94 ± 0,09	7,50 ± 0,71	7,25 ± 1,06
Ampicilina		13,33 ± 1,53		22,33 ± 2,52			20,67 ± 4,16
Cloranfenicol		13,67 ± 1,53					
Eritromicina			24,33 ± 3,08				
Gentamicina			12,33 ± 2,52	10,33 ± 1,53	16 ± 1,00	11,67 ± 2,08	13,67 ± 0,58
Penicilina G					15 ± 1,00		
Tetraciclina						11,67 ± 2,52	

Valores referentes à média ± desvio padrão (DP); * Extratos com concentração de 50mM ECat.mL⁻¹ de solução e os antibióticos a concentração de 10µg para ampicilina, eritromicina e gentamicina; 30µg para cloranfenicol e tetraciclina e 10U.I para penicilina G, SA - sem atividade.

Os halos de inibição dos extratos vegetais que apresentaram efeito inibitório foram 7,00 a 9,73; 7,47 a 10,25; 6,83 a 10,00 e 6,50 a 8,60 mm para as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *E. faecalis*, respectivamente. Para as Gram-negativas *E. coli* e *S. typhi*, os halos variaram de 6,50 a 10,93 e 6,50 a 9,03 mm, respectivamente. A diferença no tamanho dos halos pode ser dada em função das propriedades fitoquímicas distintas entre as espécies, o mecanismo de ação do extrato, da morfologia e características da parede celular das bactérias em estudo.

O extrato das folhas de *Arrabidaea chica* apresentou efeito antibacteriano somente para *S. aureus* com halo de $7,50 \pm 0,50$ mm, enquanto que o das folhas de *Acmella oleracea*, *Annona montana*, *Croton cajucara* (inclusive o caule), *Solanum juripeba*, *Stryphnodendron barbatiman* e *Tabernaemontana angulata* não apresentaram atividade antibacteriana para nenhuma das cepas em estudo. Porém não se pode afirmar que estas espécies vegetais não sejam agentes antimicrobianos, pois é possível que o extrato contenha constituintes antibacterianos em concentrações não suficientes para ser considerado efetivo quando padronizado em 50 mM de equivalente catequina de solução ou podem apresentar atividade para outras cepas.

Palombo e Semple (2001) citam que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes que as Gram-positivas, pois estas bactérias possuem uma membrana externa que atua como uma barreira protetora contra a entrada de substâncias na célula, incluindo os antibióticos. Porém, isto não foi observado para a maioria das espécies vegetais estudadas, pois os halos de inibição entre as cepas não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) para um mesmo extrato vegetal. Isto indica que as plantas que apresentaram atividade antimicrobiana possuem extratos ricos em compostos bioativos com amplo espectro de ação por inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. No entanto, este efeito não foi observado para os extratos brutos das folhas de *Davilla kunthii*, *Davilla rugosa* e da casca de *Stryphnodendron barbatiman*, pois estes extratos não inibiram nenhuma cepa Gram-negativa estudada.

Para todas as cepas foram testados dois antibióticos como controle positivo e para determinar o espectro de ação e compara-los com os extratos brutos. Para *B. cereus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* os antibióticos apresentaram halos de inibição com o mesmo tamanho, enquanto que para *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. typhi* foi observado o contrário sendo essas cepas mais sensíveis à eritromicina e ampicilina, respectivamente.

B. cereus e *S. aureus* foram os microrganismos mais sensíveis aos extratos brutos e que apresentaram maiores halos de inibição. Isso é desejável principalmente para *S. aureus*, pois esta cepa é muito resistente a antibióticos ativos para as bactérias Gram-positivas (FORSYTHE, 2002). As folhas de *Byrsonima crassifolia* destacam-se por apresentar atividade antibacteriana para todas as cepas em estudo e por apresentar os maiores halos.

Após o screening antibacteriano das espécies vegetais frente às cepas em estudo foi determinada a concentração mínima inibitória dos extratos brutos que apresentaram resultados positivos (Tabela 4).

Tabela 4. CMI ($\mu\text{gES.mL}^{-1}$) dos extratos brutos das espécies vegetais frente as cepas bacterianas em estudo.

Espécie vegetal	Parte da planta	<i>B. cereus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Folha	83 ± 29	333 ± 58	133 ± 58	67 ± 29	233 ± 58	83 ± 29
<i>Cedrela odorata</i>	Casca	75 ± 35	75 ± 35	250 ± 71	150 ± 71	550 ± 71	350 ± 71
<i>Connarus perrotteti</i>	Folha	83 ± 29	167 ± 58	133 ± 58	167 ± 115	-	133 ± 58
<i>Dalbergia monetaria</i>	Folha	367 ± 58	-	283 ± 202	-	667 ± 115	267 ± 58
<i>Davilla kunthii</i>	Folha	333 ± 153	-	300 ± 100	-	-	-
<i>Davilla rugosa</i>	Folha	267 ± 58	-	233 ± 58	167 ± 58	-	-
<i>Inga edulis</i>	Folha	300 ± 200	303 ± 6	367 ± 153	117 ± 76	467 ± 231	267 ± 58
<i>Phyllanthus niruri</i>	Planta	267 ± 208	200 ± 100	117 ± 76	233 ± 58	167 ± 58	133 ± 58
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Casca	350 ± 71	500 ± 7	110 ± 14	-	-	-
	Ramo	500 ± 141	550 ± 212	300 ± 141	150 ± 71	650 ± 71	450 ± 71
Amoxicilina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		17 ± 6	37 ± 6	37 ± 6	33 ± 6	17 ± 6	17 ± 6

Valores referentes à média ± desvio padrão (DP); - Extratos brutos que não apresentaram halo de inibição frente às bactérias no teste de difusão em disco; Os níveis de CMI usados foram: CMI > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (inativo); CMI = 500 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (fraco); CMI = 100 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (moderadamente ativo) e CMI < 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ativo).

A concentração mínima inibitória dos extratos brutos variou entre 117 a 300; 67 a 233; 75 a 500; 75 a 550; 83 a 450 e 100 a 667 $\mu\text{gES.mL}^{-1}$ de solução para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. typhi* e *E. coli*, respectivamente. Para amoxicilina a CMI foi de 37; 33; 17; 37; 17 e 17 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de solução para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. typhi* e *E. coli*, respectivamente. O extrato bruto de *Bixa orellana* apresentou CMI de 167; 267 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de solução para *B. cereus*, *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

O extrato obtido das folhas de *Byrsonima crassifolia* apresentou a menor CMI para *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *S. typhi*. Para *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*, a menor CMI foi das partes aéreas de *Phyllanthus niruri*, da casca *Cedrela odorata* e casca *Stryphnodendron barbatiman*, respectivamente.

Destaca-se a CMI do extrato bruto da casca de *Cedrela odorata* que foi apenas duas vezes maior que a do antibiótico padrão testada para *E. faecalis*, o mesmo foi observado para o extrato das folhas de *Byrsonima crassifolia* porém para *L. monocytogenes*.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é estabelecida de acordo com a concentração mínima inibitória: (i) CMI > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a amostra é considerada inativa; (ii) CMI entre 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é fraca; (iii) CMI entre 100 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ é moderadamente ativa e (iv) CMI < 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a amostra é ativa (HOLETZ et al, 2002). Deste modo, os extratos brutos das folhas de *Byrsonima crassifolia*, de *Connarus perrotteti* e das cascas de *Cedrela odorata* são ativos para a maioria das cepas bacterianas em estudo e os demais são moderadamente ativos, exceto para os extratos de *Dalbergia monetaria* (folha) e *Stryphnodendron barbatiman* (ramos) que são considerados fracos para *E. coli*. Esses resultados indicam que a maioria dos extratos são bons agentes antibacterianos e podem ser aplicados em diversos segmentos industriais.

O método colorimétrico de microdiluição adicionando resazurina (0,1 mg.mL^{-1}) foi utilizado para validar os resultados de CMI obtidos por espectrofotometria. Após análise dos resultados observou-se que não existe diferença significativa ($P > 0,05$) entre os métodos espectrofotométricos e colorimétricos.

IV.3.1.2.1 Verificação da correlação entre teor de polifenóis totais, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana

Na Tabela 5 são apresentados os coeficientes de correlação do conteúdo de FOT e PROT e o valor ORAC com os halos de inibição para as cepas bacterianas em estudo.

Tabela 5. Coeficientes de correlação do conteúdo em PT, FOT e PROT e a capacidade antioxidante com halo de inibição para as cepas bacterianas em estudo.

	FOT	PROT	Valor ORAC
<i>B. cereus</i>	0,360***	0,211*	0,240*
<i>E. faecalis</i>	0,592***	0,510***	0,230*
<i>S. aureus</i>	0,429***	0,108	0,282*
<i>L. monocytogenes</i>	0,211*	0,092	0,196
<i>E. coli</i>	0,196	0,222*	0,395***
<i>S. typhi</i>	0,246*	0,196	0,482***

Correlação significativa ao nível 0,05 (*), 0,01 (**) e 0,005 (***) (monocaudal).

Entretanto, observou-se uma correlação significativa entre o teor de FOT e o halo de inibição para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em estudo, exceto para *Escherichia coli*, porém o teor de PROT apresentou uma correlação significativa somente para *B. cereus*, *E. faecalis* e *E. coli*. Alguns estudos demonstraram que a resistência das bactérias aos compostos fenólicos depende da espécie bacteriana e da estrutura da molécula (CAMPOS; COUTO, HOGG, 2003; TAGURII; TANAKA; KOUTO, 2004).

Houve correlação significativa entre a capacidade antioxidante dos extratos brutos das espécies vegetais e o halo de inibição, exceto para *L. monocytogenes*. Este efeito dos antioxidantes naturais na atividade antimicrobiana de vegetais foi verificado por alguns autores (HUSSAIN et al, 2011; SIVROPOULOU et al, 1995).

Na Tabela 6 são apresentados os coeficientes de correlação do conteúdo em PT, FOT e PROT com a CMI para as bactérias em estudo.

Tabela 6. Coeficientes de correlação do conteúdo em PT, FOT e PROT com a CMI para as cepas bacterianas em estudo.

	PT	FOT	PROT
<i>B. cereus</i>	0,233	0,008	0,121
<i>E. faecalis</i>	0,102	0,290	0,641***
<i>S. aureus</i>	0,413**	0,358*	0,124
<i>L. monocytogenes</i>	0,002	0,121	0,494*
<i>S. typhi</i>	0,654***	0,360*	0,276
<i>E. coli</i>	0,664***	0,134	0,258

Correlação significativa ao nível 0,05 (*), 0,01 (**) e 0,005 (***) (monocaudal).

Para *S. aureus*, *S. typhi* e *E. coli* houve uma correlação entre o teor em PT e a CMI indicando que estes compostos apresenta menor concentração inibitória para bactérias Gram-negativas, os flavonóis correlacionaram apenas com estas bactérias. No entanto, o conteúdo de PROT correlacionou com as *E. faecalis* e *L. monocytogenes*. Esses resultados indicam que o tipo de composto fenólico influencia no efeito antimicrobiano devido provavelmente a estrutura das moléculas. Cowan (1999) demonstrou na revisão da literatura que quanto maior a hidroxilação dos compostos fenólicos maior a sua toxicidade para os microrganismos.

IV.3.2 Avaliação dos extratos com diferentes polaridades

Em função da atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos brutos foram selecionadas 11 partes de 9 espécies vegetais para avaliação de seus extratos com diferentes polaridades.

IV.3.2.1 Rendimento de extração, teor em polifenóis totais e capacidade antioxidante

A Tabela 7 apresenta os resultados do conteúdo de polifenóis totais e capacidade antioxidante pelo método DPPH do extrato acetato de etila (EAE), metanólico (EM) e hidrometanólico (EHM) obtidos de forma sequencial de diferentes matrizes vegetais amazônicas.

O método DPPH foi escolhido para determinar a capacidade antioxidante desses extratos com diferentes polaridades devido o meio reacional para este método ser o metanol, o que proporciona maior solubilidade dos extratos.

Tabela 7. Teor em polifenóis totais (PT) e capacidade antioxidante (valor DPPH) dos extratos obtidos das espécies vegetais amazônicas.

Espécie Vegetal	Parte da planta	PT		Valor DPPH $\mu\text{M ET.g}^{-1}\text{ES}$
		$\text{mgECat.g}^{-1}\text{MPS}$	$\text{mgECat.g}^{-1}\text{ES}$	
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Folha	126,52 ± 26,10		
EAE		7,60 ± 4,81	166,05 ± 132,04	3606 ± 569
EM		57,45 ± 19,59	693,71 ± 160,06	2018 ± 274
EHM		66,28 ± 27,87	598,17 ± 203,91	4905 ± 608
<i>Cedrela odorata</i>	Folha	70,37 ± 36,31		
EAE		1,11 ± 0,45	31,38 ± 19,48	3634 ± 55
EM		25,44 ± 8,38	294,29 ± 79,85	1967 ± 1422
EHM		12,82 ± 6,05	81,43 ± 32,21	2440 ± 1424
	Casca	39,00 ± 12,81		
EAE		1,19 ± 1,14	222,04 ± 225,03	2818 ± 2389
EM		16,56 ± 16,76	360,32 ± 192,11	1830 ± 1072
EHM		17,03 ± 10,18	441,03 ± 399,72	1661 ± 1032
<i>Connarus perrotteti</i>	Folha	75,37		
EAE		21,17	235,85	3074
EM		43,21	519,80	3553
EHM		18,35	325,89	4816
<i>Dalbergia monetaria</i>	Folha	62,53 ± 12,93		
EAE		1,24 ± 0,43	53,07 ± 17,29	4338 ± 125
EM		65,16 ± 4,78	341,12 ± 72,27	2904 ± 459
EHM		15,58 ± 4,68	100,27 ± 44,77	3798 ± 415
<i>Davilla kunthii</i>	Folha	81,43 ± 2,25		
EAE		4,04 ± 3,00	84,66 ± 37,46	2157 ± 1299
EM		32,34 ± 8,46	244,30 ± 139,72	2265 ± 593
EHM		49,40 ± 31,03	359,65 ± 225,21	1430 ± 371
<i>Davilla rugosa</i>	Folha	72,17 ± 6,07		
EAE		17,37 ± 1,76	200,24 ± 24,28	3383 ± 847
EM		38,93 ± 21,21	283,92 ± 111,58	5166 ± 1805
EHM		26,04 ± 4,23	285,74 ± 61,08	4555 ± 769
<i>Inga edulis</i>	Folha	57,67 ± 12,93		
EAE		0,61 ± 0,43	97,22 ± 49,97	404 ± 30
EM		20,06 ± 4,78	345,91 ± 113,97	2264 ± 1492
EHM		20,61 ± 4,68	372,96 ± 32,35	2595 ± 247
<i>Phyllanthus niruri</i>	Planta	60,82 ± 6,72		
EAE		3,37 ± 0,79	394,00 ± 52,67	1517 ± 175
EM		42,57 ± 0,83	570,46 ± 175,94	2347 ± 1147
EHM		37,56 ± 2,98	383,72 ± 86,09	4175 ± 603
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Casca	51,56 ± 15,02		
EAE		10,97 ± 0,04	128,46 ± 7,38	2898 ± 1936
EM		20,73 ± 13,16	282,05 ± 161,57	2154 ± 1392
EHM		9,72 ± 1,22	272,89 ± 10,04	1799 ± 1237
	Ramo	16,93 ± 6,72		
EAE		5,05 ± 0,79	395,09 ± 209,51	1137 ± 672
EM		8,19 ± 0,83	576,47 ± 478,49	900 ± 522
EHM		6,60 ± 2,98	119,59 ± 29,84	1571 ± 908

Valores referentes à média ± desvio padrão (DP), exceto para *Connarus perrotteti*; MPS: matéria prima seca, ES: extrato seco, PT: polifenóis totais, ECat: equivalente catequina, ET: equivalente trolox.

Em média o rendimento da extração dos extratos com polaridades diferentes foi de 12% para o extrato acetato de etila, 46% para o metanólico e 42% para o hidrometanólico. Para a maioria das espécies vegetais, os solventes metanol e metanol:H₂O foram os que

tiveram maior rendimento na extração sequencial com exceção para as folhas de *Connarus perrotteti* e as casca de *Stryphnodendron barbatiman*.

Ao analisar os teores de PT presentes nas matérias primas vegetais, observa-se que os extratos metanólicos apresentaram maior teor em biomassa, isso sugere que estes vegetais sintetizam mais os compostos solúveis em metanol quando comparado com os demais extratos, com exceção para as folhas de *Byrsonima crassifolia* e *Davilla kunthii* e para a casca de *Cedrela odorata* que apresentaram maior biomassa no EHM.

Para os extratos das folhas de *Byrsonima crassifolia*, *Connarus perrotteti*, *Davilla kunthii*, *Davilla rugosa*, *Inga edulis* e as cascas de *Cedrela odorata* e *Stryphnodendron barbatiman* houve um enriquecimento do conteúdo de PT nos EM e EHM quando comparado com os extratos brutos. Os extratos das folhas de *Cedrela odorata*, *Dalbergia monetaria*, as partes aéreas de *Phyllanthus niruri* e o ramo de *Stryphnodendron barbatiman* apresentaram EM enriquecidos em polifenóis totais. Estes resultados sugerem que a extração sequencial para obtenção de extratos com polaridades diferentes poderá ser um recomendável processo para o setor industrial.

Quanto a capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH observou-se que os EAE para *Cedrela odorata* (folha e casca), *Dalbergia monetaria* (folha) e *Stryphnodendron barbatiman* (casca) apresentou maior capacidade antioxidante quando comparado aos demais extratos da mesma planta. As folhas de *Davilla kunthii* e *Davilla rugosa* tiveram EM com maior capacidade antioxidante, enquanto que para as demais espécies vegetais foi o EHM.

Gulluce et al. (2007) determinaram a capacidade antioxidante pelo método DPPH de óleos essenciais e extratos metanólicos de plantas e observaram que os extratos metanólicos apresentaram elevada capacidade antioxidante sendo maior que a do padrão antioxidante (BHT). Os autores citam que a presença de compostos fenólicos nestes extratos é que confere esta propriedade.

IV.3.2.2 Determinação da concentração mínima inibitória

A partir dos resultados obtidos de PT e atividade antibacteriana dos extratos brutos foram selecionados os extratos das folhas de *Byrsonima crassifolia* (alto teor em PT), de *Inga*

edulis (conteúdo intermediário em PT) e o ramo de *Stryphnodendron barbatiman* (baixo teor em PT) para determinação da CMI (Tabela 8).

Tabela 8. CMI (μg de ES.mL⁻¹ de solução) dos extratos com polaridades diferentes das espécies vegetais amazônicas.

Espécie Vegetal	Parte da planta	<i>B. cereus</i> [#]	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Folha						
EAE		200 ± 100 ^a	133 ± 58 ^a	267 ± 58 ^c	133 ± 58 ^b	93 ± 11 ^a	133 ± 58 ^a
EM		80 ± 17 ^a	100 ± 50 ^a	67 ± 6 ^a	67 ± 6 ^a	80 ± 17 ^a	75 ± 9 ^a
EHM		77 ± 23 ^a	120 ± 70 ^a	87 ± 6 ^b	87 ± 6 ^a	200 ± 100 ^a	87 ± 6 ^a
<i>Inga edulis</i>	Folha						
EAE		300 ± 100 ^c	300 ± 100 ^b	167 ± 58 ^b	433 ± 58 ^b	333 ± 58 ^b	317 ± 29 ^b
EM		133 ± 29 ^b	117 ± 29 ^a	67 ± 6 ^a	107 ± 40 ^a	97 ± 6 ^a	53 ± 6 ^a
EHM		53 ± 35 ^a	1333 ± 115 ^c	193 ± 101 ^b	200 ± 100 ^a	533 ± 153 ^b	300 ± 173 ^b
<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Ramo						
EAE		400 ± 141 ^b	250 ± 71 ^b	50 ± 14 ^a	250 ± 71 ^b	350 ± 70 ^b	250 ± 71 ^b
EM		65 ± 7 ^a	85 ± 21 ^a	65 ± 7 ^b	125 ± 35 ^a	90 ± 14 ^a	55 ± 7 ^a
EHM		65 ± 7 ^a	1450 ± 71 ^c	400 ± 141 ^c	300 ± 141 ^a	950 ± 71 ^c	600 ± 141 ^c
Amoxicilina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		17 ± 6	37 ± 6	37 ± 6	33 ± 6	17 ± 6	17 ± 6

Valores referentes à média ± desvio padrão (DP);# Resultados das médias expressos em $\mu\text{gFrS.mL}^{-1}$ de solução; os níveis de CMI usados foram: CMI > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (inativo); CMI = 500 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (fraco); CMI = 100 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (moderadamente ativo) e CMI < 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (ativo).; valores marcados pela mesma letra nas colunas da mesma espécie vegetal não são significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Os extratos (EAE, EM e EHM) apresentaram menor CMI que os extratos brutos, indicando que pode ocorrer uma interação negativa entre os compostos influenciando na CMI das bactérias em estudo.

Para as folhas de *Byrsonima crassifolia*, os extratos EM e EHM foram ativos para todas as cepas bacterianas, enquanto que para *Inga edulis* (folha) e *Stryphnodendron barbatiman* (ramo) o EM foi considerado ativo para as cepas em estudo. Enquanto que o EAE de *Byrsonima crassifolia* (folha) e *Stryphnodendron barbatiman* (ramo) foram ativos para *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

De maneira geral o extrato metanólico apresentou a menor CMI para todas as cepas bacterianas. Estes resultados confirmam o previsto em alguns estudos que o metanol é o melhor solvente para extração de substâncias antimicrobianas a partir de materiais vegetais quando comparado a outros solventes, tais como água, etanol e hexano (AHMAD et al, 1998; ELOFF, 1998; LIN et al, 1999). Assim, a fração metanólica das espécies vegetais amazônicas em estudo possui compostos com propriedades antibacteriana e antioxidante que devem ser identificados e que podem ser destinados a diversas aplicações industriais.

Como as bactérias apresentam morfologia diferente, a quantidade de extrato utilizada para inibi-las também será diferente. Isso pode ser observado, por exemplo, nos EHM de *Inga edulis* e *Stryphnodendron barbatiman* que são ativos para *B. cereus* e inativos (CMI > 1000µg.mL⁻¹) para *E. faecalis*. Neste contexto, os extratos (EAE, EM e EHM) das folhas de *Byrsonima crassifolia* destacam-se por serem considerados ativos para todas as cepas bacterianas em estudo.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos ao CUD (Bélgica), FAPESPA (Brasil) e CAPES (Brasil) pelo suporte financeiro.

REFERENCIAS

- Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammad, F (1998). Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 62, 183–193.
- Botterweck, A.A.M., Verhagen, H., Goldbohm, R.A., Kleinjans, J., Brandt, P.A.V (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. *Food Chemistry and Toxicology*, 38, 599-605.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28, 25–30.
- Braz-Filho, R (1999). 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*, 71, 1663-1672.
- Campos, F. M., Couto, J. A.,; Hogg, T. A. (2003). Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 167–174.
- Celiktas, O. Y., Kocabas, E. E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100, 553-559.
- Cheyrier, V (2005). Polyphenols in food are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223-229.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (2006). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 19 ed, 26(1), USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*. M07-A8, v. 29, 8th ed.
- Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M.V., Arzedi, E., Palmas, F (1999). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 130–135.
- Cowan, M.M (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Review*, 12, 64-582.
- Dahanukar, S.A., Kulkarni, R.A., Rege, N.N (2000). Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian Journal Pharmacology*, 32, 81–118.
- Decker, E.A (2008). Antioxidant Mechanisms. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. 3^a Ed. Boca Raton, FL – USA: CRC Press. 475-492.

- Eloff, J.N (1998). Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 1–8.
- Forsythe, S.J (2002). *Microbiologia da segurança alimentar*. Porto Alegre: Artmed.
- Gulluce, M.; Sahin, M.; Sokmen, M.; Ozer, H. Daferera, D.; Sokmen, A (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*, 103, 1446-1456, 2007.
- Harbone, J. B., Willians, C. A (2000). Advances in flavonoid research since. 1992. *Phytochemistry*, 55, 481-504.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P (2002). *Memorial Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 1027.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Nigam, P. S., Sarker, S. D., Moore, J. E., Rao, J. R., Mazumdar A (2011). Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. *Food Science and Technology*, 44, 1199-1206.
- Julkunen-Tiitto, R (1985). *Journal Agricultural Food Chemistry*, 33, 213.
- Kamel, C., Hafedh, H., Tarek, Z., Amel, B.K.N., Mahmoud, R., Kacem, M., Amina, B (2007). The chemical composition and Biological activity of Clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L Myrtaceae): a short Review. *Phytotherapy Research*, 21, 501–506.
- Lin, J., Opoku, A.R., Geheeb-Keller, M., Hutchings, A.D., Terblanche, S.E., Jager, A.K., Van Staden, J (1999). Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 68, 267–274.
- Milovanovic, V., Radulovic, N., Todorovic, Z., Stankovic, M., Stojanovic, G. (2007). Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five serbian equisetum species. *Plant Foods for Human Nutrition*, 62, 113e119.
- Montejano, H. A.; Gervaldo, M.; Bertolotti, S. G (2005). The excited states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by *p*- benzoquinones in polar solvents. *Dyes and Pigments*, 64, 117-124.
- Newman, D.J., Cragg, G.M (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461-77.
- Palombo, E. A.; Semple, S. J (2001). Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 151-157.
- Pellegrini, N.; Colombi, B.; Salvatore, S.; Brenna, O.V.; Salvatore, S.; Brenna, O.V.; Galaverna, G.; Del RIO, D.; Bianchi, M.; Bennet, R.N.; Brighenti (2007). 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*, 87, 103-111.

- Pompeu, D.; Silva, E.; Rogez, H (2009). Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*, 100, 6076-6082.
- Pozo-Insfran, D., Brenes, C.H., Talcott, S.T (2004). Phytochemical composition and pigment stability of açai. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1539-1545.
- Pranshanth, D., Asha, M. K., Amit, A (2001). Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*, 72, 171-173.
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.-C., Bailleul, F., Trotin, F (2000). *Journal Ethnopharmacology*, 72.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., Landorelle, Y (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.
- Singleton, V.L, Orthofer, R., Lamuela, R.M (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means Folin- Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzimology*, 299, 152-178.
- Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., Arsenakis, M (1995). Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2384-2388.
- Souza, J. N. S., Silva, E. M., Loir, A., Rees, J. F., Rogez, H., Larondelle, Y (2008). Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. *Food Chemistry*, 106, 331-339.
- Taguri, T.; Tanaka, T.; Kouno, I (2004). Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 27, 1965-1969.
- Yunes, R.A.; Pedrosa, R.C.; Cechinel Filho, V (2001). Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, 24, 147-152.
- Wu, X., Gu, L., Holden, J., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Beecher, G., et al. (2004). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 407-422.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES GERAIS

A extração sequencial aplicada neste trabalho possibilitou a obtenção de extratos brutos com elevado conteúdo em composto fenólico. Destacando-se, as folhas de *Byrsonima crassifolia* e o extrato bruto obtido da casca de *Stryphnodendron barbatiman* que apresentaram elevado teor em polifenóis totais quando comparada com as demais espécies vegetais e seus extratos.

O conteúdo em flavonóis totais e em proantocianidinas totais representou 17 e 8% do teor em polifenóis totais, respectivamente. Conclui-se então que esses extratos são constituídos também por outros compostos fenólicos como as flavononas, flavonas, ácidos fenólicos, entre outros.

A capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC indicou que os extratos brutos apresentam essa propriedade, com destaque para o extrato obtido das folhas de *Byrsonima crassifolia*.

Para a atividade antibacteriana determinada pelo método de difusão em disco, os extratos foram padronizados a 50mM de ECat.mL⁻¹ de solução e a esta concentração alguns extratos, como os de *Acmella oleracea*, *Annona montana*, *Croton cajucara*, *Solanum juripeba*, *Stryphnodendron barbatiman* (folha) e *Tabernaemontana angulata*, não apresentaram halo de inibição contra as bactérias em estudo. No entanto, não podemos concluir que estes extratos não são agentes antimicrobianos, pois fatores como a concentração do extrato e o tipo de cepa bacteriana influenciam no resultado do teste. Enquanto que os extratos das folhas de *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis*, *Phyllanthus niruri* e os ramos de *Stryphnodendron barbatiman* apresentaram nesta concentração amplo espectro de ação por inibirem bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A concentração mínima inibitória dos extratos brutos indicou que os mesmos são moderadamente ativos, exceto os extratos das folhas de *Byrsonima crassifolia* que são ativos para *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *S. typhi* e o extrato de *Connarus perrotetti* (folha) e *Cedrela odorata* (casca) é ativo para *B. cereus* e *E. faecalis*.

O extrato bruto das folhas de *Byrsonima crassifolia* apresentou destaque devido ao alto conteúdo em compostos fenólicos, elevada capacidade antioxidante e amplo espectro de ação bacteriano, e pode assim ser considerado como possível fonte de compostos para aplicações em alimentos.

Os extratos acetato de etila, metanólico e hidrometanólico das espécies vegetais selecionadas após a avaliação dos extratos brutos apresentaram enriquecimento no conteúdo em compostos fenólicos e assim uma elevada capacidade antioxidante determinada pelo método DPPH, com destaque para o extrato metanólico.

Foi determinada a concentração mínima inibitória dos extratos acetato de etila, metanólico e hidrometanólico das folhas de *Byrsonima crassifolia*, *Inga edulis* e ramo de *Stryphnodendron barbatiman* e os extratos metanólico e hidrometanólico destacaram-se por apresentar as menores concentrações para todas as bactérias estudadas, com exceção do extrato hidrometanólico de *Inga edulis* e *Stryphnodendron barbatiman* que são inativos para *E. faecalis*.

Assim, os extratos com polaridades diferentes das espécies vegetais amazônicas em estudo possuem compostos com propriedades antioxidante e antibacteriana que podem ser destinados a diversas aplicações industriais.

Por se tratar de um estudo inovador há poucas comparações possíveis dentro da literatura. Entretanto faz-se de extrema importância uma continuidade no estudo da metodologia e identificação do composto com tais propriedades, como o objetivo de aperfeiçoamento do processo.

Estudos posteriores poderão ser realizados para determinação a aplicação destes extratos em matrizes alimentares, em formulações cosméticas e sanitizantes, entre outros. No entanto, faz-se necessário estudar a toxicidade dos mesmos.