



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Atividade antimicrobiana de *Derris negrensis* Benth (Fabaceae)

Paulo Edson Santos da Silva

**Manaus-Amazonas
2011**

Paulo Edson Santos da Silva

Atividade antimicrobiana de *Derris negrensis* Benth (Fabaceae)

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação da Universidade do Estado do
Amazonas, para obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia e Recursos Naturais.**

Orientador: Prof. Dr. Wilson Castro Silva

Co-orientadora: Dra. Ormezinda C. Cristo Fernandes

**Manaus-Amazonas
2011**

DEDICATÓRIA

Este trabalho dedico:

A minha esposa Benaia Mady, e aos meus filhos
Leandro Mady, Fabrício Mady e Paulo Edson
Mady (*In memorian*).

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Deus, sempre, e em primeiro lugar;
- ✓ À Dr^a. Ormezinda Fernandes pela co-orientação, e por conceder o espaço físico do laboratório de micologia-ILMD;
- ✓ Ao Dr. Carlos Cleomir por conceder o espaço físico e estrutura para obtenção dos extratos-CPPN/INPA;
- ✓ Ao Dr. Newton Falcão da CPCA/INPA por conceder o espaço nesta coordenação para realização de alguns trabalhos;
- ✓ A Jozi da Silva, do Laboratório de Micologia/ILMD pela disposição e pela gentileza em me ajudar;
- ✓ A Michele Silva do Laboratório de Microbiologia/ILMD que cedeu as cepas-padrão utilizadas neste trabalho;
- ✓ Aos professores e funcionários do Programa de Mestrado em Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas;
- ✓ Aos meus pais, Pedro Rosa da Silva (*In memorian*), Elza Maria Santos da Silva e ao meu irmão Plínio Eudson;
- ✓ Aos colegas do curso de Mestrado: Cecília, Aaron, Andrey, Bruno, Eunice, Sandro, Douglas pela amizade ao longo desta jornada;
- ✓ A todos os colaboradores do Instituto Leônidas & Maria Deane que durante esses meses participaram direta e indiretamente para a realização do referido trabalho.

“Uma coletânea de pensamentos deve ser uma farmácia
onde se encontre remédios para todos os males”

Voltaire

RESUMO

Os vegetais são excelentes fontes de matéria prima em busca de novas drogas, tendo-se em vista a sua diversidade de moléculas. O aumento de infecções e o aparecimento de resistência microbiana reforçam essa pesquisa. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de *Derris negrensis* Benth (Fabaceae). O extrato aquoso de caule e raiz de *D. negrensis* foi obtido pelo método de maceração, e submetido à avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar-técnica do poço para os micro-organismos *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E.coli*. As atividades fungicida e bactericida foram analisadas utilizando placas de Petri devidamente preparadas com meio de cultura específico para cada micro-organismo. Os extratos foram preparados nas concentrações de 300, 400 e 500mg/mL. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi feita através do método de microdiluição em placa, frente aos micro-organismos: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E.coli*. Foram realizadas cromatografia em camada delgada (CCD) e bioautografia. Os resultados revelaram presença de atividade antimicrobiana no extrato da raiz para todas as bactérias testadas, sendo mais eficaz para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. No método da CIM, os extratos foram capazes de inibir o crescimento microbiano nas concentrações que variaram de 300 a 75mg/mL. Foi possível observar que o extrato da raiz proporcionou melhor atividade antimicrobiana em relação ao extrato do caule no método de difusão ágar técnica do poço. Substâncias com características de alcalóides, terpenos e compostos fenólicos foram observadas na CCD. Os resultados deste trabalho constituem uma alternativa no combate aos micro-organismos resistentes a antibióticos e possibilita a descoberta de novos constituintes químicos derivados de produtos naturais, a fim de minimizar a resistência microbiana. Sugere-se a continuação de estudos complementares no sentido de isolar as substâncias responsáveis por esta atividade e a realização de testes toxicológicos para viabilizar a sua utilização.

Palavras chaves: Timborana, atividade antimicrobiana, extratos vegetais, *Derris negrensis*.

ABSTRACT

The vegetables are excellent matter sources it excels in search of new drugs, is tended in view your diversity of molecules. The increase of infections and the emergence of microbial resistance reinforce that research. The present work had as objective evaluates the activity antimicrobial of *Derris negrensis* Benth (Fabaceae). The aqueous extract of stem and root of *D. negrensis* was obtained by the maceration method, and submitted to the evaluation of antimicrobial activity by the diffusion method in agar - technique of the well for the personal microorganisms: *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *E.coli*. The fungicide and bactericide activities were analyzed using plates of Petri properly prepared with middle of culture specific for each personal microorganism. The extract was prepared in the concentrations of: 300, 400 and 500mg/mL. The determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) it was done through the microdilution method in plate, front to the personal microorganisms: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* and *E.coli*. Chromatography were accomplished in thin layer (PC) and bioautography. The results revealed presence of antimicrobial activity in the extract of the root for all the tested bacterias, being more effective for the bacterias *S. aureus* and *P. aeruginosa*. In the method of MIC, the extracts were capable to inhibit the microbial growth in the concentrations that varied from 75 to 300mg/mL. It was possible to observe that the extract of the root provided better antimicrobial activity in relation to the extract of the stem in the method of diffusion technical agar of the well. Substances with characteristics of: alkaloids, terpens and composed phenolics they were observed in PC. The results of this work constitute an alternative in the combat to the resistant personal micro-organisms to antibiotic and it makes possible the new derived chemical representatives' of natural products discovery, in order to minimize the microbial resistance. The continuation of complemental studies is suggested in the sense of isolating the responsible substances for this activity and the accomplishment of toxicological tests to make possible your use.

Keywords: Timborana, antimicrobial activity, vegetable extracts, *Derris negrensis*.

LISTAS DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos micro-organismos, obtidos por meio da ação do extrato aquoso de raiz de <i>D. negrensis</i> , na concentração de 300 mg/mL, em 12 e 24 horas..... | 36 |
| Tabela 2 - Média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos micro-organismos, obtidos por meio da ação do extrato aquoso de raiz de <i>D. negrensis</i> , na concentração de 400 mg/mL, em 12 e 24 horas..... | 37 |
| Tabela 3 - Média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos micro-organismos, obtidos por meio da ação do extrato aquoso de raiz de <i>D. negrensis</i> , na concentração de 500 mg/mL, em 12 e 24 horas..... | 37 |
| Tabela 4 - Comparação da atividade antimicrobiana entre as concentrações de 300, 400 e 500mg/mL do extrato de raiz de <i>D. negrensis</i> para cada micro-organismo avaliado, no tempo de 12 horas..... | 39 |
| Tabela 5 - Comparação da atividade antimicrobiana entre as concentrações de 300, 400 e 500mg/mL do extrato de raiz de <i>D. negrensis</i> para cada micro-organismo avaliado, no tempo de 24 horas..... | 39 |
| Tabela 6 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima obtidos pelo método de microdiluição..... | 45 |
| Tabela 7 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima obtidos pelo método de microdiluição | 46 |
| Tabela 8 - Resultados da Concentração Bactericida Mínima para o extrato da raiz..... | 47 |
| Tabela 9 - Resultados da Concentração Bactericida Mínima para o extrato do caule..... | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esqueleto básico de algumas classes de flavonóides com função de pigmentação na planta..... | 6 |
| Figura 2 - Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração..... | 8 |
| Figura 3 - Biossíntese dos diversos flavonóides..... | 9 |
| Figura 4 - Exsicata de <i>D. negrensis</i> | 12 |
| Figura 5 - Ramo de <i>D. negrensis</i> | 13 |
| Figura 6 - Ritidoma (caule): exsudação..... | 13 |
| Figura 7 - Diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas..... | 24 |
| Figura 8 - Raiz de <i>D. negrensis</i> | 28 |
| Figura 9 - Caule de <i>D. negrensis</i> | 28 |
| Figura 10 - Maceração e filtração..... | 29 |
| Figura 11 - Liofilização..... | 29 |
| Figura 12 - Teste da Concentração Inibitoria Mínima de raiz e caule para <i>S. aureus</i> em placa de microdiluição..... | 45 |
| Figura 13 – Concentração Bactericida Mínima de extrato de raiz para <i>P. aeruginosa</i> | 48 |
| Figura 14 - Cromatografia em camada delgada (CCD) revelada com a vanilina sulfúrica..... | 50 |
| Figura 15 - Cromatografia em camada delgada (CCD) revelada com cloreto férrico..... | 51 |
| Figura 16 - Cromatografia em camada delgada (CCD) com o revelador de Dragendorff..... | 51 |
| Figura 17 - Bioautografia do micro-organismo <i>S. aureus</i> | 52 |

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Média dos diâmetros dos halos de inibição utilizando as concentrações de 300, 400 e 500 mg/mL do extrato de caule de *D. negrensis* frente a *S. aureus*, no tempo de 12 e 24 horas.....40

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – micro-organismos utilizados para testes..... | 30 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| CDB | Convenção de Diversidade Biológica |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards |
| CBAM | Coleção de Bactérias da Amazônia |
| CFAM | Coleção de Fungos da Amazônia |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CBM | Concentração Bactericida Mínima |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CL₅₀ | Concentração Letal 50% |
| DL₅₀ | Dose Letal 50% |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| FB | Farmacopéia Brasileira |
| ILMD | Instituto Leônidas & Maria Deane |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina |
| MHA | Ágar Mueller Hinton |
| MF | MacFarland |
| MHB | Mueller Hinton Both |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogenase |
| PA | Para análise |
| TTC | Cloreto de trifetil-tetrazólio |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 OBJETIVOS..... | 4 |
| 2.1 Geral..... | 4 |
| 2.2 Específicos..... | 4 |
| 3 REVISÃO DA LITERATURA..... | 5 |
| 3.1 Descrição botânica da família Fabaceae..... | 5 |
| 3.1.1 Flavonóides..... | 6 |
| 3.1.2 Isoflavonóides..... | 7 |
| 3.1.3 Biossíntese..... | 8 |
| 3.2 TIMBÓ..... | 8 |
| 3.2.1 O gênero Derris..... | 12 |
| 3.2.2 Estudos fitoquímico e atividade biológica dos gêneros: <i>Derris</i>, <i>Lonchocarpus</i>, <i>Tefrosia</i> e <i>Poiretia</i>..... | 14 |
| 3.3 DOENÇAS INFECCIOSAS..... | 17 |
| 3.3.1 Micro-organismos..... | 18 |
| 3.3.1.1 Fungos..... | 18 |
| 3.3.1.2 Infecções fúngicas oportunistas..... | 20 |
| 3.3.3 Agentes antifúngicos..... | 21 |
| 3.3.2 Bactérias..... | 22 |
| 3.3.2.1 Bactérias gram-positivas..... | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3.2.2 Bactérias gram-negativas..... | 25 |
| 3.3.4 Agentes antibacterianos..... | 26 |
| 4 MATERIAL E METODO..... | 28 |
| 4.1.1 Coleta e identificação do material botânico..... | 28 |
| 4.1.2 Processamento do material botânico..... | 28 |
| 4.1.3 Obtenção do extrato..... | 29 |
| 4.1.4 Atividade antimicrobiana..... | 30 |
| 4.1.4.1 Obtenção dos micro-organismos..... | 30 |
| 4.1.4.2 Método de difusão em Ágar-técnica de poço..... | 30 |
| 4.1.4.3 Preparo do meio de cultura..... | 30 |
| 4.2 Preparo das soluções (extratos)..... | 31 |
| 4.3 Preparo do inóculo microbiano..... | 31 |
| 4.4 Controles utilizados..... | 31 |
| 4.5 Procedimento-atividade antimicrobiana..... | 31 |
| 4.5.1 Determinação da atividade antifúngica..... | 31 |
| 4.5.2 Determinação da atividade antibacteriana..... | 32 |
| 4.6 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) EM PLACA DE MICRODILUIÇÃO..... | 32 |
| 4.6.1 Preparo das soluções..... | 32 |
| 4.6.2 Preparo do inóculo microbiano..... | 33 |
| 4.6.3 Procedimento..... | 33 |
| 4.7 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 4.7.1 Procedimento..... | 33 |
| 4.8 ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)..... | 34 |
| 4.9 ANÁLISE QUALITATIVA POR BIOAUTOGRAFIA..... | 34 |
| 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 35 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de raiz e caule de <i>D. negrensis</i>..... | 36 |
| 5.2 Determinação da concentração inibitória mínima..... | 44 |
| 5.3 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD) | |
| 5.4 Análise qualitativa por bioautografia..... | 52 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 54 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 55 |

Ficha Catalográfica

| | |
|-------|--|
| S586p | Silva, Paulo Edson Santos da. Atividade antimicrobiana de <i>Derris negrensis</i> Benth (Fabaceae) / Paulo Edson Santos da Silva. -- Manaus : Universidade do Estado do Amazonas, 2011. 82 f. : il. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia - UEA, 2011. Orientador: Prof ^o . Dr. Wilson Castro da Silva. 1. Atividade antimicrobiana. 2. Estratos vegetais. 3. <i>Derris negrensis</i> . I. Título. CDU: 579.8 |
|-------|--|

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária Suziane Batista.

1 INTRODUÇÃO

Os vegetais são excelentes fontes de matéria prima na busca de novas drogas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química. A fantástica variedade e complexidade de metabólitos biossintetizados pelas plantas sofrem a influência dos estímulos ambientais, bastante variáveis, de naturezas química, física e biológica, sobre sua composição química, sintetizando moléculas de estruturas complexas e com grande diversidade de esqueletos e grupos químicos funcionais (Alves, 2005).

Os compostos de origem vegetal na medicina moderna são de grande importância, pois entre os anos de 1984 e 1994, dos medicamentos aprovados pelo Ministério da Saúde, 6% foram extraídos diretamente de espécies vegetais, 24% foram produzidos a partir de produtos derivados de vegetais e 9% foram desenvolvidos por meio de modelagem molecular de estruturas químicas de compostos vegetais que serviram como protótipos. Metade dos 25 medicamentos de maior utilização no mundo foi originada de metabólitos secundários de vegetais (Alves, 2005).

As plantas produzem dois tipos distintos de metabólitos: primário e secundário. Metabólitos primários são encontrados em todos os sistemas vivos e são essenciais ao crescimento e à vida da própria planta, como exemplo: os aminoácidos, monossacarídeos, ácidos carboxílicos etc. Os metabólitos secundários são produtos de metabolismo específico, resultantes de processos adaptativos e constituídos por uma variedade de substâncias bioativas. A produção de determinados metabólitos secundários pode ser característica restrita de certas plantas e são caracterizados por uma enorme diversidade química. Essas substâncias são de importância relevante nos mecanismos de defesa das plantas contra predadores (Botsaris & Machado, 1999; Lima, 2001) e o interesse científico por elas tem aumentado devido à busca por novos medicamentos oriundos de plantas (Sato et al., 2002; Paiva et al., 2003).

A pesquisa de novas substâncias com finalidade terapêutica pode ser executada por meio de vários processos. Os mais utilizados são a síntese de novas moléculas, a modificação molecular de substâncias naturais, bem como extração, isolamento e purificação de novos compostos de origem vegetal, a qual se caracteriza como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamentos (Brito et al., 1993).

As pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas, ou de aprimorar fitoterápicos já existentes, vêm reassumindo papel importante. Menos de 10% de

espécies de plantas no mundo foram investigadas com o objetivo de descobrir propriedades terapêuticas. Podem ser pesquisadas não somente plantas empregadas diretamente na terapêutica, mas também aquelas que possam constituir matéria prima ou fornecer intermediários para a fabricação de fármacos sintéticos (Ferreira et al., 1998; Sixel & Pecinalli, 2002).

O farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam isolou em 1804, a morfina, que inspirou a descoberta posterior dos derivados 4-fenil-piperidínicos como uma nova classe de hipoanalésicos de emprego mais efetivo e seguro. Esta simplificação molecular permitiu posterior otimização e a melhor compreensão do mecanismo de ação analgésica deste alcalóide, originalmente isolado de *Papaver somniferum* (Barreiro & Manssour, 2008).

Segundo estimativa da Convenção de Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15% e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior país do planeta em número de espécies endêmicas. A biodiversidade do Brasil não é totalmente conhecida devido à sua complexidade, mas estima-se que existam 55.000 espécies catalogadas, num total estimado entre 350.000 e 550.000 (Toledo, 2002; Barreiro, 2009).

Os estudos com plantas no Brasil estão se intensificando, devido à necessidade da busca de novos agentes antimicrobianos para combater a resistência dos micro-organismos frente à automedicação, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), antitumorais, entre outros fatores. Considerando a evolução de genes bacterianos resistentes a antibióticos, extratos originários de plantas têm se tornado objeto de estudo das indústrias farmacêuticas. O interesse por compostos naturais está crescendo significativamente, e um dos fatores é o grande número de efeitos adversos causados pelos medicamentos sintéticos (Ferreira et al., 1998; Lima, 2001; Amorim et al., 2003; Turolla & Nascimento, 2006).

Embora existam diversas publicações sobre os usos tradicional e farmacêutico de espécies de plantas encontradas no Brasil, ainda há poucos estudos científicos sobre propriedades tóxicas e farmacológicas de plantas. Existem, também, poucos exemplos da descoberta de substâncias bioativas, o qual serviu como protótipo para o desenvolvimento de agentes fitoterapêuticos e farmacêuticos. Várias substâncias ativas, presentes em extratos de plantas nativas, ainda não foram identificadas; então essa é uma área que precisa ser explorada. Como exemplos de produtos derivados de plantas comercializados no Brasil podemos citar Ierobina®, cujo uso é indicado para tratamento de indigestão, e o agente fitoterapêutico anti-inflamatório Acheflan® (Botion et al., 2005; Fenner et al., 2006; Moreira et al., 2006; Giorgetti et al., 2007).

A Amazônia é a maior floresta tropical no mundo. Ela ocupa quase metade do continente sul-americano e é um centro de diversidade biológica, ao lado da sua importância no equilíbrio ecológico global. Essa região é uma fonte rica de espécies para agricultura, plantas domésticas e aplicações medicinais. Aproximadamente 125.000 espécies de plantas estão na floresta tropical, a qual continua a ser um bom reservatório para a descoberta de moléculas bioativas e agentes fitoterápicos. Entretanto, apenas 1% do potencial farmacológico de todas as espécies de plantas tropicais estudadas foi avaliado (Montanari & Bolzani, 2001; Gurib-Fakim, 2006).

Plantas nativas da Amazônia foram pouco pesquisadas e não existem estimativas do número de espécies que foram estudadas ou têm aplicação para a saúde humana. O uso da flora dessa região tem sido modesto em relação a seu valor estratégico no desenvolvimento de produtos locais. Além disso, pesquisas, na região, de plantas com potencial larvicida e inseticida, propriedades citotóxicas e atividades antimicrobianas têm sido pouco investigadas (Quignard et al., 2004; Pohlit et al., 2004).

Os extratos vegetais são uma alternativa para a descoberta de um novo produto com alto potencial antimicrobiano. Em face disso, e da necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos, no sentido de minimizar os problemas relacionados à resistência microbiana, foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato de *Derris negrensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato aquoso de *Derris negrensis* Benth.

2.2 Específicos

- Avaliar a propriedade antimicrobiana do extrato aquoso de caule e raiz de *D. negrensis*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos micro-organismos;
- Analisar, por cromatografia em camada delgada (CCD), as características dos grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos;
- Avaliar por bioautografia, a atividade antimicrobiana.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Descrição botânica da família Fabaceae

A família Fabaceae é a segunda maior entre as dicotiledôneas, composta por 740 gêneros e mais de 16.000 espécies mundialmente distribuídas, desde florestas tropicais até desertos quentes (Ribeiro et al., 1999; Wink et al., 2003).

Está subdividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Papilionoideae, as quais são consideradas famílias independentes por alguns taxonomistas. A subfamília Papilionoideae é considerada a mais evoluída e mais amplamente distribuída dentre as três, sendo facilmente diferenciada do grupo pelos caracteres vegetativos, florais e frutíferos (Ribeiro et al., 1999; Dutra et al., 2005).

A importância econômica da família Fabaceae é grande, pois apresenta vasta variedade de espécies alimentícias, além de fornecer madeira de boa qualidade, ração para animais, látex, resinas, matéria-prima na fabricação de tintas, inseticidas, drogas medicinais no seu estado bruto (*Dioclea megacarpa*, *Vatairea paraensis* e *Dipteryx punctata*) e árvores ornamentais. As espécies mais conhecidas empregadas como fontes alimentícias são: o grão-de-bico (*Cicer arietinum*), ervilha (*Pisum sativum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), lentilha (*Lens culvaris*) e a soja (*Glycine max*) (Sannomiya, 1994; Ribeiro et al., 1999).

A maioria das espécies pertencentes a essa família possui uma característica comum, que é a presença de nódulos nas raízes contendo bactérias do gênero *Rhizobium*, as quais são capazes de captar nitrogênio atmosférico e convertê-lo em outros compostos nitrogenados. Por esta razão, um grande número de leguminosas é adaptada à habitats áridos ou semidesérticos, além de algumas espécies da subfamília Papilionoideae como *Trifolium repens*, *Medicago sativa* serem utilizadas como fertilizantes (Sannomiya, 1994; Wink et al., 2003).

Uma grande variedade de metabólitos secundários é produzida por plantas da família Fabaceae, tais como alcalóides, aminoácidos não proteicos, amins, fenilpropanóides, flavonóides, isoflavonóides, antraquinonas, di-, sesqui- e tri-terpenos. Entre essas classes de substâncias, destacam-se os flavonóides, devido à frequência e diversidade de esqueletos que são encontrados nas três subfamílias. Deste modo, como são produtos naturais encontrados em quase todas as subfamílias de Fabaceae estudadas, são de importância taxonômica restrita apenas a essa família (Wink et al., 2003).

Na família Fabaceae, a ocorrência de flavonóides resulta no uso etnobotânico das espécies, como tintura, inseticidas e drogas medicinais; à quimiotaxonomia, os quais podem

ser utilizados na determinação de parentesco de híbridos e de novos cultivares; e funções quimioecológicas, como defesa da planta contra herbívoros ou agentes patológicos e atração de polinizadores (Hegnauer et al., 1993).

3.2 Flavonóides

Os flavonóides são uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico. Eles são um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável. As variações das estruturas resultam na diversidade de classes de flavonóides encontrados na natureza, como: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavanal, flavanonóis, antocianidinas, chalconas entre outros (Behling et al., 2004).

A diversidade desses metabólitos secundários contribui para importantes funções nos vegetais e apresentam diversas atividades biológicas. Nos vegetais, que produzem flores e frutos, são fontes de pigmentos para sua coloração, componentes importantes para o armazenamento químico da planta contra insetos, fungos, vírus, bactérias, antioxidantes, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos, inibidores de enzimas. Fornecem elementos importantes na proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível (Salisbury & Ross, 1991; Harbone & Williams, 2002; Rije et al., 2006).

As chalconas e auronas (Figura 1) são grupos de flavonóides encontrados geralmente nas mesmas plantas, sendo responsáveis pela coloração amarela, enquanto as colorações escarlate, laranja, rosa, azul e violeta derivam das antocianidinas (Figura 1), substâncias constituídas de sais flavílicos solúveis em água, também encontradas em outros órgãos das plantas como raízes e folhas. Esses pigmentos têm como uma das mais importantes funções, a de atrair polinizadores e dispersores de sementes, resultando na disseminação de espécies vegetais por meio da interação entre plantas e animais. Também são responsáveis pela atividade inibidora do crescimento de larvas de alguns insetos (Dewick, 2001; Schenkel et al., 2004; Raven et al., 2007).

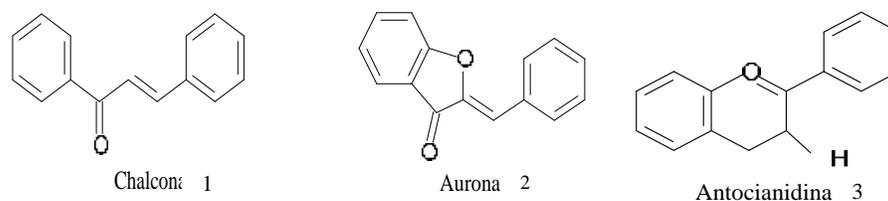


Figura 1 - Esqueleto básico de algumas classes de flavonóides com função de pigmentação na planta (Harbone et al., 2002)

3.3 Isoflavonóides

Os isoflavonóides são caracterizados, como os demais flavonóides, por uma cadeia arila-C3-arila, mas do tipo difenil-1,2-propano. Em contraste com outras classes de flavonóides, os isoflavonóides têm um determinado limite de distribuição taxonômica e sua ocorrência é exclusiva da família Fabaceae (Schijlen et al., 2004; Simões et al., 2004). Estes metabólitos secundários apresentam uma diversidade estrutural importante, como as isoflavonas, isoflavenos e aril-3-cumarinas; e também estruturas cíclicas como os pterocarpanos, cumestanos, cumaronocromonas, sendo que alguns possuem um carbono suplementar (rotenóides). Nos vegetais, a maioria destas substâncias comporta-se como fitoalexinas, como os pterocarpanos, faseolina e medicarpina, cujos componentes são produzidos pela planta como defesa contra agentes patogênicos, como vírus, fungos e bactérias (Salisbury & Ross, 1991; Firmino, 1998). Na natureza, a ocorrência de isoflavonas é maior que a de isoflavanona.

Os rotenóides não possuem uma nomenclatura sistemática e são conhecidos frequentemente por nomes triviais. Podem ser divididos em rotenóides, 12a-hidróxi-rotenóides e di-hidrorotenóides. A maior parte dos rotenóides possui um substituinte isoprenila. Os pterocarpanos representam a maior classe de isoflavonóides, depois das isoflavonas. Apresentam um núcleo tetracíclico derivado do núcleo fundamental das isoflavonas (Simões et al., 2004).

Flavonóides têm apresentado uma série de propriedades benéficas ao metabolismo do nosso organismo. Entre as propriedades, podem-se citar as atividades antialérgicas, antivirais e fungicidas. As atividades anticâncer, anti-inflamatórias e a redução de risco de doenças cardiovasculares têm sido atribuídas às propriedades antioxidantes que estão relacionadas à prevenção da peroxidação lipídica da membrana celular e com a proteção de substâncias de importante papel fisiológico, como a vitamina C e a adrenalina (Cushine & Lamb, 2005; Magalhães et al., 2007). Os flavonóides com maior importância terapêutica são os derivados de flavonas. Eles são bem absorvidos por via digestiva e sua toxicidade é baixa (Boltsaris & Machado, 1999).

Muitos flavonóides, quando introduzidos no organismo humano, são capazes de alterar sua fisiologia, isto é, possuem atividade farmacológica. Por isso eles são de interesse medicinal, podendo exercer efeitos medicinais ou tóxicos, dependendo da quantidade introduzida no organismo humano (Lopes & Rosso, 2010).

3.4 Biossíntese

Os flavonóides podem ser encontrados em diversas formas estruturais que, em comum, possuem 15 átomos de carbono em seu esqueleto básico, arranjados na forma $C_6-C_3-C_6$ que corresponde a dois anéis aromáticos (A e B) interligados por uma cadeia de três átomos de carbonos entre si, que podem vir ou não dar origem a um terceiro anel benzopirano ou cromano (C), de cinco ou seis membros entre os anéis aromáticos (A e B) (Figura 2) Pietta, 2000; Costa, 2002;Behling et al., 2004).

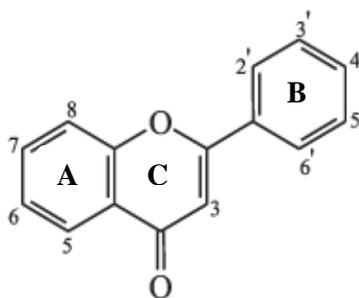


Figura 2 - Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração (Simões et al., 2004)

São conhecidos mais de 4.200 flavonóides diferentes, sendo que o número de novas estruturas identificadas praticamente dobrou nos últimos vinte anos. Os flavonóides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares, também conhecido como heterosídeo (Simões et al., 2004).

A rota biossintética dos flavonóides apresenta a singularidade de seus anéis aromáticos serem formados de rotas metabólicas distintas: chiquimato e acetato. Estes anéis são originados de uma via biossintética mista, onde através de uma sequência de reações de condensação, mediados por enzimas, três moléculas de malonil CoA derivadas da via do acetato são condensadas juntamente com uma molécula de 4-hidroxicoumaril-CoA, derivada da via do chiquimato. As unidades oriundas da via do acetato dão origem ao anel A enquanto a unidade proveniente da via do chiquimato dá origem ao anel B e aos três átomos de carbono que intreligam os anéis A e B. A ciclização resultando na formação do anel A produz a chalcona que se equilibra com a flavanona correspondente. Os outros tipos de flavonóides são formados por subseqüentes etapas de óxi-redução deste intermediário comum (Figura 3) (Salisbury & Ross, 1991; Andersen et al., 2006).

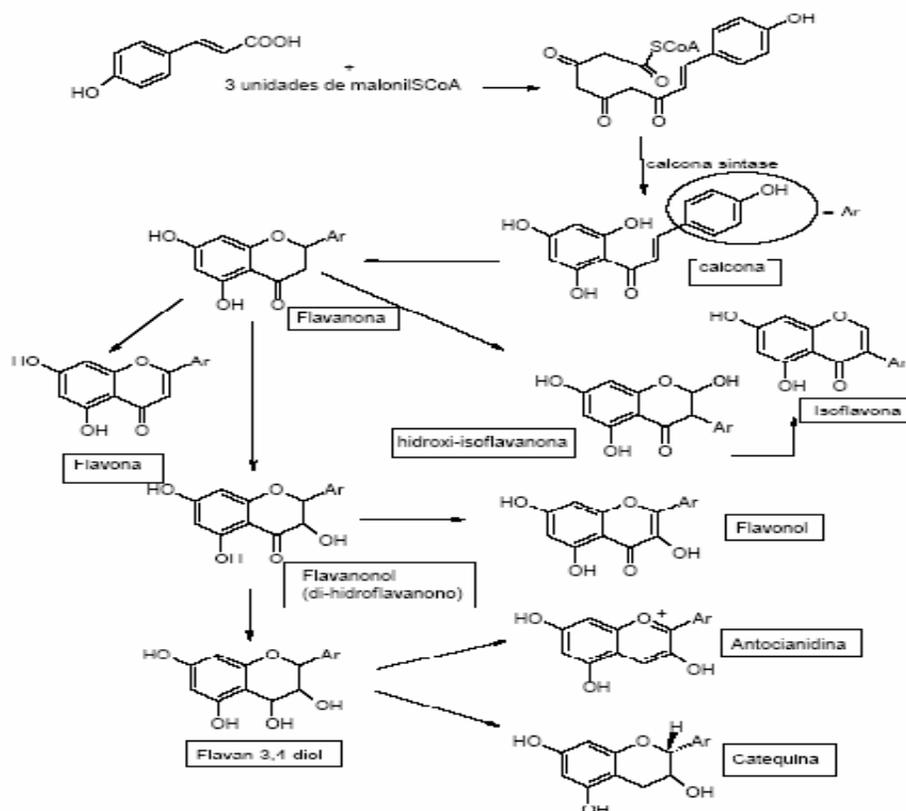


Figura 3 - Biossíntese dos diversos flavonóides (Simões et al., 2004)

A flavanona é formada pela síntese de adição, no qual o grupo hidroxílico age como nucleófilo e ataca a cetona α,β -insaturada, sendo o intermediário biossintético da maioria das classes de flavonóides. Em alguns casos, tem sido mostrado por meio de estudos de incorporação de precursores, que os flavonóides são biossintetizados a partir da chalcona. Após a formação deste metabólito secundário, uma série de reações enzimáticas envolvendo oxidações, reduções e alquilações originam os mais distintos esqueletos de flavonóides. As diversas classes de flavonóides diferem principalmente no nível de oxidação e no padrão de substituição dos anéis A e B (Schentel et al., 2004).

O padrão de hidroxilação do esqueleto básico dos flavonóides, geralmente, ocorre nas posições 5, 7 e 4. Entretanto, podem ocorrer modificações, como perda do grupo OH da posição 5, cujo processo é realizado pela enzima redutase, a qual, quando atua simultaneamente com a enzima chalcona-sintase, promove a redução deste grupo, antes da formação do primeiro flavonóide na via biossintética. Estas alterações são uma das principais características dos flavonóides (Hegnauer et al., 1993; Dewick, 2001).

Nas espécies da família Fabaceae, a grande diversidade estrutural de flavonóides ocorre devido a quatro fatores: 1) introdução de grupos hidroxílicos nas posições 6, 8 e 2 dos anéis A e B, respectivamente, no esqueleto básico, o qual geralmente apresenta um padrão de substituição 5, 7 e 4 -triidroxi; 2) perda do grupo hidroxila na posição 5, como citado anteriormente; 3) metilação de grupos hidroxílicos ou formação de grupos metileno dióxidos; 4) inserção de grupo C-alquílicos, tais como metil e especialmente grupos C-prenil, os quais podem sofrer diversas modificações, resultando em anéis de cinco ou seis membros (Hegnauer & Grayer-Barkmeyer, 1993; Kaufman et al., 1999).

Os grupos prenila são derivados da via do mevalonato e flavonóides prenilados; ocorrem quase que exclusivamente na subfamília Papilionoideae da família Fabaceae (Dewick, 2001).

As reações de ciclização do C-prenila ocorrem por ataque nucleofílico do grupo hidroxila ao epóxido, inicialmente formado pela oxidação da ligação dupla deste grupo alquílico. Dependendo da orientação do ataque nucleofílico, o produto será um anel de cinco membros: o furano. O anel furano dissubstituído é biossinteticamente formado pela ação da enzima mono-oxigenase citocromo P450 dependente, que utiliza os cofatores NADPH e oxigênio molecular para clivagem do grupo hidroxil-isopropila, cujo fragmento é liberado em forma de acetona. Nesta etapa não ocorre a formação de nenhum intermediário hidroxilado e o processo é iniciado por um mecanismo via radicalar (Dewick, 2001).

Algumas classes de flavonóides, como chalconas, di-hidrochalconas e flavanonas, tendem a ser encontradas na sua forma livre, ou seja, não associadas às moléculas de açúcares, altamente metilados e prenilados nas raízes, caule e sementes de espécies de plantas das famílias Fabaceae, Rutaceae, Compositae, enquanto estruturas mais simples e glicosiladas são encontradas em folhas, flores e frutos de espécies destas famílias (Hegnauer & Grayer-Barkmeyer, 1993; Boltsaris & Machado, 1999).

Os flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, nos caules ou ramos, raízes ou frutos. Os mesmos compostos ainda podem ocorrer em diferentes concentrações, dependendo do órgão vegetal em que se encontram (Simões et al., 2004).

Segundo Simões et al. (2004), o interesse econômico pelos flavonóides é decorrente de suas diferentes propriedades, como, por exemplo, o fato de alguns apresentarem cor e poderem ser usados como pigmento. Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica, resultado de algumas propriedades atribuídas a alguns representantes da classe.

3.5 Timbó

Timbó ou tingui é a designação popular atribuída, em todo o Brasil, a um grande número de plantas empregadas por populações primitivas na pesca pelo envenenamento. A prática de tinguijar, deixar no rio ou lago, a planta previamente esmagada, remonta a tempos pré-colombianos, onde foi adotada pelos caboclos e índios da Amazônia nas pescarias, sendo empregada até os dias atuais. Esmagada na água, os peixes começam a boiar e podem ser facilmente apanhados com a mão. Deixados na água, recuperam-se, podendo ser consumidos sem inconveniente. A planta era também usada, em algumas tribos, no preparo de veneno de flechas (Lima, 1987; Schvartsman, 1992; Razzini & Mors, 1995).

Segundo Heizer (1986), o uso de venenos vegetais de pesca é provavelmente um velho e arraigado hábito cultural. Seu uso estende-se para algumas regiões da América Central até o norte do México e em algumas regiões da América do Norte (Leste do Mississipi e Califórnia). Estima-se que no mundo, cerca de 140 espécies são utilizadas como veneno de pesca, com aproximadamente 340 nomes.

A pesca com timbó ocorre geralmente nas estações de águas baixas, quando a diluição do veneno na água é maior. Este método consiste basicamente em introduzir o ictiotóxico a partir de um determinado ponto do rio ou igarapé, a fim de coletar os peixes entorpecidos. Aparentemente não deixam resíduos tóxicos nos peixes, sendo apropriados para consumo humano, sem maiores tratamentos. Os princípios ativos destes venenos podem ser divididos em oito grupos: rotenona, os saponáceos, glucosídeos cardíacos, alcalóides, terpenos, taninos, compostos cianogênicos e ictioterol (Acevedo-Rodriguez, 1990).

O nome timbó serve para designar numerosas plantas pertencentes a diversas famílias botânicas, principalmente Sapindaceae e Fabaceae, as quais apresentam propriedades ictiotóxicas e contêm, em quantidades variáveis, o alcalóide timboína, o qual é um notável analgésico empregado sob a forma de tintura alcoólica ou extrato fluido contra nevralgias crônicas e insônias (Corrêa, 1984). Na medicina tradicional tailandesa, é utilizado como expectorante, antitussígeno e antidiarréico (Tiangburanathan, 1996), tendo sido relatada atividade imunoestimulante (Sriwanthana e Chavalittumrong, 2001) e atividade anti-inflamatória (Laupattarakassem et al., 2004).

Os timbós encontrados na Amazônia brasileira são plantas do gênero *Derris*, que vem se destacando pela produção de compostos pertencentes às classes dos rotenóides, os quais apresentam ação antibacteriana (Bearez, 1998; Arruda, 2005; Borges et al., 2006).

Ao longo do tempo, plantas tóxicas foram consideradas de modo muito diverso. Em épocas remotas, e também neste século, em algumas regiões, plantas tóxicas exercem papel importante para prover alimentação por meio do uso de veneno de flechas na caça ou veneno para peixes. Mais recentemente, no início do século XX, plantas tóxicas começaram a despertar interesse de pesquisadores por possuírem substâncias bioativas, capazes de propiciar modelos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos (Simões et al., 2004).

3.6 O gênero *Derris*

Os timbós verdadeiros, plantas pertencentes ao gênero *Derris*, compreendem várias espécies, tais como: *Derris negrensis*, *Derris urucu*, *Derris nicou* e *Derris elliptica*. É um cipó trepador originário do Brasil, encontrado nas matas da Amazônia. É revestido de uma substância pegajosa e possui raízes com extensas ramificações. Suas flores são pequenas, assumindo a forma de espigas e as folhas têm folíolos ovais (Aragão & Vale, 1973; Martins, 1989).

A espécie *D. negrensis* pertence à subfamília Papilionoideae (Figuras 4 e 5). É uma liana lenhosa, com caule cilíndrico, casca marrom claro, rígida, com lenticelas salientes e elípticas e desprendimento puerulento, exsudação vermelha (Figura 6). Suas folhas são subquinadas ovais ou oblongas acuminadas, com base arredondada, coriáceas, glabras em cima, embaixo com pêlos esparsos pequenos, racemos com muitas flores, femigíneos tomentosos, pedicelos fasciculados. Os folíolos são coriáceos e elípticos, ocasional. Conhecida popularmente como timborana, É encontrada em áreas de vertentes e baixios na bacia do Rio Negro (Le Cointe, 1947; Corrêa, 1984; Ribeiro et al., 1999).

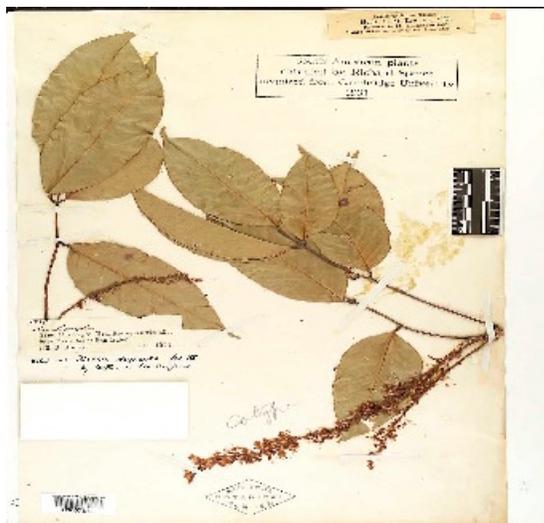


Figura 4 - Exsicata de *D. negrensis* (Fonte: <http://www.nybg.org/>)



Figura 5 - Ramo de *D. negrensis*. Foto: Silva, P.E.S., 2009.



Figura 6 - *Ritidoma* (caule): exsudação. Foto: Silva, P.E.S., 2009.

Papilionoideae é a maior das três subfamílias da família Fabaceae. Tem distribuição bastante ampla nas zonas tropicais, subtropicais, estendendo-se às regiões temperadas, mas sua maior diversidade encontra-se nos trópicos americanos e africanos. Algumas espécies são utilizadas por apresentarem importantes propriedades medicinais como levodopa, usado no tratamento do mal de Parkinson, pitiríases, sarnas e no tratamento de pneumonia (Martins, 1989; Ribeiro et al., 1999).

3.7 Estudo fitoquímico e atividade biológica de plantas dos gêneros *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tefrosia* e *Poiretia*

A rotenona é o constituinte ativo de várias espécies de plantas leguminosas dos gêneros *Lonchocarpus* e *Derris*, popularmente conhecidas como “tuba” na Malásia, “cube” no Peru e timbó no Brasil (Corbett, 1940). Os gêneros *Lonchocarpus* e *Derris* abrangem espécies produtoras de diversos tipos de substâncias fenólicas, como por exemplo, estilbenos, chalconas, flavanonas, isoflavonas e rotenonas (Magalhães et al., 2000).

Maia & Vasconcelos (1976), realizando estudos fitoquímicos, cromatográficos, espectrométricos e de ressonância magnética com *Derris negrensis*, identificaram a presença de 28,5% de rotenona e de-hidrórtenona. A rotenona foi encontrada na proporção de 3% a 11% na planta *Lonchocarpus nicou* (Gomes, 1946).

Nas leguminosas dos gêneros *Derris* e *Tefrosia*, o princípio ativo mais importante é a rotenona. Entretanto, são encontrados outros flavonóides de estruturas semelhantes, englobados pela designação geral de rotenóides. São insolúveis em água, e provavelmente, as

saponinas que os acompanham promovem sua suspensão no meio, ajudando a exercer a sua função tóxica (Razzini & Mors, 1995).

Os flavonóides ocorrem principalmente nas famílias Rutaceae, Compositae e Fabaceae. As ações farmacológicas comuns dos flavonóides são anti-inflamatórias, estabilizadoras do endotélio vascular e cardiocirculatória. Entre as ações farmacológicas comuns, apresentadas pela saponina, estão as atividades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Botsaris & Machado, 1999).

Os principais componentes do gênero *Tefrosia*, encontrados nas folhas e ramos tenros, são: tefrosina, rotenona, deguelina e toxicarol. A tefrosina mostrou ser o princípio tóxico mais potente sobre os peixes (Schvartsman, 1992). Rotenona e rotenóides são substâncias ictiotóxicas e inseticidas, encontradas em espécies de *Derris*, *Tefrosia* e outras plantas da família Fabaceae (Geissman, 1962).

Nas espécies *Derris urucu* e *Derris nicou*, são encontrados nas suas raízes, os metabólitos secundários rotenona e rotenóides isoflavonóicos, entre os quais se destacam a deguelina, tefrosina e toxicarol (Lima, 1987).

Mascaro et al. (1998) utilizaram pó de raízes de *Derris* spp. e observaram valores de DL₅₀ em três espécies de peixes, filogeneticamente diferentes, nas concentrações de 2,6µg/mL para *Collosoma macropomum* (tambaqui) 4,8µg/mL para *Oreochromis niloticus* (tilápia) 14,2µg/mL para *Plecostomus* sp (cascudo) e 100,0mg/kg para *Rattus norvegicus* (rato), sugerindo a menor susceptibilidade dos mamíferos em relação aos peixes, possivelmente devido a fatores fármaco-cinéticos que se relacionam com as diferentes barreiras teciduais gástricas, encontradas pelos rotenóides, quando administrados por via oral, em mamíferos.

Costa et al. (1997), a partir de ensaios com dosagem crescente, avaliaram o efeito do pó da raiz de duas espécies de timbó: *D. urucu* e *D. nicou* sobre populações de larvas de duas linhagens de *Musca domestica*, proveniente de duas localidades do Estado de São Paulo: Jaboticabal (jab) e Brodósqui (bro). Os resultados mostraram que *D. urucu* foi mais eficiente no controle das moscas das duas linhagens, pois com o tratamento de 0,7g de pó de raiz, as populações jab e bro atingiram percentagem de mortalidade maior que 80%, enquanto o mesmo tratamento com *D. nicou* controlou cerca de 10% da linhagem jab e nas populações de moscas da linhagem bro não ocorreram reações negativas aparentes no número de moscas emergidas.

A suspensão aquosa de extrato etanólico de raiz de *D. urucu* foi avaliada quanto à sua atividade em larvas de quarto estágio de *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae). A curva

exponencial para DL_{50} nas concentrações de 17,6 μ g/mL, 33,32 μ g/mL, 55,4 μ g/mL e 83,68 μ g/mL, após 24 horas de tratamento, mostrou que o extrato foi mais efetivo na concentração de 17,6 μ g/mL. No entanto, a concentração de 150 μ g/mL, após 4 horas, causou completa destruição da membrana peritrófica das larvas (Gusmão et al., 2002).

O extrato aquoso de *Derris amazonica*, contendo 3,7% de rotenona, foi tóxico para *Cerotoma arcuatus*, via ingestão de folhas tratadas ($DL_{50} = 15,14 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$). A aplicação tópica ($CL_{50} = 1,44 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) induziu a mortalidade de insetos, superior a 80% (Alécio, 2007).

Ao avaliar a aplicação tópica dos extratos aquoso e alcoólico de raiz de *Lonchocarpus floribundus* (timbó) sobre *Toxoptera citricidus* Kirkaldy, nas concentrações de 5mg/mL, 10mg/mL, 20mg/mL, 30mg/mL e 40mg/mL, Corrêa (2006) constatou que as concentrações de 30mg/mL e 40mg/mL apresentaram maior taxa de mortalidade para os dois extratos testados. Ressaltando que as concentrações de 5mg/mL do extrato etanólico e 10 mg/mL do extrato aquoso, controlaram mais de 50% dos indivíduos.

Costa Júnior et al. (2002) avaliaram a eficiência de rotenóides extraídos *D. urucu* em teleóginas do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Foram testadas cinco diferentes concentrações (1,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0mg/mL) utilizando como solvente a água destilada. Os rotenóides extraídos do timbó mostraram-se eficazes nas concentrações de 7,5mg/mL e 10,0 mg/mL, controlando a reprodução dos ácaros em 92,40% e 97,85% respectivamente.

Santos et al. (2007) verificaram a atividade alelopática dos extratos etanólicos de folhas e raízes de *D. urucu* e *D. nicou*, sobre duas plantas invasoras de pastagem: *Mimosa pudica* (malícia) e *Senna obtusifolia* (mata-pasto) e observaram que os extratos de folhas das espécies avaliadas inibiram a germinação de sementes de *M. pudica*, acima de 40%, enquanto, os extratos de raízes inibiram abaixo de 28%. Para a espécie *S. obtusifolia*, os extratos de folhas das *Derris* avaliadas inibiram a germinação das sementes entre 40% e 45% e os extratos de raízes entre 22% e 26%.

O estudo fitoquímico de *Tefrosia toxicaria* permitiu o isolamento e a identificação das flavanonas (iso-obovatina e obovatina) e dos rotenóides (6a,12a-desidro- β -toxicarol, 6a,12a-desidro- α -toxicarol e α -toxicarol). Dentre os extratos das raízes testados com larvas de *Aedes aegypti*, verificou-se que as frações hexano e clorofórmio apresentaram alto potencial larvicida, estimando $CL_{50} = 23,99 \text{ ppm}$ e $CL_{50} = 13,80 \text{ ppm}$ respectivamente (Vasconcelos et al., 2009).

Braz Filho et al. (1980) avaliaram fitoquimicamente o extrato de éter de petróleo de raízes da espécie *Lonchocarpus longifolius*. Os autores identificaram o isoflavonóide rotenona e os rotenóides 12a-hidroxirotenona, 6a e 12a-deshidrorotenona, deguelina e 12a-hidroxi deguelina (tefrosina).

O extrato etanólico de um cipó de uma espécie do gênero *Derris*, coletado na estrada de Xapuri, no Estado do Acre, foi analisado fitoquimicamente por Zoghbi et al. (1988), os quais identificaram a presença do isoflavonóide cumestrol e do triterpeno α -amirina. Segundo os autores, plantas deste gênero se caracterizam por apresentarem, nas suas composições químicas, flavonóides e isoflavonóides e, entre estes, destacam-se os rotenóides.

Em estudos realizados, a fim de avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de raízes da espécie *Lonchocarpus montanus*, Magalhães et al. (2007) verificaram que os extratos foram ativos contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Cladosporium cladosporioides*, *Fusarium oxysporium* e *Rhizopus oryzae*.

Ganapaty et al. (2006), utilizando a técnica cromatográfica, isolaram de *Derris heyneana*, quatro flavonóides: heyneana chalcona, lupinifalin, hiravarone e derrubone, e verificaram que heyneana chalcona apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Bacillus pumilis*.

Os compostos jayacanol, mundulinol, mundulin e minimiflorin, isolados de raízes de *Lonchocarpus oaxacensis* por Alavez-Solano et al. (2000), foram analisados quanto à atividade antifúngica contra o fungo da madeira *Postia placenta*. Verificou-se que somente o jayacanol apresentou atividade antifúngica.

Araújo (2002) avaliou o efeito fungitóxico de rotenona e 12a-hidroxirotenona, isoladas de extrato hexânico de *Poirertia bahiana*, verificando que foram efetivos contra esporos de fungos fitopatogênicos da espécie *Cladosporium sphaerospermum*.

Os metabólitos secundários derricina e lonchocarpina, isolados do extrato hexânico de raízes de *Lonchocarpus sericeus*, apresentaram atividade citotóxica contra células leucêmicas (Cunha et al., 2003). Em estudos farmacológicos realizados por Fontenele et al. (2005), demonstraram *in vitro* atividade antiplaquetária.

O isoflavonóide pumilanol, o flavonóide tephriinone, rotenona, lupeol e estigmasterol foram isolados da raiz de *Tephrosia pumila*. O isoflavonóide apresentou inibição contra os protozoários do gênero *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium* em estudo *in vitro* (Pannakal et al., 2008).

A partir de estudos fitoquímicos das folhas e galhos de *Poiretia bahiana* (Fabaceae), após a extração com hexano, foram isoladas seis isoflavonas, duas rotenonas, uma mistura contendo os triterpenos lupeol e β -amirina, os esteróides estigmasterol e sitosterol. Os extratos foram submetidos a bioensaios e apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*. Foram inativos contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Penicillium notatum*. A citotoxicidade foi determinada contra *Artemia salina*, apresentando uma CL_{50} de 459,03mg/mL (Araújo, 2009).

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de rotenóides, Inácio et al. (2007) realizaram bioensaios de letalidade com larvas de *Artemia salina*. O extrato etanólico obtido de raízes de *D. urucu*, submetido ao teste de letalidade frente às larvas de *A. salina*, apresentou DL_{50} de 108 ppm (a DL_{50} menor ou igual a 1000 ppm é considerada ativa). Os extratos das cascas das raízes de *Lonchocarpus filipes* mostraram-se fortemente ativos no ensaio de toxicidade sobre *A. salina*, podendo essa atividade ser correlacionada com atividade antitumoral e/ou inseticida (Santos et al., 2009).

3.8 Doenças infecciosas

As doenças infecciosas são a principal causa de morte no mundo. Elas contribuem com os altos índices de morbidade e mortalidade nas populações dos países em desenvolvimento desde tempos remotos (Coura & Castro, 2002; Tortora, 2005).

As infecções incluem a presença e multiplicação de micro-organismos, tais como bactérias e fungos em um hospedeiro vivo, com estimulação de uma resposta evidente, podendo ser localizada ou generalizada (Koneman et al., 2001).

As infecções bacterianas atingem o hospedeiro a partir de um reservatório externo, por meio de diversas vias de transmissão, tais como: contato direto, alimento, água, solo, poeira, dentre outros. O agente patogênico reside no próprio corpo do hospedeiro, podendo ou não pertencer à microbiota normal, causando doença quando ocorre um favorecimento nas condições do hospedeiro pelo uso de antibióticos, procedimentos cirúrgicos, ocorrência de carcinomas ou diabetes e imunossupressão (Lacerda & Egry, 1997). Os patógenos mais frequentes isolados em hospitais brasileiros são *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Sader et al., 2001).

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas tornaram-se importantes causas de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Vários fatores

contribuem para a prevalência e dificuldade de controle dessas infecções, como o aumento do número de procedimentos invasivos, pela utilização de cateteres, ventilação mecânica, diálises, entre outros (Miranda et al., 2003; Mundim et al., 2003).

As condições que facilitam a proliferação de leveduras do gênero *Candida* são: menor grau de defesa, geralmente, em crianças e idosos, gravidez, uso de anticoncepcionais, diabetes, terapia com antibióticos, corticóides e citostáticos, uso de coletores urinários ou intravenosos de demora (Jawetz et al., 1998; Cowen et al., 2002; Sampaio & Rivitti, 2007).

A resistência do hospedeiro à infecção causada por este gênero de fungo é devida a mediadores imunes e não imunes, entre estes, a presença de fatores inibidores no soro e, entre os imunes, os linfócitos T e a função fagocitária dos neutrófilos. Anticorpos têm pouco valor na defesa do hospedeiro (Sampaio & Rivitti, 2007).

3.9 Micro-organismos

3.9.1 Fungos

Os fungos são um grupo diverso de organismos eucariotos, saprofíticos, heterotróficos, não sintetizam clorofila nem qualquer pigmento fotossintético. Em sua maioria são aeróbios obrigatórios, micrófilos, uni ou pluricelulares, com parede celular composta de um modo geral, por quitina, glucanas, mananas, proteínas, lipídeos, além de polissacarídeos, e requerem fontes orgânicas de carbono pré-formado para o crescimento (Trabulsi et al., 1999).

Estudos citoquímicos demonstraram que cada camada possui um polissacarídeo dominante. As camadas mais internas (8 e 5) contêm beta 1-3 glucanas e mananas, enquanto as camadas mais externas contêm mananas e beta 1-6 glucanas. A primeira e a terceira camadas são mais ricas em mananas (Trabulsi et al., 1999).

As glucanas nas células fúngicas são normalmente polímeros de D-glicose, ligados por meio de pontes betaglicosídicas. As mananas, polímeros de manose, representam o material amorfo da parede. A quitina é o principal componente estrutural da parede celular fúngica. Os lipídios estão presentes como compostos polares e apolares. Os principais lipídios apolares são os triacilgliceróis e os esteróis, e os polares são os diacilglicerofosfolinas e diacilglicerolaminas (Trabulsi et al., 2008).

Outro componente da célula fúngica é a membrana plasmática, que atua como uma barreira semipermeável nos transportes ativo e passivo, para dentro e para fora da célula, sendo constituída de uma porção hidrofóbica e uma hidrofílica. As membranas das células dos

fungos possuem em sua constituição química esteróis, que são encontrados nas células bacterianas (Schaechter et al., 2002).

A nutrição dá-se por absorção. São obrigados a viver em estado de saprofitismo, parasitismo ou mutualismo. Reproduzem-se por brotamento ou esporulação. Os esporos podem ser gerados tanto sexuada como assexuadamente (Strohl et al., 2004; Trabulsi et al., 2008).

Os fungos são capazes de se desenvolverem sobre a superfície de outros organismos superiores como plantas e animais, ou até mesmo viver em seu interior. Ao estudar o habitat dos fungos, é importante considerar que diferentes fatores ambientais, como temperatura, pH, disponibilidade de água e oxigênio afetam diretamente seu crescimento (Esposito & Azevedo, 2004).

Os fungos patogênicos podem ser divididos com base na forma de crescimento ou conforme o tipo de infecção produzida. De acordo com a micose causada, podem ser divididos em micoses superficial ou profunda e, de acordo com a forma de crescimento, são classificados em filamentosos ou leveduriformes (Lacaz et al., 1991).

As morfologias do gênero *Candida* em geral apresentam-se em abundantes aglomerados de filamentos micelianos e blastósporos, dimorfismo característico das infecções por *Candida* (Lacaz et al., 1991). Os blastósporos aparecem como estruturas arredondadas ou ovaladas, diâmetro variando em torno de 4µm, podendo ocorrer gemulação inicial. Quando no interior de lesões dos tecidos, são facilmente confundidos com neutrófilos. O micélio é usualmente longo, de espessura variável com numerosas constrições. Podem-se observar septações a curtos intervalos, conferindo à hifa aspecto característico, bem como numerosas ramificações (pseudomicélio) (Lacaz, 1980; Jawetz et al., 1998).

Segundo MacGinnis (1964), 14 espécies de fungos do gênero *Candida* são consideradas de interesse médico, como: *C. albicans*, *C. stelladoidea*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. humicola*, *C. vini*, *C. viswanathii*, *C. zeylanoides*, *C. rugosa*, *C. curvata* e *C. norvegensis*.

3.9.1.1 Infecções fúngicas oportunistas

Diversos fungos, presentes no meio ambiente ou integrantes da flora normal, podem, em determinadas situações, passarem de saprófitos a patogênicos, provocando quadros clínicos variáveis, desde processos febris benignos a septicemias, algumas vezes fatais (Lacaz et al., 1991).

Dentre as principais patologias fúngicas oportunistas destacam-se a candidíase, aspergilose, criptococose e fusariose. Candidíases ou candidose são infecções provocadas por leveduras do gênero *Candida*, principalmente, *C. albicans*. A maior parte das infecções é de origem endógena, ou seja, são causadas por micro-organismos que fazem parte da microbiota normal do ser humano. A transmissão exógena ocorre, principalmente, em pacientes debilitados pelo tratamento com antibióticos e drogas imunossupressoras, e no transcurso de doenças crônicas (Strohl et al., 2004; Sampaio & Rivitti, 2007; Abbas et al., 2008).

As enzimas proteolíticas secretadas por *C. albicans*, assim como outras espécies desse gênero, podem degradar, destruir ou transformar constituintes da membrana celular do hospedeiro, induzindo a uma disfunção ou destruição física. As enzimas proteolíticas têm a função unicamente de digerir as proteínas do hospedeiro, promovendo uma fonte de nitrogênio para a célula parasitária e contribuindo para a adesão e invasão dos tecidos do hospedeiro (Hube & Naglik, 2001).

As candidíases podem ser superficiais ou profundas, com localização cutânea, mucosa, mucocutânea, visceral ou sistêmica. Na candidíase mucocutânea, os tecidos das mucosas oral e vaginal são mais atingidos. A candidíase cutânea envolve as áreas intertriginosas da pele das mãos, virilha e axilas. Na candidíase sistêmica, o fungo pode invadir diversos órgãos causando candidíase pulmonar, endocardite, fungemia e nefrite (Sidrim & Moreira, 1999; Sampaio & Rivitti, 2007).

O agente etiológico mais comum da candidíase, em ambiente hospitalar, é *C. albicans*, mas outras espécies têm sido também identificadas nos últimos anos, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. guilhermondii*, *C. lusitaniae*, as quais se destacam em todo o mundo, inclusive no Brasil (Fuchs et al., 2004; Trabulsi et al., 2008).

3.9.1.2 Agentes antifúngicos

Durante as últimas décadas, as micoses passaram a ser uma das principais causas de morte em pacientes imunocomprometidos. Devido principalmente às infecções como a AIDS, quimioterapia cancerígena e transplante, houve um aumento das infecções fúngicas em humanos. Infecções fúngicas produzidas por agentes que eventualmente apresentam baixa virulência e podem ser letais (Zacchino et al., 2003).

Com o aumento das infecções fúngicas, aumenta também a necessidade de novos agentes antifúngicos. Os antifúngicos existentes no mercado possuem limitações terapêuticas, principalmente quando se leva em consideração os efeitos colaterais (Tavares, 1996).

Grande quantidade de fármacos obtidos por meio da síntese orgânica tem sido utilizada no tratamento de infecções micóticas, como os antissépticos à base de tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina). Além desses, utilizam-se também antifúngicos, como os azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol e fluconazol) e anfotericina B. Porém as infecções fúngicas são de difícil tratamento devido à elevada resistência da *Candida* à ação de alguns antifúngicos (Araujo et al., 2004).

Os agentes antifúngicos, atualmente utilizados, apresentam, na sua grande maioria, uma ação fungistática ou fungicida, fato este que proporciona o aparecimento de cepas resistentes, sem contar que são dotados de outras limitações terapêuticas, sobretudo no que se refere à possibilidade do desenvolvimento de efeitos colaterais como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Rang & Dale, 1997; Zacchino et al., 2003).

Os agentes antifúngicos podem ser divididos em duas categorias: drogas que afetam a membrana celular e drogas que atuam intracelularmente, interrompendo processos celulares vitais, como síntese de DNA, RNA ou proteínas (Fuchs et al., 2004).

Como exemplo de drogas que afetam a membrana celular podem ser citados os derivados poliênicos e imidazólicos. Estas substâncias combinam-se com esteróis da membrana, rompendo a mesma ou tornando-a incapaz de efetuar suas funções normalmente (permeabilidade e transporte). A droga forma um poro na membrana e o centro hidrófilo da molécula cria um canal iônico transmembrana. Podem ocorrer alterações na permeabilidade celular e causar a perda de constituintes essenciais das células, como potássio, açúcares, proteínas, fosfatos inorgânicos, ácidos carboxílicos e ésteres de fosfato (Rang & Dale, 1997; Trabulsi et al., 1999).

A terapia de imunossupressão tem se tornado crescente e comum, e como o uso de antibióticos de amplo espectro ser frequente, *Candida* spp. tem assumido um papel de grande importância entre os patógenos hospitalares e somente foi superada pelos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp e *Enterococos* como causa de infecção na corrente sanguínea (Henry, 1999), sendo de grande interesse por serem responsáveis por quadros de candidemias nos hospitais, estimando-se entre 10% a 12% suas ocorrências sobre todas as infecções (Trabulsi et al., 2008).

Devido à ocorrência de cepas resistentes ou mais adaptadas aos antifúngicos existentes, há uma necessidade mundial no desenvolvimento de novas pesquisas destinadas à investigação de agentes antifúngicos que atuem de forma mais seletiva contra a célula fúngica, sem, contudo, interferir em nenhum sistema bioquímico da célula do hospedeiro (Sartori, 2005; Botelho et al., 2007).

3.9.2 Bactérias

Bactérias são células procarióticas unicelulares com organização celular relativamente simples. Apresentam tamanhos em média de 1 a 2 μ m por 1 a 4 μ m, com membrana citoplasmática sem esteróides, apresentando cadeias de peptidoglicanos que vão influenciar na forma da bactéria dependendo do tamanho destas cadeias e da quantidade de interligações existentes entre os peptidoglicanos. Suas membranas nucleares estão ausentes e o ácido desoxirribonucléico (DNA) é uma macromolécula em forma de dupla fita circular, com comprimento de aproximadamente 1.100 μ m, altamente empacotado e os ribossomos 70S estão distribuídos no citoplasma. Podem ser autotróficas (fotossintéticas ou quimiossintéticas) ou heterotróficas (saprófitas e parasitas) (Trabulsi et al., 1999).

A manutenção da forma bacteriana (bacilo, coco etc.) é devido à presença da parede celular bacteriana. Além disso, a parede desempenha um papel importante na divisão celular como primer para sua própria biossíntese, dando origem ao septo que separa as duas novas células oriundas da divisão celular. Na maioria das bactérias, a parede celular deve a sua rigidez a uma substância somente encontrada em procariotos e que recebe diferentes denominações como mureína, peptidoglicano, mucopeptídeo (Trabulsi et al., 2008).

De acordo com a constituição da parede, as bactérias podem ser divididas em dois grandes grupos: Gram-negativas e Gram-positivas. As diferenças entre esses dois grupos residem principalmente nas suas propriedades de permeabilidade e nos componentes de superfície. As principais diferenças reveladas pela coloração de Gram estão relacionadas à presença de uma membrana externa nas bactérias Gram-negativas e de uma espessa camada de peptidoglicano nas bactérias Gram-positivas (Tortora et al., 2005; Trabulsi et al., 2008).

As paredes das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas apresentam diferenças marcantes (Figura 7). As bactérias Gram-negativas possuem uma parede composta de várias camadas que diferem na sua composição química e, conseqüentemente, é mais complexa que

a parede das Gram-positivas, que apesar de mais espessa, apresenta predominantemente 90% de peptidoglicanos (Jawetz et al., 1998; Tortora et al., 2005).

As bactérias Gram-positivas protegem sua membrana citoplasmática com uma parede celular espessa. As muitas camadas de peptidoglicanos impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido à presença de açúcares e aminoácidos. A parede celular das bactérias Gram-negativas é formada por uma ou poucas camadas de peptidoglicano e por uma membrana externa. Como a maioria das membranas biológicas, a membrana externa das bactérias Gram-negativas é formada por dupla camada lipídica: uma camada interna composta de fosfolípídeos e uma externa contendo lipopolissacarídeos e proteínas. O seu interior possui características hidrofóbicas devido aos ácidos graxos e a parte polissacarídica externa constitui um ambiente hidrofílico. A membrana externa constitui uma barreira adicional à entrada de algumas substâncias como antibióticos (Trabulsi et al., 1999; Strohl et al., 2004).

O sistema de dupla membrana das bactérias Gram-negativas origina um espaçamento. O espaço que separa a membrana citoplasmática da membrana externa é chamado de espaço periplasmático, sendo o mesmo composto por uma camada de peptidoglicano e um gel constituído por vários elementos. Nesse espaço podem-se encontrar algumas enzimas capazes de inativar fármacos tornando a célula resistente a eles, como as beta-lactamases (Fuchs et al., 2004; Trabulsi et al., 2008).

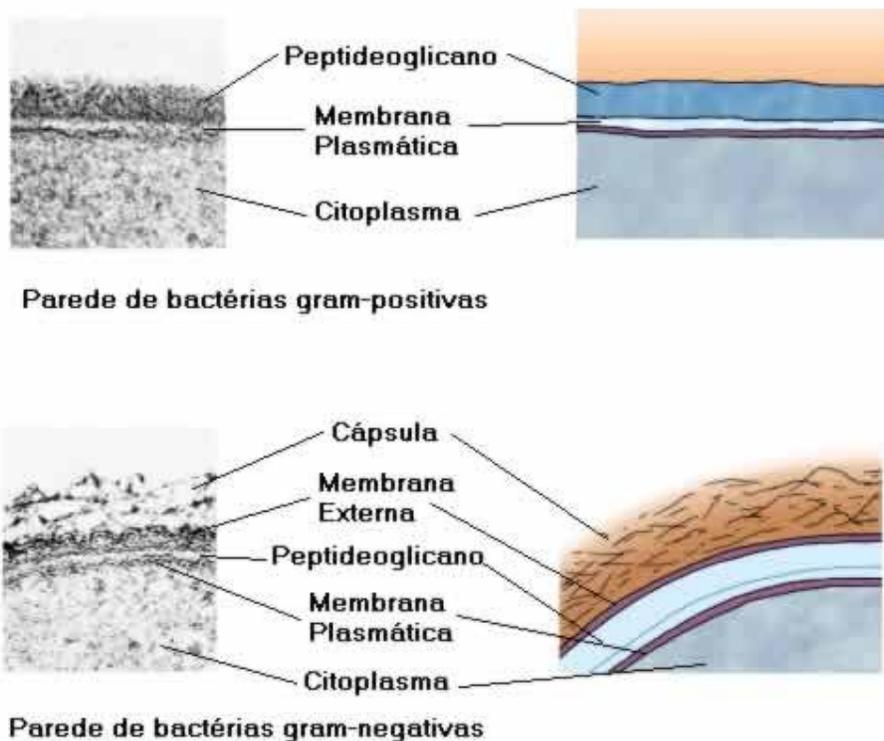


Figura 7 - Diferenças estruturais entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Fonte: <http://www.ufmt.br/bionet/bact.htm>)

3.9.2.1 Bactérias Gram-positivas

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são patógenos humanos e de outros mamíferos, O *S. aureus* é uma bactéria bastante comum e causadora de diversos tipos de infecções. A gravidade da infecção vai desde uma intoxicação alimentar ou infecção cutânea de pouca importância, até infecções graves potencialmente fatais. Quando as infecções estão localizadas na pele, podem causar furúnculos, conjuntivites, impetigos, feridas infeccionadas, foliculites, pústulas ou abscessos profundos, osteomielites, endocardites, flebites, mastites e meningites. São também associadas às infecções relacionadas a cateteres, bem como com dispositivos cardiovasculares e válvulas cardíacas (Henry, 1999).

As principais doenças associadas aos estreptococos ocorrem, principalmente, no trato respiratório, corrente sanguínea ou na pele. Os estreptococos do grupo B são líderes em septicemias neonatais e meningites. Os índices de mortalidade em recém-nascidos são de 8%,

mas em pré-maturos podem chegar a 30%. Nas doenças em neonatos, com até seis dias de vida, a transmissão ocorre, na maioria das vezes, verticalmente (mãe/filho(a)) (Strohl, 2004).

A maioria dos membros do gênero *Bacillus* é constituída por micro-organismos saprófitos que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação. Podem desenvolver-se em alimentos e produzir uma enterotoxina ou uma toxina emética, causando intoxicação alimentar. Algumas vezes estes micro-organismos podem produzir patologias em seres humanos imunocomprometidos (meningites, endocardites, conjuntivite, gastroenterite aguda (Jawetz et al., 1998).

As infecções hospitalares ou nosocomiais causadas por bactérias gram-positivas, representam um motivo de preocupação, pois as mesmas são as principais causas de complicações para a saúde de pacientes hospitalizados, aumentando a mortalidade entre eles, ocasionando um grave problema médico-social (Villas Boas, 2005).

3.9.2.2 Bactérias Gram-negativas

As manifestações clínicas das infecções causadas por *Escherichia coli* dependem do local da infecção, do tipo da cepa e do sítio de ação. É a causa mais comum de infecção do trato urinário, sendo responsável por cerca de 90% das primeiras infecções das vias urinárias em mulheres jovens (Schaechter et al., 2002).

Algumas cepas patogênicas de *E.coli* podem provocar diarreia. Essas cepas são classificadas pelas suas propriedades de virulência, e cada grupo provoca diarreia por meio de um mecanismo diferente. Quando as defesas normais do hospedeiro não estão adequadas, a *E. coli* pode atingir a corrente sanguínea e provocar sepse. *E.coli* e os estreptococos do grupo B constituem as principais causas de meningites em lactentes (Trabulsi et al., 1999).

Pseudomonas aeruginosa é um tipicamente oportunista, que pode causar as mais variadas patologias, como infecções localizadas, que ocorrem em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras. Infecções urinárias podem estar associadas ao uso de cateteres, pneumonias associadas ao uso de respiradores, entre outras. Pode ser encontrada nos hospitais, e sua elevada frequência nesse ambiente pode ser explicada pela elevada resistência a antibióticos e antissépticos leves (Moura et al., 2002).

Klebsiella pneumoniae causa uma pneumonia lombar necrotizante em indivíduos comprometidos por alcoolismo, diabetes ou doença pulmonar obstrutiva crônica. Também

causa infecções do trato urinário e bacteremia, especialmente em pacientes hospitalizados (Strohl et al., 2004).

Espécies de *Enterobacter* raramente são agentes primários de infecção. Frequentemente são isoladas de diferentes espécimes clínicos, de pacientes hospitalizados. Vários casos de bacteremias, decorrentes de aplicação endovenosa de líquidos contaminados, têm sido descritos (Trabulsi et al., 1999).

3.9.2.3 Agentes antibacterianos

A vida em comum entre o homem e os micro-organismos se perde na sombra do tempo, e, certamente, desde a pré-história estes provocam doenças ao homem. Porém as causas dessas doenças somente foram descobertas séculos atrás, a partir de 1878, graças aos trabalhos de Pasteur e Koch, que demonstraram a origem infecciosa de várias enfermidades do homem e animais (Tavares, 1996).

Os produtos do metabolismo natural de fungos actinomicetos ou bactérias, que são capazes de impedir o crescimento ou destruir micro-organismos, denominam-se antibióticos. Embora a maioria dos agentes antimicrobianos seja derivada de produtos naturais de fermentação, grande parte deles é modificada quimicamente a fim de aprimorar as propriedades antimicrobianas ou farmacológicas (Mims et al., 1999).

No início do século XX surgiram os primeiros quimioterápicos de ação sistêmica. As descobertas de Ehrlich e seus contemporâneos revolucionaram a terapêutica e provocaram o desenvolvimento da pesquisa e da indústria químico-farmacêutica, objetivando a obtenção de novas substâncias medicamentosas sintetizadas em laboratório (De Souza et al., 2003).

O maior conhecimento dos métodos laboratoriais permitiu também o estudo das plantas com propriedades terapêuticas, procurando-se isolar seus princípios ativos. O planejamento dessas pesquisas conduziu à descoberta das primeiras substâncias que, utilizadas em doses adequadas, eram capazes de destruir os micro-organismos sem destruir a vida humana (Tavares, 1996).

Uma das primeiras substâncias antimicrobianas, oriunda de plantas, foi a quinina, obtida de uma árvore chamada chinchona, existente no Peru, utilizada na terapêutica da malária. Outra substância também isolada de planta foi a emetina utilizada contra amebíase e a ipecacuanha utilizada no tratamento de diarreia (Botsaris & Machado, 1999).

Os primeiros agentes anti-infecciosos importantes não eram verdadeiros antibióticos, mas sim, antimetabólicos sintéticos, como o prontossil, que *in vivo*, é metabolizado a sulfonamida. A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico de utilidade clínica por Alexander Fleming, deu início à era da antibioticoterapia (Tavares, 1996).

A partir do desenvolvimento das sulfanamidas, na década de 1930, da penicilina e estreptomicina, em 1940, novas classes de agentes antibacterianos foram desenvolvidas, como a tetraciclina, quinolona e aminoglicosídeos. Várias doenças estão sendo combatidas por meio de uma moderna terapia antimicrobiana que reduziu acentuadamente a taxa de morbidade e de mortalidade humana (Fuchs et al., 2004).

Agentes antimicrobianos são, via de regra, classificados como sendo específicos ou inespecíficos. Os específicos atuam, principalmente, sobre micro-organismos invasores, sem afetar significativamente o hospedeiro. Os antimicrobianos inespecíficos, ou seja, compostos capazes de, *in vitro*, matar ou inibir o crescimento de qualquer micro-organismo, não são considerados quimioterápicos, e sim desinfetantes, antissépticos, germicidas, biocidas, esterilizantes, sanitizantes. Seu uso é exclusivamente tópico (De Souza et al., 2003).

Os agentes antimicrobianos podem alterar a estrutura da parede celular e membrana plasmática em relação à atividade enzimática ou estrutura do protoplasma, bloqueando certas reações bioquímicas ou sínteses de enzimas na célula microbiana, podendo levar à destruição desses micro-organismos (Trabulsi et al., 1999; Fuchs et al., 2004).

Os mecanismos do desenvolvimento de resistência das bactérias aos antimicrobianos podem ser naturais ou adquiridos. Os naturais são características intrínsecas de algumas espécies que conferem resistência a todas as cepas dessas espécies a um determinado antimicrobiano. A resistência adquirida ocorre devido a uma mutação genética durante seu processo reprodutivo, tanto em nível cromossomal (pela alteração do DNA bacteriano), como extracromossomal (pela transferência de DNA), geralmente, pelos plasmídios de resistência (Tavares, 1996; Trabulsi et al., 2008).

Alguns fatores contribuem para a ocorrência, frequência e persistência da resistência bacteriana, como uso abusivo dos antibióticos, a utilização de antibióticos para o tratamento e prevenção de infecções em animais e, no controle de infecção bacteriana em frutas e legumes, causando o aumento da transmissão de organismos multirresistentes para os seres humanos (Rodrigues, 2001).

A resistência antibacteriana constitui-se, atualmente, a despeito dos avanços da medicina, num dos maiores problemas de saúde pública. O uso excessivo de antibióticos de

forma indiscriminada e o não cumprimento do regime posológico são alguns dos fatores que contribuem para o aumento do número de cepas resistentes. Essa é uma situação preocupante em todas as áreas da infectologia. No ambiente hospitalar, encontra-se a maior quantidade de bactérias resistentes, devido ao grande fluxo de pessoas com patologias ocasionadas por diversos agentes etiológicos, onde a doença pode se encontrar em diferentes estágios (Corrêa, 2007).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Coleta e identificação do material botânico

As amostras (caule e raiz) da espécie *D. negrensis* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Km 27 da estrada AM-010 (s 02° 54.778; w 59° 58.802), no Município de Manaus-AM. A espécie botânica encontra-se registrada na reserva florestal sob o número 3797. A exsicata da espécie encontra-se depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com o número 235648.

4.1.2 Processamento do material botânico

Os caules e raízes de *D. negrensis* foram lavados em água corrente e colocados para secar em casa de vegetação à temperatura ambiente, variando de 35°C a 40°C, durante 5 dias (Figuras 8 e 9). Após este período, foram cortados em pedaços, com tamanho aproximado de 2 cm. Em seguida, foram triturados em moinho de faca, 721g de caule em peso bruto, obtendo-se 695g de pó; e 732g de raiz em peso bruto, obtendo-se 716,18g de pó.



Figura 8 - Raiz de *D. negrensis*. Foto: Silva, P.E.S., 2009.



Figura 9 - Caule de *D. negrensis*. Foto: Silva, P.E.S., 2009.

4.1.3 Obtenção do extrato

Os extratos aquosos de caule e raiz de *D. negrensis* foram obtidos pelo método de maceração (Figura 10). Em um frasco Mariotte de 4 (quatro) litros, foram colocados o material triturado e dois litros de água destilada, permanecendo por 48 horas. Após esse período, o extrato foi filtrado, colocado em recipiente de vidro de (três) litros e acondicionado em geladeira à temperatura de 8°C.

Foram usados recipientes de vidro, de 4,5cm de diâmetro e 6cm de altura, nos quais os extratos filtrados foram distribuídos e levados para congelamento em freezer, a uma temperatura de -20°C. Após o congelamento, os recipientes foram colocados em aparelho liofilizador (Figura 11), à temperatura aproximada de -20°C, durante 24 horas, para obtenção do extrato bruto. Foram obtidos 13,9g de extrato bruto de caule e 15,8g de extrato bruto de raiz.



Figura 10 - Maceração e filtração. Foto: Silva, P.E.S., 2009.



Figura 11 - Liofilização. Foto: Silva, P.E.S., 2009.

4.1.4 Atividade antimicrobiana

4.1.4.1 Obtenção dos micro-organismos

Foram utilizadas cepas de levedura, bactérias gram-positivas e gram-negativas, obtidas no acervo da Coleção Biológica do Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas & Maria Deane – ILMDF/IOC/CRUZ-AM (Quadro 1). Estes micro-organismos foram escolhidos por serem recomendados como padrão para testes de suscetibilidade antimicrobiana (CLSI, 2003), sendo os responsáveis por várias formas de infecções em humanos, e adquirem, com mais frequência, resistência aos antimicrobianos (Trabulsi et al., 2008).

Quadro 1 – micro-organismos utilizados para testes.

| | |
|-------------------------------|-----------|
| <i>Escherichia coli</i> | CBAM 001 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | CBAM 324 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | CBAM 332 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | CBAM 232 |
| <i>Candida albicans</i> | CFAM 1285 |

Legenda: CBAM – Coleção de bactérias da Amazônia; CFAM – Coleção de fungos da Amazônia

4.1.4.2 Método de difusão em ágar-técnica do poço

O teste para determinação da atividade antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão em ágar, com base na técnica do poço em camada dupla, conforme descrito por Groove & Randall (1955).

4.1.4.3 Preparo do meio de cultura

Foram preparados 2L de ágar Mueller Hinton (MHA) desidratado (Himedia Laboratories) para os testes bacterianos na proporção 34g/L de água deionizada, conforme especificação do fabricante. O material foi deixado em repouso, durante 45 minutos, à temperatura aproximada de 25°C, para hidratar. Para o teste da levedura, foram preparados 500mL de ágar Sabouraud a 4% (Difco), os quais foram submetidos à esterilização, por calor úmido, em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, deixou-se esfriar até a temperatura de 50°C. Com uma pipeta graduada esterilizada, dispensaram-se em placas de Petri (90mm x 15mm) 25mL do ágar MH e 25mL do ágar Sabouraud a 4%.

4.2 Preparo das soluções (Extratos)

Foram preparadas soluções do extrato de raiz e caule de *D. negrensis* em três concentrações diferentes, 300, 400 e 500mg/mL, utilizando como solvente água deionizada.

4.3 Preparo do inóculo microbiano

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, as suspensões foram preparadas a partir de cada micro-organismos testados (Quadro 1). No tubo de ensaio, previamente preparado com 10mL de água deionizada estéril, partindo-se de culturas recentes (24 horas), ajustou-se a densidade das suspensões ao equivalente à escala 1 de MacFarland (MF), para as bactérias e levedura (Murray, 1999).

4.4 Controles utilizados

Foram utilizados como controles positivos, os antimicrobianos comerciais de referência, respeitado o perfil de sensibilidade de cada grupo e individualidade dos micro-organismos, e como controle negativo, o solvente utilizado no preparo dos extratos.

Cloranfenicol foi utilizado para as bactérias gram-positivas e gram-negativas; Itraconazol para a levedura.

Preparo das soluções-controle:

- Cloranfenicol (FB) – (Reagente Analítico-ACS, Proquímica): pesou-se 0,3mg e adicionaram-se 10mL de Álcool Etílico (PA) (Farmacopéia Brasileira, 1988);
- Itraconazol (Neoquímica): pesou-se 1mg e adicionaram-se 10mL de dimetil sulfóxido (DMSO) (Santos, 2008).

4.5 Procedimento-atividade antimicrobiana

4.5.1 Determinação da atividade antifúngica

Nas placas de Petri (90mm x 15mm), preparadas com meio de cultura ágar Sabouraud 4%, dispensaram-se 150 μ L de suspensão de fungo. Em seguida com um swab estéril, distribuiu-se o inóculo fúngico uniformemente sobre a superfície do ágar até a completa secagem da suspensão. Com um tubo de ensaio esterilizado, foram feitos três poços por placa, medindo aproximadamente 8mm. Dispensaram-se 80 μ L dos extratos de raiz e/ou caule nas concentrações de 300, 400 e 500mg/mL, juntamente com os controles positivo e negativo, nos poços devidamente identificados, utilizando-se uma pipeta automática. Incubou-se em estufa a 27°C por 48 horas. Os diâmetros formados pelos halos de inibição promovidos pelos extratos e controles positivos foram usados como parâmetros do poder de inibição de cada substância contra o micro-organismo testado, e foram mensurados por meio de uma régua milimetrada. O valor considerado foi a média dos halos das 10 repetições (Cunico et al., 2004).

4.5.2 Determinação da atividade antibacteriana

Dispensaram-se 150 μ L da suspensão bacteriana em placa de Petri (90mm x 15mm), contendo o meio de cultura ágar Mueller Hinton (MHA). Com auxílio de um swab estéril, a suspensão bacteriana foi distribuída, formando uma camada uniforme até a completa secagem dessa suspensão. Com um tubo de ensaio estéril, foram feitos três poços por placa, medindo aproximadamente 8mm. Dispensou-se 80 μ L dos extratos de raiz e/ou caule nas concentrações de 300, 400 e 500mg/mL e os controles positivo e negativo, nos poços devidamente identificados, utilizando-se uma pipeta automática. As placas de Petri foram deixadas à temperatura aproximada de 25°C por, aproximadamente, uma hora, para que ocorresse a difusão da solução pelo ágar, antes do crescimento bacteriano. Em seguida, incubou-se em

estufa a 35°C por 24 horas. O halo de inibição do crescimento foi medido em milímetros, utilizando-se régua milimetrada, e o valor considerado foi a média dos halos das 10 repetições (Groove & Randall, 1955).

4.6 Método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em placa de microdiluição

4.6.1 Preparo das soluções

Foram preparados 100mL do meio de cultura líquido Mueller Hinton Both (MHB) desidratado (Difco), na proporção 2,1g/100mL de água deionizada. O material foi deixado em repouso para hidratar. Em seguida, foi submetido à esterilização por calor úmido, em autoclave a 121°C, por 15 minutos;

Foram preparadas as soluções dos extratos de raiz e caule na concentração de 300mg/mL de água deionizada;

Pesou-se 1g de Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (Inlab) 1% (p/v) e adicionou-se 100mL de água deionizada.

4.6.2 Preparo do inóculo microbiano

Com auxílio de uma alça de platina esterilizada, inocularam-se as bactérias testadas (Quadro 1) no tubo de ensaio, previamente preparado com 10mL de água deionizada estéril, partindo-se de culturas recentes (24 horas). Ajustou-se a densidade da suspensão ao da escala 1 de MacFarland (MF) (Murray et al., 1999).

4.6.3 Procedimento

Em microplaca estéril de 96 orifícios, distribuídos em oito linhas identificadas de A até H e doze colunas, dispensaram-se 100µL de meio de cultura líquido (MHB) em todos os orifícios. Na linha A da microplaca foram adicionados 100µL da solução do extrato vegetal, na concentração de 300mg/mL. Em seguida, com uma pipeta de microdiluição, foram feitas as diluições seriadas, transferindo-se 100µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente, até a linha G da microplaca, sendo que a última linha, H, não se dispensou o extrato, pois foi utilizada como controle do crescimento bacteriano. Foram inoculados, em cada um dos orifícios da microplaca, 25µL da suspensão bacteriana padronizada e da solução indicadora TTC – Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio (Inlab) a 1% (p/v), o qual indicou uma coloração vermelha nas microplacas que apresentaram crescimento bacteriano. A microplaca

foi selada e incubada a 37°C por 24 horas e a leitura feita visualmente. A CIM foi determinada como a menor concentração do extrato capaz de impedir a mudança de cor, ou seja, de inibir o crescimento celular (Telles & Mosca, 2000).

Para classificação da atividade antimicrobiana, utilizaram-se os seguintes critérios: atividade entre 10 e 100 mg/mL, foi considerado boa; entre 100 e 500mg/mL, como atividade moderada; entre 500 e 1000mg/mL, como fraca atividade; e maior que 1000mg/mL, foi considerado inativo (Holetz et al., 2002).

4.7 Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM)

4.7.1 Procedimento

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), foram selecionadas as três menores concentrações capazes de impedir a mudança de cor do desenvolvimento de bactérias, no ensaio da CIM mais a solução controle. As alíquotas foram retiradas com pipeta de microdiluição e inoculadas em placa de Petri (150mm x 15mm), dividida em quatro partes, preparada em meio ágar Mueller Hinton (subcultura), isento de composto e incubada por 24 horas, a 37°C. Após a incubação, as subculturas foram inspecionadas por meio da verificação visual do crescimento microbiano.

A concentração bactericida mínima é a quantidade mínima de agente antimicrobiano necessário para inviabilizar a célula microbiana, ou seja, provocar danos irreversíveis às bactérias.

Quando os valores da CBM são comparados com a CIM, pode-se avaliar se o composto é bacteriostático ou bactericida (Baron & Finegold, 1999).

4.8 Análise dos extratos por cromatografia de camada delgada (CCD)

Os extratos aquosos de caule e raiz, obtidos do material vegetal, foram analisados por CCD. Os cromatogramas foram obtidos usando-se cromatoplacas de 9cm x 4cm de sílica gel 60 (Alugran® SIL_{254nm} G). As amostras foram aplicadas com auxílio de um capilar em um ponto próximo ao extremo inferior da fase estacionária, experimentando várias combinações de solventes orgânicos em proporções volumétricas. As cromatoplacas foram colocadas em um recipiente contendo a Fase Móvel (mistura de solventes). A polaridade dos solventes é

específica à substância que se deseja separar; neste caso foram usados no sistema: acetato de etila, ácido formico, ácido acético glacial e água (6:1:1:2 mL). Após uma migração de 8cm dos solventes nas cromatoplasas, as mesmas foram retiradas do recipiente que contém a Fase Móvel. Logo após o desenvolvimento e evaporação do eluente, os cromatogramas foram observados sob luz ultravioleta (UV) de 254nm e 365nm e revelados com reativo de Dragendorff, vanilina sulfúrica e cloreto férrico, a fim de determinar classes de metabólitos secundários e os respectivos Rf. As revelações dos cromatogramas apresentaram cores às bandas, indicando a substância de interesse (Balinova, 1998).

4.9 Análise qualitativa por bioautografia

Nos ensaios bioautográficos, em placa de cromatografia de camada delgada (CCD), o cromatograma foi colocado dentro de uma placa de Petri medindo 150mm x 15mm. Foram utilizados 20 mL do meio a 40°C (água Mueller-Hinton), suplementado com 500µL de suspensão bacteriana equivalente a escala 1 de MacFarland (MF) e 500µL de Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio-TCC 1,0% (p/v), os quais foram vertidos no cromatograma, a fim de formar uma fina camada. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade antibacteriana foi avaliada, visualizando-se a área de inibição (Schmourlo et al., 2005).

4.10 Análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado com três tratamentos, dez repetições, mais dois grupos controle, perfazendo um tamanho amostral n=50. Os dados foram analisados por meio de estatística paramétrica, teste de Análise de Variância-ANOVA, seguido do teste de Tukey; e por meio de estatística não-paramétrica, teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn: O intervalo de confiança foi de 95%, sendo considerado estatisticamente diferente ($P > 0,05$). Para elaboração das análises estatísticas foi utilizado o programa computacional Statistical Package for the Social Science (SPSS 17.0).

5 Resultados e discussão

5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de raiz e caule de *D. negrensis*

A determinação das concentrações utilizadas neste trabalho de 300, 400 e 500mg/mL foi subjetivamente definida, com intuito de verificar a variação na atividade antimicrobiana dos extratos.

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos frente aos microorganismos testados, mediante a utilização de dois extratos de diferente parte da planta, teve como objetivo verificar a ocorrência de variação nos resultados entre eles. Os resultados mostraram que o extrato da raiz possui melhor atividade em relação ao extrato do caule.

Os resultados obtidos com extratos de raiz de *D. negrensis* após a realização dos ensaios de difusão em ágar, pelo método preconizado por Grove & Randall (1955),

ocasionaram inibição microbiana pela constatação da formação de halo de inibição ao redor dos poços onde foram depositados os extratos testados.

Os valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição para as concentrações de 300, 400 e 500mg/mL do extrato aquoso de raiz de *D. negrensis* nos tempos de 12 e 24 horas estão demonstrados nas tabelas 1,2 e 3.

Tabela 1 – Média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos micro-organismos, obtidos por meio da ação do extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, na concentração de 300 mg/mL, em 12 e 24 horas

| Micro-organismo | 12h (raiz – 300mg/mL) | 24h (raiz – 300mg/mL) | Controle (+) |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| <i>S. aureus</i> | 17,2 b | 15,9 a | 30,0 c |
| <i>C. albicans</i> | 0,0 d | 0,0 d | 13,0 d |
| <i>E. coli</i> | 16,5 b | 13,3 c | 40,0 b |
| <i>K. pneumoniae</i> | 15,6 c | 13,7 c | 41,0 a |
| <i>P. aeruginosa</i> | 19,6 a | 15,1 b | 30,0 c |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de $\alpha = 0,05$.

Tabela 2 – Média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos micro-organismos, obtidos por meio da ação do extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, na concentração de 400 mg/mL, em 12 e 24 horas

| Micro-organismo | 12h (raiz – 400mg/mL) | 24h (raiz – 400mg/mL) | Controle (+) |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| <i>S. aureus</i> | 18,0 a | 18,0 a | 30,0 c |
| <i>C. albicans</i> | 0,0 c | 0,0 d | 13,0 d |
| <i>E. coli</i> | 15,2 b | 14,7 c | 40,0 b |
| <i>K. pneumoniae</i> | 15,0 b | 16,0 b | 41,0 a |
| <i>P. aeruginosa</i> | 18,0 a | 17,9 a | 30,0 c |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de $\alpha = 0,05$.

Tabela 3 – Média dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos micro-organismos, obtidos por meio da ação do extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, na concentração de 500 mg/mL, em 12 e 24 horas

| Micro-organismo | 12h (raiz – 500mg/mL) | 24h (raiz – 500mg/mL) | Controle (+) |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
| <i>S. aureus</i> | 20,0 ab | 20,0 a | 30,0 c |
| <i>C. albicans</i> | 0,0 c | 0,0 d | 13,0 d |
| <i>E. coli</i> | 20,1 ab | 16,9 b | 40,0 b |
| <i>K. pneumoniae</i> | 18,5 b | 15,5 c | 41,0 a |
| <i>P. aeruginosa</i> | 21,1 a | 19,1 a | 30,0 c |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey em nível de $\alpha = 0,05$.

Analisando a concentração de 300mg/mL do extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, no tempo de 12 horas, sobre os micro-organismos *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *C. albicans* (Tabela 1), observou-se que essa concentração apresentou o mesmo efeito quanto a inibição do crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. Para os micro-organismos *P. aeruginosa* e *E. coli* apresentou efeito diferente. A concentração avaliada desse extrato foi mais eficaz para *P. aeruginosa* e não inibiu o crescimento de *C. albicans*.

A concentração de 300mg/mL do extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, no tempo de 24 horas (Tabela 1), apresentou o mesmo efeito em relação à inibição de crescimento de *E.coli* e *K. pneumoniae*. Para os demais micro-organismos o efeito foi diferente, sendo mais eficaz para *S. aureus*, apresentando média do diâmetro do halo inibição de crescimento de 15,90. Para *C. albicans*, não apresentou efeito inibitório.

O extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, na concentração de 400mg/mL, avaliado sobre os micro-organismos *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, no tempo de 12 horas (Tabela 2), indicou que *E. coli* e *K. pneumoniae* não apresentaram diferença estatística em relação ao diâmetro do halo, ou seja, a concentração avaliada teve o mesmo efeito quanto a inibição de crescimento dos dois micro-organismos. A concentração de 400mg/mL apresentou, também, o mesmo efeito de inibição de crescimento e maior eficácia para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, porém para *C. albicans*, não apresentou efeito inibitório.

Quanto à concentração de 400mg/ml do extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, no tempo de 24 horas (Tabela 2), obervou-se que *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram diferença

estatística quanto a média dos diâmetros dos halos, ou seja, a concentração avaliada teve efeito diferente sobre a inibição do crescimento desses micro-organismos. Apresentou maior eficácia e, também, o mesmo efeito em relação à inibição de crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Em relação a *C. albicans*, não apresentou efeito inibitório.

No tempo de 12 horas, o extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, na concentração de 500mg/mL (Tabela 3), apresentou maior eficácia e o mesmo efeito inibitório sobre o crescimento dos micro-organismos *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, porém o efeito sobre *P. aeruginosa* foi diferente em relação a *K. pneumoniae*. A concentração de 500mg/mL não inibiu o crescimento de *C. albicans*.

A concentração de 500mg/mL do extrato aquoso de raiz de *D. negrensis*, no tempo de 24 horas (Tabela 3), apresentou efeito diferente quanto à inibição do crescimento de *E. coli*, *K. pneumoniae*. Essa concentração foi mais eficaz e apresentou o mesmo efeito de inibição de crescimento para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, porém não inibiu o crescimento de *C. albicans*.

As tabelas 4 e 5 mostram a comparação da atividade antimicrobiana entre as concentrações de 300, 400 e 500mg/mL do extrato de raiz de *D. negrensis*, para cada micro-organismo avaliado nesse estudo (*S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*), nos tempo de 12 e 24 horas.

Tabela 4 – Comparação da atividade antimicrobiana entre as concentrações de 300, 400 e 500mg/mL do extrato de raiz de *D. negrensis* para cada micro-organismo avaliado, no tempo de 12 horas.

| Concentração (mg/mL) | Micro-organismo | | | | |
|-------------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| | Tempo 12 horas | | | | |
| | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| 300 | 17,2 c | 0,0 a | 16,5 b | 15,6 b | 19,6 b |
| 400 | 18,0 b | 0,0 a | 15,2 c | 15,0 b | 18,0 c |
| 500 | 20,0 a | 0,0 a | 20,1 a | 18,5 a | 21,1 a |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunn em nível de $\alpha = 0,05$.

Tabela 5 – Comparação da atividade antimicrobiana entre as concentrações de 300, 400 e 500mg/mL do extrato de raiz de *D. negrensis* para cada micro-organismo avaliado, no tempo de 24 horas.

| Concentração (mg/mL) | Micro-organismo | | | | |
|-------------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|----------------------|
| | Tempo 24 horas | | | | |
| | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>E. coli</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| 300 | 15,9 c | 0,0 a | 13,3 c | 13,7 b | 15,1 c |
| 400 | 18,0 b | 0,0 a | 14,7 b | 16,0 a | 17,9 b |
| 500 | 20,0 a | 0,0 a | 16,9 a | 15,5 a | 19,1 a |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Dunn em nível de $\alpha = 0,05$.

Analisando a tabela 4, observou-se que as três concentrações avaliadas, no tempo de 12 horas, apresentaram diferença estatística quanto aos valores das médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento dos micro-organismos *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Para *K. pneumoniae*, as concentrações de 300 e 400mg/mL não apresentaram diferença estatística, ou seja, tiveram a mesma atividade antibacteriana. O extrato de raiz não apresentou atividade antifúngica para *C. albicans* nas concentrações avaliadas.

No tempo de 24 horas (Tabela 5), verificou-se resultados semelhantes aos obtidos no tempo de 12 horas, sendo que o extrato de raiz, nas concentrações de 400 e 500mg/mL, não foi, estatisticamente, diferente quanto ao diâmetro do halo de inibição, para a bactéria *K. pneumoniae*, ou seja, apresentaram a mesma eficiência na inibição do crescimento desse micro-organismo.

As concentrações de 300, 400 e 500mg/mL, do extrato aquoso de caule de *D. negrensis*, nos tempos de 12 e 24 horas, não apresentaram atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Observou-se que essas concentrações somente tiveram efeito sobre o crescimento de *S. aureus*.

As concentrações de 300, 400 e 500mg/mL, do extrato aquoso de caule de *D. negrensis*, nos tempos de 12 e 24 horas, causaram halos de inibição com médias de diâmetros

estatisticamente diferentes entre si, ou seja, apresentaram efeitos diferentes quanto à inibição do crescimento de *S. aureus* (Gráfico 1).

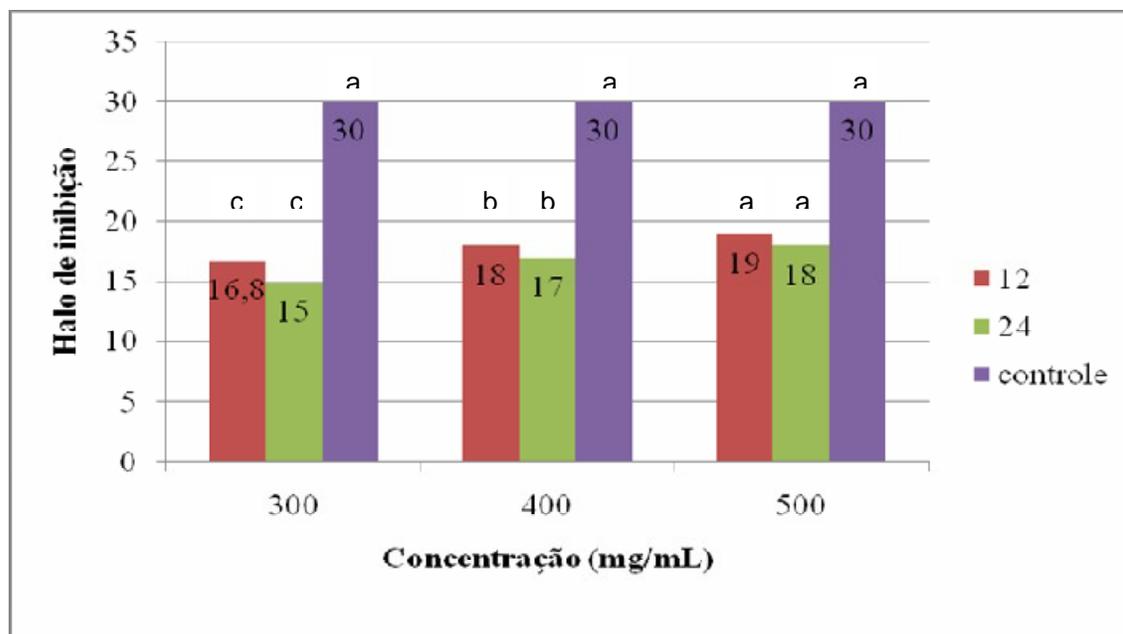


Gráfico 1 – Média dos diâmetros dos halos de inibição utilizando as concentrações de 300, 400 e 500 mg/mL do extrato de caule de *D. negrensis* frente a *S. aureus*, no tempo de 12 e 24 horas.

Em relação ao método utilizado, verificou-se que a ocorrência de maiores halos, no método de difusão, deu-se em algumas bactérias Gram-negativas em todas as concentrações no período de 12 horas. A ocorrência de maiores ou menores halos de inibição indica que a inibição do crescimento microbiano está correlacionada a uma maior ou menor atividade do extrato testado. Este acontecimento já foi observado em alguns trabalhos científicos que testaram a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar, e correlacionaram os maiores halos a uma maior atividade (Alves et al., 2000; Andrade et al., 2005).

A atividade antimicrobiana de *D. negrensis* sobre *S. aureus* e *E. coli* corrobora a atividade da planta do gênero *Derris* sobre esses micro-organismos no trabalho realizado por Sittiwet & Puangpronpitag (2009), os quais utilizaram a espécie *Derris scandens* sobre *S. aureus* e *E. coli* e verificaram atividade antibacteriana. Os fatores determinantes na escolha das espécies de bactérias, utilizadas no presente trabalho, foram a sua importância em doenças

infecciosas nos seres humanos e o aumento do desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos nos últimos anos.

Existem diversos trabalhos científicos relacionados com avaliação da atividade antimicrobiana de vários vegetais. As plantas pertencentes à família Fabaceae, objeto do nosso estudo, têm se destacado nessas pesquisas devido aos seus constituintes químicos, principalmente, os flavonóides e alcalóides (Botsaris & Machado, 1999).

Os resultados obtidos em nosso trabalho quanto à atividade antimicrobiana se assemelha aos resultados encontrados no estudo realizado por Souza et al. (2007), os quais avaliaram a atividade antibacteriana do extrato de *Stryphnodendron adstringentes*, uma planta nativa do cerrado brasileiro, pertencente à família Fabaceae, que apresenta propriedades bactericida e fungicida, frente aos micro-organismos *S. aureus* e *E. coli*, utilizando o método de difusão em ágar pela técnica do poço, a qual demonstrou atividade para as bactérias testadas. A atividade dessa planta e da planta utilizada em nossa pesquisa, provavelmente, se caracteriza pela presença de compostos fenólicos, que são metabólitos secundários presentes nas plantas da família Fabaceae, e que, na análise cromatográfica realizada (Figura 15), indicou a presença dessa classe de constituintes químicos em *D. negrensis*.

Em outro estudo com o mesmo objetivo, foi testado o extrato etanólico das folhas de *Ficus benjamina*, pertencente à família Moraceae, frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *K. pneumoniae*, pelo método de difusão em ágar. Foi demonstrada atividade antibacteriana para todas as bactérias. Alcalóides, flavonóides, terpenóides e tanino, poderiam justificar essa atividade antibacteriana (Reschke et al., 2007). Em nossos estudos cromatográficos realizados com o extrato de *D. negrensis*, apontou a presença dessas classes de compostos químicos encontrados em *F. benjamina*, provavelmente, responsáveis pela atividade antibacteriana sobre essas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e, também, observou-se que as espécies Moreaceae e Fabaceae possuem classes de metabólitos secundários semelhantes, mas, provavelmente, em concentrações diferentes.

A presença de flavonóides, isoflavonóides e compostos terpênicos no mecanismo de ação antibacteriana, ainda não está elucidado, mas existem relatos de que envolva a ruptura de membrana. O comportamento anfótero de saponinas, e a capacidade de formar complexos com esteróides, proteínas e fosfolípidos de membranas, podem ser responsáveis pela ação antimicrobiana. Essa ação pode ser devido à alteração da permeabilidade da membrana e sua posterior destruição (Avato et al., 1997; Simões et al., 2004).

A presença de flavonóides pode estar diretamente relacionada com a atividade antimicrobiana. Neste sentido, Ganapaty et al. (2006) testaram os flavonóides isolados de *Derris heyneana*: heyneana chalcona, lupinifalin, hiravarone e derrubone, e verificaram que heyneana chalcona apresentou atividade antimicrobiana contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Bacillus pumilis*.

O extrato da raiz de *D. negrensis* mostrou ter uma atividade antibacteriana mais eficiente tanto para *S. aureus* como para *P. aeruginosa*, o que sugere a possível presença de sinergismo entre as substâncias responsáveis pelo efeito antibacteriano ou à menor concentração de rotenona, isoflavonóide presente em espécies de plantas do gênero *Derris*, encontrada no caule de timbó e a maior concentração deste constituinte químico estar nas raízes, podendo variar de 5 a 13%, dependendo da espécie (Costa et al., 1999).

O *S. aureus* mostrou sensibilidade tanto para o extrato de caule como de raiz de *D. negrensis*, e *K. pneumoniae* foi inibida pelo extrato da raiz. Esses resultados são interessantes, partindo-se da grande dificuldade no controle e tratamento de micro-organismos multirresistentes, principalmente em doenças infecciosas hospitalares.

A atividade antimicrobiana de *D. negrensis*, possivelmente, está relacionada à ação de metabólitos secundários polifenóis. Os trabalhos realizados por França & Kuster (2009) relataram a atividade antibacteriana de floroglucinóis e do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choisy, os quais foram efetivos contra os *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA). O *H. brasiliense* é quimicamente constituído de flavonóides, xantonas e floroglucinóis, com significativos efeitos farmacológicos e biológicos.

As plantas tóxicas e medicinais, como espécies de Fabaceae, que contém compostos fenólicos na sua composição química, a qual pertence a espécie *D. negrensis*, são de grande importância no combate aos micro-organismos patogênicos, conforme demonstraram Ahmad & Beg (2001) em estudo pelo método de difusão em poço, a ação antibacteriana do extrato etanólico de várias plantas medicinais indianas, tradicionalmente utilizadas na medicina popular, ricas em flavonóides e taninos, contra bactérias multirresistentes.

Podemos sugerir, com base nos nossos resultados, que os extratos de *D. negrensis* possuem compostos fenólicos, os quais, provavelmente, agiram positivamente sobre as bactérias avaliadas. Observando os trabalhos realizados por Rauha et al. (2000), os quais avaliaram, pelo método de difusão em ágar com poço, nove espécies de micro-organismos em alguns extratos ricos em flavonóides e outros compostos fenólicos, verificou-se que foram efetivos tanto para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de raiz e caule de *D. negrensis*, foi observado que os dois extratos não foram ativos, nas concentrações testadas, contra o fungo leveduriforme *C. albicans*, corroborando os estudos realizados por Souza et al. (2008), que avaliaram os extratos brutos e frações das raízes de duas espécies vegetais do gênero *Derris* em micro-organismos do gênero *Candida* e não verificaram atividade antifúngica. Esses resultados vão de encontro à prevalência da resistência desses aos supostos agentes antifúngicos presentes em espécies do gênero *Derris*, utilizados nos testes de sensibilidade com células fúngicas. Esse fato pode ser observado devido à parede celular fúngica atuar na célula como uma barreira protetora. Essa parede pode estar impedindo a entrada dos extratos, ou os mesmos podem não estar interferindo em processos que resultem na inibição da parede ou na sua má formação. Devido a essas dificuldades, a parede se mantém intacta e a viabilidade celular é mantida (Selitrennikof, 1992; Trabulsi et al., 2008).

O ideal para um antifúngico que exerça sua ação por meio da inibição da síntese do ergosterol é a inibição de enzimas específicas para sua formação. Após o zimosterol, a rota sintética do ergosterol difere do colesterol. Se o agente antifúngico atuar em uma enzima conversora de zimosterol em 24-metilzimosterol, ou de 24-metilzimosterol em ergosterol, ele será específico para células fúngicas e, possivelmente, apresentará efeitos colaterais reduzidos (Zacchino et al., 2003).

O potencial antifúngico de compostos fenólicos, especialmente da classe dos flavonoides, é relatado por diversos autores, como Lopes et al., (1998), os quais observaram a atividade antifúngica de flavonóides isolados de plantas, verificando que os metabólitos secundários, dessa classe de constituinte químico, apresentaram ação 10 vezes mais potente que a nistatina, um antibiótico utilizado para tratamento de infecções vaginais causadas por *C. albicans* e outros da mesma espécie, que age sobre o fungo pela inibição do ergosterol. A atividade antimicrobiana de flavonóides é provavelmente devido à sua habilidade de se complexar com proteínas e com a parede celular do micro-organismo. Quanto mais lipofílico for o flavonóide, mais facilmente pode ocorrer a atividade antifúngica (Cowan, 1999; Somchit et al., 2003).

Em nossos estudos, após leitura de 6 horas para o cultivo da levedura *C. albicans*, exposta à ação dos extratos de raiz e caule de *D. negrensis*, observou-se halo de inibição, porém, após 12 horas de cultivo, não foi observado halo de inibição, ou seja, não apresentou mais atividade antifúngica. Segundo Arthington-Skaggs et al. (2002), esse fenômeno ocorre com aproximadamente 5% dos isolados de *Candida* spp. Esse crescimento “trailing” pode ser

tão vigoroso que faz com que um isolado seja interpretado como susceptível nas primeiras horas de incubação, mas se apresente como resistente após 48 horas.

Os extratos de *D. negrensis*, avaliados em nossa pesquisa, não apresentaram atividade frente ao micro-organismo *C. albicans*, nos testes empregando a metodologia de difusão em ágar. Esses resultados estão de acordo com o ensaio realizado por Pretto (2005), o qual realizou uma triagem de extratos de plantas medicinais brasileiras e testou-os contra o fungo leveduriforme *C. albicans*, observando que os extratos foram inativos. No entanto, Alves et al. (2006) encontraram resultados positivos ao avaliarem a atividade antimicrobiana do extrato de *Psidium guajava* sobre levedura do gênero *Candida*.

Costa et al. (2009) também avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* de extratos vegetais de *Rosmarinus officinalis* e *Syzygium cumini*, os quais apresentaram, sobre cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, atividade inibidora. A planta *Rosmarinus officinalis* é rica em terpeno, metabólito secundário com característica lipofílica, que tende a compartilhar a fase aquosa das estruturas da membrana fúngica, causando sua expansão, aumentando a fluidez ou desordem da estrutura da mesma (Sikkema et al., 1995). Nos extratos avaliados de *D. negrensis*, de acordo com nossos estudos cromatográficos, sugere-se a presença de compostos terpênicos, porém, provavelmente, em concentrações insuficientes para promover ação frente *C. albicans*.

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima

Foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos de raiz e caule de *D. negrensis*, a partir da concentração de 300mg/mL. Os extratos foram ativos até a concentração de 75mg/mL, frente a todas as bactérias (*E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) (Tabelas 6 e 7). Considerando os parâmetros estabelecidos por Holetz et al. (2004), a CIM igual a 75mg/mL possui boa atividade antimicrobiana (Figura 12).



Figura 12 – Teste da Concentração Inibitória Mínima de raiz e caule para *S. aureus* em placa de microdiluição.

Tabela 6 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima obtidos pelo método de microdiluição.

| Micro-organismo | CIM – Extrato de Raiz (mg/mL) | | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|-----|----|------|------|------|------|
| | 300 | 150 | 75 | 37,5 | 18,7 | 9,37 | 4,68 |
| Ec | - | - | - | + | + | + | + |
| Kp | - | - | - | + | + | + | + |
| Pa | - | - | - | + | + | + | + |
| Sa | - | - | - | + | + | + | + |

Legenda: Ec - *Escherichia coli*; Kp - *Klebsiella pneumoniae*; Pa - *Pseudomonas aeruginosa*; Sa - *Staphylococcus aureus*; (+) crescimento microbiano positivo; (-) crescimento microbiano negativo.

Tabela 7 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima obtidos pelo método de microdiluição.

| Micro-organismo | CIM – Extrato de caule (mg/mL) | | | | | | |
|-----------------|--------------------------------|-----|----|------|------|------|------|
| | 300 | 150 | 75 | 37,5 | 18,7 | 9,37 | 4,68 |
| Ec | - | - | - | + | + | + | + |
| Kp | - | - | - | + | + | + | + |
| Pa | - | - | - | + | + | + | + |
| Sa | - | - | - | + | + | + | + |

Legenda: Ec - *Escherichia coli*; Kp - *Klebsiella pneumoniae*; Pa - *Pseudomonas aeruginosa*; Sa - *Staphylococcus aureus*; (+) crescimento microbiano positivo; (-) crescimento microbiano negativo.

Em testes de atividades antimicrobianas utilizando extratos de plantas, tanto para as bactérias Gram-positivas como para as Gram-negativas, tem demonstrado um perfil de seletividade. Entretanto este fenômeno também ocorre para a maioria dos agentes antimicrobianos (Trabulsi et al., 2008; Basile et al., 1999).

Foi observada, nos testes da CIM, a atividade dos extratos de *D. negrensis* para as bactérias Gram-negativas. Essa observação é interessante, pois a resistência das bactérias Gram-negativas aos agentes antimicrobianos tem sido associada à presença de uma membrana externa existente nesses micro-organismos. Com isso, o agente antimicrobiano encontra grande dificuldade de penetrar na célula, ou, quando consegue, a concentração não é alta o suficiente para apresentar resultado esperado (Fuchs et al., 2004; Trabulsi et al., 2008).

Em pesquisa microbiológica, tem sido demonstrado que as bactérias, sobretudo as Gram-negativas, possuem mecanismos especializados em expulsar substâncias estranhas para fora de sua célula, mecanismo esse chamado de bomba de efluxo. Esses mecanismos atuam limitando o acesso do agente antimicrobiano ao seu alvo de ação. Esse sistema previne o acúmulo de droga no interior da célula, evitando assim que o agente antimicrobiano atinja a quantidade necessária para tornar o ambiente letal à célula, não exercendo o seu efeito (Hancock & Bell, 1988).

As concentrações que apresentaram atividade no ensaio para determinar a CIM também foram submetidas para determinar a CBM. Observou-se que, utilizando o extrato de raiz de *D. negrensis*, o perfil de atividade bactericida encontrado foi semelhante aos valores encontrados para CIM, pois as diferenças entre CIM e CBM foram relativamente pequenas em relação à inibição do crescimento dos micro-organismos (Tabela 8). Entretanto, para o extrato de caule, os valores de CIM e CBM não foram semelhantes, pois para CBM somente houve inibição de crescimento de um micro-organismo, *Klebsiella pneumoniae*, na concentração de 300mg/mL (Tabela 9).

O critério empregado para interpretação dos resultados foi o crescimento do micro-organismo na subcultura, que significou ação bacteriostática e a ausência de crescimento que significou ação bactericida (Baron & Finegold, 1990).

O crescimento bacteriano é paralisado pela adição de agente bacteriostático, porém alguns organismos permanecem viáveis. Agente bactericida mata as bactérias e o número total de organismos viáveis decresce. Apesar de prática, essa classificação pode ser muito simplista, pois é possível que um agente seja bacteriostático para um organismo e bactericida para outro (Strohl et al., 2004; Trabulsi et al., 2008).

Tabela 8 – Resultados da Concentração Bactericida Mínima para o extrato da raiz.

| Micro-organismo | CBM – Raiz (mg/mL) | | |
|-----------------|--------------------|-----|----|
| | 300 | 150 | 75 |
| Ec | - | - | + |
| Kp | - | - | + |
| Pa | - | - | - |
| Sa | - | - | + |

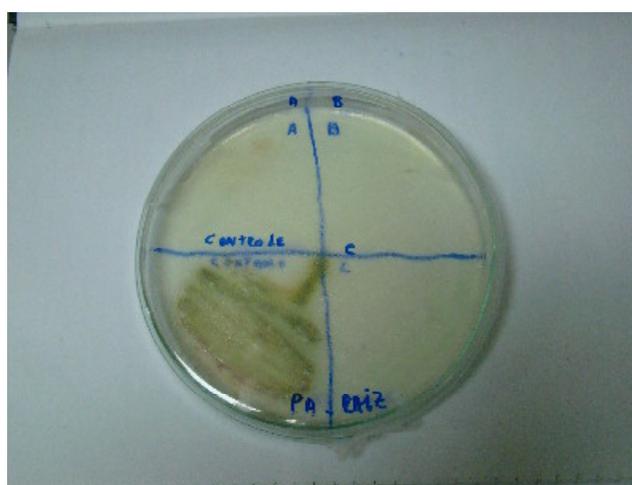
Legenda: Ec - *Escherichia coli*; Kp - *Klebsiella pneumoniae*; Pa - *Pseudomonas aeruginosa*; Sa- *Staphylococcus aureus*; (+) crescimento microbiano positivo; (-) crescimento microbiano negativo.

Tabela 9 - Resultados da Concentração Bactericida Mínima para o extrato do caule

| Micro-organismo | CBM – Raiz (mg/mL) | | |
|-----------------|--------------------|-----|----|
| | 300 | 150 | 75 |
| Ec | + | + | + |
| Kp | - | + | + |
| Pa | + | + | + |
| Sa | + | + | + |

Legenda: Ec - *Escherichia coli*; Kp - *Klebsiella pneumoniae*; Pa – *Pseudomonas aeruginosa*; Sa- *Staphylococcus aureus*; (+) crescimento microbiano positivo; (-) crescimento microbiano negativo.

Os extratos de raiz de *D. negrensis* apresentaram CBM de 300 e 150mg/mL para os micro-organismos *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. Somente para *P. aeruginosa*, obteve efetividade nas concentrações de 300 a 75mg/mL. Para os extratos de caule, houve crescimento nas concentrações de 300 a 75mg/mL, para as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, porém para *K.pneumoniae*, a efetividade foi somente na concentração de 300mg/mL. Portanto, considerando a CBM de 75mg/mL, o extrato de raiz somente foi eficiente para a bactéria *P. aeruginosa* (Figura 13). A partir das concentrações de 37,5mg/mL a 4,6mg/mL, os resultados apresentaram crescimento bacterianos nas subculturas.

**Figura 13** – CBM de extrato de raiz para *P. aeruginosa*.

As técnicas da CIM e CBM utilizadas no presente estudo, também foram utilizadas no trabalho de Sittiwet & Puangpronpitag (2009). Foi testado o extrato aquoso do caule de *Derris scandens* frente aos micro-organismos: *S. aureus*, *E. coli*, *S.epidermidis*. As mesmas demonstraram somente atividade para *S. aureus* e *E. coli*, nas concentrações de 4 a 16mg/mL.

Em relação ao trabalho de Sittiwet & Puangpronpitag (2009), foi observada uma grande variação em relação aos resultados da nossa pesquisa quanto à atividade antibacteriana. Para Fennel et al. (2004), as variações referentes à determinação da CBM e CIM, de extratos de plantas podem ser atribuídos a vários fatores. Dentre eles podemos citar a técnica aplicada, e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época de coleta, se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de extratos testados. Assim, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais.

Dos micro-organismos utilizados neste trabalho, existem relatos na literatura da atividade antimicrobiana de plantas do mesmo gênero e de espécies diferentes, devido possuírem algum tipo de isoflavonóide ou flavonóide biossintetizado, mais especificamente o rotenóide, com atividade somente para *S. aureus* e *E. coli* (Ganapaty et al., 2006; Araújo, 2009). Na Amazônia brasileira são encontradas plantas do gênero *Derris*, que vem se destacando pela produção de compostos pertencentes às classes dos rotenóides, os quais apresentam ação antibacteriana (Bearez, 1998; Arruda, 2005; Borges et al., 2006).

Neste sentido, há trabalhos científicos relacionados com a avaliação da atividade antimicrobiana de vários vegetais. As plantas pertencentes à família Fabaceae têm se destacado nesses estudos devido aos seus constituintes químicos, principalmente isoflavonóides e os flavonóides, que ocorrem quase que exclusivamente na subfamília Papilionoideae (Dewick, 2001).

5.3 Análise dos extratos por cromatografia em camada delgada (CCD)

Na Cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos aquosos de raiz e caule de *D. negrensis*, diversos eluentes foram testados e foi possível verificar que a fase móvel constituída por acetato de etila, ácido formico, ácido acético glacial e água (6:1:1:2 mL), foi a mais eficiente para a resolução dos cromatogramas.

Sem a utilização de revelador, verificou-se a presença de duas bandas de cor cinza ao visível. Na revelação sob a luz ultravioleta (UV) de 254nm e 365nm, indicou o Rf: 0,50 para o extrato de caule e Rf 0,42 para extrato de raiz, que após a revelação com a vanilina sulfúrica, mostrou manchas de coloração marrom avermelhada (Figura 14), possivelmente tratando-se de compostos terpênicos presentes na composição química desses extratos, de acordo com o trabalho realizado por Zoghbi et al. (1988), que identificaram a presença do triterpeno α -amirina no extrato etanólico de caule de uma espécie do gênero *Derris*, e Araújo (2009) que também identificou a partir das folhas e galhos de *Poiretia bahiana* (Fabaceae), após a extração com hexano, os triterpenos lupeol e β -amirina.

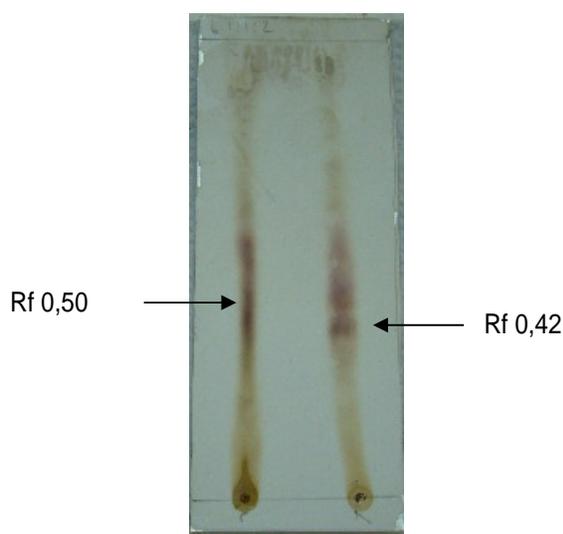


Figura 14 - Cromatografia em camada delgada (CCD) revelada com a vanilina sulfúrica.

Quando as frações dos extratos foram dissolvidas, houve a presença de espuma, indicando a existência de saponinas, que, segundo Bramley (1997), as saponinas são constituídas de triterpenos ou esteróides como aglicanos e diferentes tipos de unidades de carboidratos. São conhecidas como eficazes agentes antibacterianos e antifúngicos.

A figura 15 apresenta a cromatografia em camada delgada (CCD) dos extratos de *D. negrensis*, utilizando como fase móvel acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (6:1:1:2 mL), revelada com cloreto férrico. Observou-se manchas de cor azul (Rf 0,78 e 0,95 para o extrato de caule e 0,75 para o extrato de raiz). Segundo Costa (2002), essas manchas podem ser atribuídas à presença de compostos fenólicos, possivelmente pertencentes ao grupo dos flavonóides.

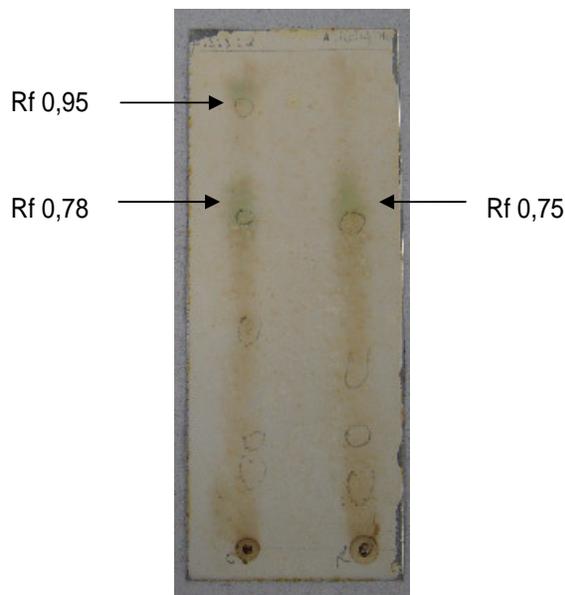


Figura 15 - Cromatografia em camada delgada (CCD) revelada com cloreto férrico.

De acordo com Fengel & Wegener (1989), os flavonóides constituem uma classe de substâncias especiais encontrados facilmente em extratos de raiz e caule de plantas da família Fabaceae. Harbone et al. (1994) já haviam afirmado que plantas desta família são excepcionalmente ricas em flavonóides, com vários registros de estruturas únicas existentes somente ou em particular abundância nesta família.

Verificou-se uma forte indicação da presença de alcalóides ou um composto que contenha dupla ligação (Rf 0,18 para extrato de caule e Rf 0,12 para extrato de raiz) nos extratos revelados com reagente de Dragendorff (Figura 16). Algumas famílias botânicas apresentam alcalóides, os mesmos são classificados de acordo com seu núcleo heterocíclico, que é uma estrutura cíclica ligada a um grupo amina, e possuem atividade farmacológica muito variável. De todos os grupos de princípios ativos, os alcalóides possuem a maior atividade biológica (Di Stasi, 1996; Botsaris & Machado, 1999).

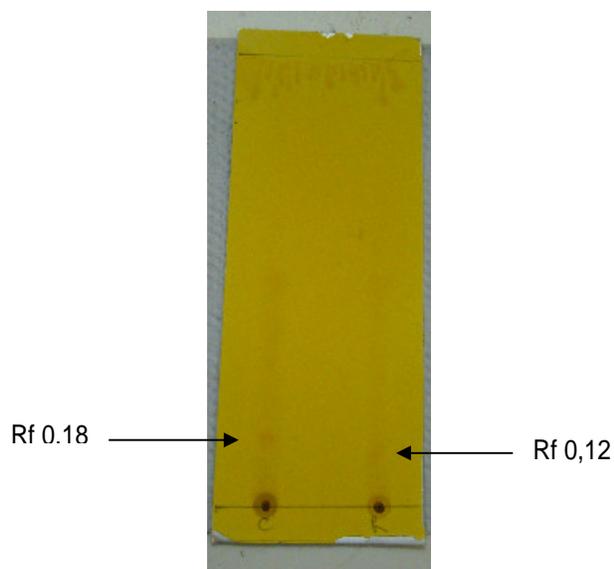


Figura 16 - Cromatografia em camada delgada (CCD) com o revelador de Dragendorff.

A positividade no resultado do revelador de Dragendorff indica a presença de compostos que contêm nitrogênio na estrutura, que são fortemente isolados de plantas nas diversas famílias. Varias atividades biológicas são atribuídas a este tipo de compostos: atividade antiproliferativa, citotóxica, antitumoral, imunomoduladora, antinematocida e antibacteriana (Zhang et al., 2007).

Alcalóides são grupos de constituintes químicos muito peculiar em plantas da família Fabaceae, como foi verificado no trabalho realizado por Cunha et al. (2003), os quais isolaram os alcalóides derricina e lonchocarpina do extrato hexânico de raízes de *Lonchocarpus sericeus*, que após avaliação *in vitro*, apresentaram atividade citotóxica contra células leucêmicas.

5.4 Análise qualitativa por bioautografia

A atividade antimicrobiana também foi detectada por bioautografia, que foi realizada com os extratos de caule e raiz de *D. negrensis* para identificar os possíveis constituintes responsáveis pela atividade antimicrobiana contra os micro-organismos teste.

Inicialmente foram testados vários sistemas de solventes para a realização da cromatografia de camada delgada (CCD), para obtenção de cromatogramas com boa resolução, pois uma separação inadequada das substâncias pode interferir no resultado da

inibição bacteriana. Dentre todos os sistemas testados os que apresentaram a melhor resolução foi acetato de etila, ácido formico, ácido acético glacial e água (6:1:1:2 mL), justificando assim seu uso neste ensaio.

Nos bioautogramas, observou-se que os extratos de caule apresentaram área de inibição para as bactérias: *S. aureus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* e *K.pneumoniae*, nas bandas correspondendo aos Rf: 0,18, e 0,95 (Figura 17). Para o extrato de raiz o Rf foi de 0,12 (Figura 17). A correlação da análise por bioautografia, com o método de difusão em ágar (técnica do poço), indica que na planta (caule e raiz) existem substâncias, possivelmente pertencentes aos grupos dos flavonoides e/ou alcaloides, com atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, apesar da diferença das metodologias.

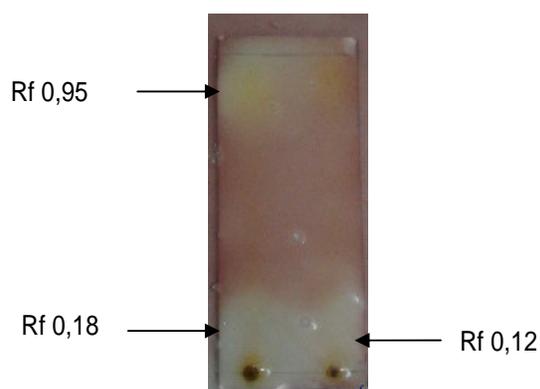


Figura 17 – Bioautografia do micro-organismo *S. aureus*.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Magalhães et al. (2007), que avaliaram a atividade antibacteriana por bioautografia de alguns flavonóides isolados de *Lonchocarpus montanus* e verificaram que os extratos de derriobtusona, medicarpina e lanceolatina foram efetivos contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Utilizando o sistema de solventes: acetato de etila, ácido formico, ácido acético glacial e água (6:1:1:2 mL), foi possível localizar pelo menos dois grupos distintos de substâncias com atividade antimicrobiana, sendo um grupo mais apolar, e outro mais polar, demonstrando que na planta existe mais de uma substância com diferente polaridade e atividade antimicrobiana. A atividade antimicrobiana apresentada por drogas vegetais pode ser em função da presença de flavonóides, taninos, alcalóides, saponinas e terpenos, os quais apresentam polaridades diferentes (Scalbert, 1991; Harbone & Williams, 2000; Bylka et al., 2004; Veluri et al., 2004; Kuete et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos na presente pesquisa pode-se concluir que:

- O extrato da raiz de *D.negrensis* apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias testadas, utilizando-se o método de difusão em ágar pela técnica do poço;
- O extrato do caule apresentou atividade antibacteriana somente para *S.aureus*;
- Os extratos de raiz e caule de *D. negrensis* apresentaram atividades antimicrobianas com CIM variando de 300 a 75 mg/mL, demonstrando efetividade para todas as bactérias testadas;
- A Concentração Bactericida Mínima, nas concentrações de 300 a 150mg/mL, do extrato de raiz de *D. negrensis*, apresentaram atividade para todas as bactérias, demonstrando ser mais eficiente para *P.aeruginosa* em todas as concentrações;
- A Concentração Bactericida Mínima do extrato de caule de *D. negrensis* foi efetiva somente na concentração de 300 mg/mL, para a bactéria *K.pneumoniae*;
- Os cromatogramas apresentaram substâncias com características de: alcalóides, terpenos e compostos fenólicos, após a revelação com os seus respectivos reveladores;
- A análise qualitativa para bioautografia mostrou atividade frente a todas as bactérias testadas.

Os resultados deste trabalho constituem uma alternativa no combate aos micro-organismos resistentes à antibiótico e possibilita a descoberta de novos constituintes químicos derivados de produtos naturais, a fim de minimizar a resistência microbiana, que é, atualmente, o principal fator preocupante em relação às infecções hospitalares. Sugere-se a continuação de estudos complementares no sentido de isolar as substâncias responsáveis por esta atividade e a realização de testes toxicológicos para viabilizar a sua utilização.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. (2008). **Imunologia celular e molecular**; [tradução de Cláudia Reale e outros]. Elsevier: Rio de Janeiro, 362p.
- Acevedo-Rodriguez, P. (1990). Distributional patterns in brazilian *Serjania* (Sapindaceae). **Acta Botânica Brasileira**. 4: 69-82.
- Ahmad, I.; Beg, A.Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drugs resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. 74: 113-123.
- Alavez-Solano, D.; Reyes-Chilpa, R.; Jiménez-Estrada, M.; Gómez-Garibay, F.; Chaves-Uribe, I.; Souza-Sánchez, M. (2000). Flavanones and 3-hydroxyflavanones from *Lonchocarpus oaxacensis*. **Phytochemistry**. 55: 953-957.
- Alécio, M.R. (2007). Toxicidade do extrato de *Derris amazônica* Killip a adultos de *Cerotoma arcuatus* Olivier, 1791 (*Coleoptera: Chrysomelidae*). **Dissertação de Mestrado**. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Brasil.
- Altman, F.P. (1976). Tetrazolium salts and formazans. **Stuttgart, Gustav Fischer Verlag**, 56p.
- Alves, T.M.A.; Silva, A.F.; Brandão, M.; Grandi, T.S.M.; Smânia, E.F.A.; Smânia Junior, A.; Zani, C.L. (2000). Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 3: 367-373.
- Alves, P.M.; Leite, P.H.A.S.; Pereira, J.V.; Pereira, L.F.; Pereira, M.S.V.; Higino, J.S.; Lima, E.O. (2006). Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre levedura do gênero *Candida* da cavidade oral. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 16: 192-196p.
- Alves, H.M. (2005). A diversidade química das plantas como fonte de fitoterápicos. **Caderno Temático de Química Nova na Escola nº 3**.
- Amorim, E.L.C.; Lima, C.S.A.; Higino, J.S.; Silva, L.R.S.; Albuquerque, U.P. (2003). Fitoterapia: Instrumento para uma melhor qualidade de vida. **INFARMA**. 15: 66-68.
- Andersen, O.M.; Webster, F.X.; Kiemle, D.J. (2006). **Flavonoids: chemistry, biochemistry and application**. 1ª ed. Group Taylor & Francis. London, 471-553.

Andrade, C.A.; Peitz, C.; Cúnico, M.; Carvalho, J.L.S.; Abrahão, W.M.; Miguel, O.G.; Miguel, M.D.; Kerber, V.A. (2005). Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex.G. Don. Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 15: 13-15.

Aragão, J.A.; Valle, J.R. (1973). Ictiotoxicidade de timbós dos gêneros *Serjania*, *Derris* e *Tephrosia*. **Ciência e Cultura**. 25: 12-14.

Araújo, F.M. (2009). Composition and antimicrobial activity of essential oil from *Pouretia bahiana* C. Muller (Papilionoideae-Leguminosae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 10: 1805-1810.

Araújo, J.C.L.V, Lima, E.O.; Caballos, B.S.O.; Freire, K.R.L.; Souza, E.L. (2004). Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre micro-organismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev Patol Trop**. 33: 55-64.

Araújo, F.M. (2002). Estudo fitoquímico biomonitorado da espécie *Pouretia bahiana* (Leguminosae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal da Bahia. Salvador, Brasil.

Arruda, M.S.P. (2005). **Allelopathy Journal**. 15: 211-220.

Arthington-Skaggs, B.A.; Lee-Yang, W.; Ciblak, M.A.; Frade, J.P.; Brand, M.E.; Hajjeh, R.A.; Harrison, L.H.; Sofair, A.N.; Warnock, D.W. (2002). **Antmicrob. Agents Chemother**. 54: 1753-1761.

Avato, P.; Vitali, C.; Mongelli, P.; Tava, A. (1997). Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives. **Planta Médica**. 63: 503-507.

Balinova, A. (1998). The extraction on method proposed is based on the MSPD-Matrix Solid-Phase Dispersion. **J. Cromatograf.**, 823,11.

Baron, E.J.; Finegold, S.M. (1990). **Diagnostic microbiology**. 8^a ed. The C.V. Mosby Co: St. Louis, 451-456.

Barreiro, E.J.; Manssour, C.A.M. (2008). **Química medicinal: As bases moleculares da ação dos fármacos**. Art Méd. Editora Ltda. Porto Alegre, 161-178.

Barreiro, E.J. (2009). Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de fármacos. **Química Nova**. 32: 679-688.

Basile, A.; Giordano, S.; López-Sáez, J.A.; Cobiánchi, C.R. (1999). Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**. 52: 1479-1484.

Bearez, P. (1998). FOCUS: First archaeological indication of fishing by poison in a sea environment by the Engoroy population of Salango (Manabí, Ecuador). **Journal of Archaeological Science**. 25: 943-948.

- Behling, E.B.; Sendão, M.C.; Francescato, H.D.C.; Antunes, L.M.G.; Bianchi, M.L.P. (2004). Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.** 3: 285-292.
- Black, J.G. (2002). **Microbiologia: Fundamentos e perspectivas**. Traduzido por Eiler Fritsch Toros. 4. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 347p.
- Bramley, P.M. (1997). Isoprenoid metabolism. In: Dey, P.; Harbone, J. (eds.) **Plant Biochemistry**. 11: 417-38.
- Braz Filho, R.; Figueiredo, U.S.; Gottlieb, O.R.; Mourão, A.P. (1980). Rotenóides de *Lonchocarpus longifolius*. **Acta Amazônica**. 10: 843-844.
- Botelho, M.A.; Nogueira, N.A.; Bastos, G.M.; Fonseca, S.G.; Lemos, T.L.; Matos, E.J. (2007). Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia siloides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz J Med Biol Res**. 40: 349-356.
- Botsaris, A.S.; Machado, P.V. (1999). **Memento terapêutico fitoterápicos**. Flora medicinal. Domus Design Gráfico. Rio de Janeiro, 32p.
- Borges, F.C.; Souza Filho, A.P.S.; Santos, L.S. (2006). **Plantas daninhas**. 24: 205-210.
- Botion, L.M.; Ferreira, A.V.M.; Côrtes, S.F.; Lemos, V.S.; Braga, F.C. (2005). Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tónus. **J. Ethnopharmacology**. 102: 137-142.
- Brito, A.R.M.S.; Brito, A.A.S. (1993). Forty yeras of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**. 39: 53-67.
- Bylka, W.; Matlawska, I.; Pilewski, N.A. (2004). Natural flavonoids as antimicrobial agents. **JANA**. 7: 24-31.
- CLSI. (2003). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard-Eighth Edition. **CLSI document M2-8**[ISBN 1-56238-485-6].
- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonatto, P.S. (1999). **Introdução a métodos cromatográficos**. 4 ed. Editora UNICAMP. Campinas, 279p.
- Corbett, C.E. (1940). Plantas ictiotóxicas. Farmacologia da rotenona. **Monografia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**. São Paulo, Brasil.
- Corrêa, M.P. (1984). **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional. Rio de Janeiro, 234p.
- Corrêa, R.S. (2006). Toxicidade de extratos de *Lonchocarpus floribundus* Benth. (timbó) sobre *Toxoptera citricidus* Kirkaldy (pulgão preto do citros) (Sternorrhyncha: Aphididae). **Dissertação de Mestrado**. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Brasil.

Corrêa, L. (2007). Restrição do uso de antimicrobianos no ambiente hospitalar. **Educação Continuada e Saúde**. 2: 48-52.

Costa, J.P.C.; Belo, M.; Barbosa, J.C. (1997). Efeito de espécies de timbó (*Derris spp*: Fabaceae) em populações de *Musca domestica* L. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. 26: 163-168.

Costa, J.P.C.; Alves, S.M.; Belo, M. (1999). Teores de rotenona em clones de timbó (*Derris spp.*, Fabaceae) de diferentes regiões da Amazônia e os seus efeitos na emergência de imagos em *Musca domestica* L. **Acta Amaz.** 29: 563-573.

Costa, A.F. (2002). **Farmacognosia II vol.** 5^a ed. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 195, 370p.

Costa, A.C.B.P.; Pereira, C.A.; Freire, F.; Junqueira, J.C.; Jorge, A.O.C. (2009). Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de odontologia da UNESP**. 38: 111-116.

Costa-Junior, L.M.; Chagas, A.C.S.; Furlong, J.; Reis, E.S.; Mascaro, U.C.P. (2002). Eficiência in vitro de rotenóides extraídos do timbó (*Derris urucu*) em teleóginas do carrapato *Boophilus microplus*. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. **Anais do XII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. p12. Rio de Janeiro.

Coura, J.R.; Castro, S.L. (2002). A critical on chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 97: 3-24.

Cowen, L.E.; Anderson, J.B.; Kohn, L.M. (2002). Evolution of drug resistance in *Candida albicans*. **Annu. Rev. Microbiol.** 56:139-65.

Cowan, M.M. (1999). Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. 4: 564-582.

Cunha, G.M.A; Fontenele, J.B.; Nobre Junior, H.V.; Sousa, F.C.M.; Silveira, E.R.; Nogueira, N.A.P.; Moraes, M.O.; Viana, G.S.B.; Costa-Lotufo, L.V. (2003). Citotoxic activity of chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Pocr.) Kunth. **Phytotherapy Research**. 17: 155-159.

Cunico, M.M.; Carvalho, J.L.S.; Kerber, V.A.; Higaskino, C.E.K.; Cruz Almeida, S.C.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G. (2004). Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 14: 97-103.

Cushine, T.P.T.; Lamb, A.J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 26: 343-356.

De Souza, M.M.; Bella Cruz, A.; Schuhmacher, M. B.; Kreuger, M.R.O.; Freitas, R.A.; Bella Cruz, R.C. (2003). **Métodos de avaliação de atividades biológica de produtos naturais e sintéticos**. In: Bresolin, T.M.B; Cechinel Filho, V. (Editores) Editora UNIVALI. Itajaí, 156p.

- Dewich, P.M. (2001). **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. Chichester: 2^a ed. Johnwiley & Sons Ltda. 135: 145-149.
- Di Stasi, L.C. (1996). Química de produtos naturais: Principais constituintes ativos. In: Di Stasi, L.C. (Org.) **Plantas medicinais: Arte e Ciências-um guia de estudo interdisciplinar**: Editora da Universidade Estadual Paulista. São Paulo, p.109-128.
- Dutra, V.F.; Messias, M.C.T.B.; Garcia, F.C.P. (2005). Papilionoideae (Leguminosae) nos campos ferruginosos do parque estadual de Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: Florística e fenologia. **Revista Brasileira de Botânica**. 28: 493-504.
- Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bactéria. **Planta Med**. 64: 711-713.
- Esposito, E.; Azevedo, J.L. (2004). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Educs: Caxias do Sul, 452p.
- Farmacopéia Brasileira**, (1988). 4^a. ed. Atheneu: São Paulo, 653p.
- Fengel, D.; Wegener, G. (1989). Wood-chemistry ulhastructure, reactions. **Walter de Gruyten** New York. 613p.
- Fenner, R.; Betti, A.H.; Mentz, L.A.; Rates, S.M.K. (2006). Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Braz. J. Pharm. Sci.** 42: 369-394.
- Fennel, C.W.; Lindsey, K.L.; Mc Gaw, L.J.; Sparg, S.G.; Stafford, G.I.; Elgorashi, E.E.; Grace, O.M.; Van Staden, J. (2004). Review: Assessing african medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacology**. 94: 205-217.
- Fernandes, O.C.C.; Castilho, T.A.; Lima, A.R.S.; Peixoto, J.; Machado, M.; Brito, E.; Rocha, W.C.; Silva, A.B.; Porto, A.L.F.; Teixeira, M.F.S. (2005). Produção de biocompostos com atividade antimicrobiana em fermentação semi-sólida por *Penicillium implicatum* 297 isolado de solo da região Amazônica-Brasil. In: **SINAFERM-XV Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Recife-PE, v. 1.
- Ferreira, S.H.; Barata, L.E.S.; Salles Filho, S.L.M.; Queiroz, S.R.R. (1998). Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. **Academia Brasileira de Ciências**. São Paulo.
- Firmino, C.A. (1998). Estudos fitoquímicos das raízes de *Lonchocarpus campestris*-Tozzi- **Tese de Doutorado em Ciências**. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, Brasil.
- Fontenele, J.B.; Leal, L.K.A.M.; Ferreira, M.A.D.; Silveira, E.R.; Viana, G.S.B. (2005). Antiplatelet Effect of Lonchocarpin and Derricin isolated from *Lonchocarpus sericeus*. **Pharmaceutical Biology**. 43: 726-731.
- França, H.S.; Kuster, R.M. (2009). Atividade antibacteriana de floroglucínóis e dos extratos hexânicos de *Hypericum brasiliense* Choysi. **Quimica Nova**. 32: 1103-1106.

- Fuchs, F.D.; Wannmacher, L.; Ferreira, M.B.C. (2004). **Farmacologia Clínica – Fundamento da Terapêutica Racional**. 3 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 360p.
- Ganapaty, S.; Thomas, P.S.; Josaphine, J.S.; Than, N.N.; Laatsch, H.C. (2006). Prenylflavonoids from *Derris Heyneana*. **NPC-Natural Product Communications**. 1: 81-85.
- Geissman, T.A. (1962). The chemistry of flavonoid compounds. Ed. **Pergamon Press**, Oxford, New York), 666p.
- Geiss, F. (1987). **Fundamentals of thin layer chromatography (planar chromatography)**. New York: Huethig, 478p.
- Giogetti, M.; Negri, G.; Rodrigues, E. (2007). Brazilian plants with possible action on the central nervous system – a study of historical sources from the 16th to 19th century. **J. Ethnopharmacology**. 109: 338-347.
- Gomes, R.P. (1946). A cultura dos timbós. Ministério da Agricultura. **Serviço de informações agrícola**. Rio de Janeiro, 20p.
- Grove, D.C.; Randall, W.A. (1955). Assay methods as antibiotic: a laboratory manual. **Medical Encyclopedia (Antibiotic Monographs)**. New York, 80p.
- Gurib-Fakim, G. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol. Aspects Med**. 27: 1-93.
- Gusmão, D.S.; Páscoa, V.; Mathias, L.; Vieira, I.J.C.; Filho, R.B.; Lemos, F.J.A. (2002). *Derris (Lonchocarpus) urucu* (Leguminosae). Extrato Modifies the Peritrophic Matrix Structure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 97: 371-375.
- Hamburguer, A.L.; Fuchs, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**. 51: 327-329.
- Hammer, K.A.; Carson, C.F.; Riley, T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracto. **Journal of Applied Microbiology**. 86: 985-990.
- Hancock, R.E.W.; Bell, A. (1988). Antibiotic uptake into Gram-negative bacteria. **European Journal Clinica Microbiological Infecty Diseases**. 7: 713-720.
- Harbone, J.B. (1984). **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2 ed. London: Chapman and Hall, 288p.
- Harbone, J.B.; Boulter, D.; Turner, B.L. (1994). Chemotaxonomy of the Leguminosae. London: **Academic Press Inc**. 612p.
- Harbone, J.B.; Williams, C.A. (2002). Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**. 55: 481-504.

Hegnauer, R.; Grayer-Barkmeyer, R.J. (1993). Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminose – A chemotaxonomic approach. **Phytochemistry**. 34: 3-16.

Heizer, R. F. (1986). Venenos de pesca in: Darcy Ribeiro (Ed.) Suma etnológica brasileira. Edição atualizada do handbook of South American Indian (3v) vol. 1 **Etnobiologia**. Vozes: Rio de Janeiro, 159-171.

Henry, J.B. (1999). **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19 ed. Editora Manole: São Paulo, 1225p.

Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P. (2002). Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 97: 1027-1031.

Hostettmann, K.; Hostettmann, M.; Marston, A. (1986). **Preparative chromatography techniques**. Berlin: Springer-Verlog, 139p.

Hostettmann, K. Queiroz, E.F.; Vieira, P.C. (2003). **Principios ativos de plantas superiores**. Edufscar, São Carlos, 151p.

Hube, B.; Naglik, J. (2001). *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**. 147: 1997-2005.

Inácio, M.V.S.; Mathias, L.; Matos, C.R.R. (2007). Avaliação da citotoxicidade e modificação estrutural de rotenóides isolados da espécie *Derris urucu*. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Rio de Janeiro.

Jawetz, E.; Melnick, J.L.; Adelberg, E.A. (1998). **Microbiologia Médica**. 20 ed. Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 442p.

Kaiser, R.E. (1970). **Planar chromatography**. New York:Huething, 265p.

Kaufman, P.B.; Cseke, L.J.; Warber, J.A.D.; Briemann, H.L. (1999). **Natural products from plants**. CRC Press LLC. Flórida, 16: 22-23.

Koneman, W.E; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn Junior, W.C. (2001). **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas**. 5 ed. Medsi: Rio de Janeiro, 120p.

Kuete, V.; Tangmouo, J.G.; Beng, V.P.; Ngounou, F.N.; Lontsi, D. (2006). Antimicrobial activity of the methanolic extract from the stem bark of *Tridesmostemon omphalocarpoides* (Sapotaceae). **J. Ethnopharmacol**. 104: 5-11.

Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C. (1991). **Micologia Médica: fungos actinomicetos e algas de interesse médico**. 8 ed. Sanvier: São Paulo, 695p.

Lacaz, C.S. (1980). **Candidíases**. Colaboradores: Alberto Horácio Pettinoti...[et al.]. Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 102p.

Lacerda, R.A.; Egry, E.Y. (1997). As infecções hospitalares e sua relação com o desenvolvimento da assistência hospitalar: reflexões para análises de suas práticas atuais de controle. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. 5: 13-23.

Lanças, F.M. (1993). **Cromatografia em fase gasosa**. Acta: São Carlos, 254p.

Laupattarakasem, P.; Houghton, P.J.; Houlst, J.R. (2004). Anti-inflamatórios isoflavonóides das hastes de *Derris scandens*. **Planta Med.** 70: 496-501.

Le Cointe, P. (1947). **Amazônia Brasileira III. Árvores e plantas úteis**. 2 ed. Companhia Editora Nacional: São Paulo, 460p.

Lima, E.O. (2001). **Plantas e suas propriedades antimicrobianas**: Uma breve análise histórica, in: Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Argos: Chapecó, 479-499p.

Lima, R.R. (1987). Informações sobre duas espécies de timbó: *Derris urucu* (Killip et Smith) Macbride e *Derris nicou* (Killip e Smith) Macbride, como plantas inseticidas. Comunicado técnico **EMBRAPA CPATU**. 23.

Lopes, S.; Rosso, S. (2010). **Biologia: volume 3**. 2ª ed. Saraiva. São Paulo, 168p.

Lopes, N.P.; Kato, M.J.; Yoshida, M. (1998). Antifungal constituents from roots of *Virola surinamensis*. **Phytochemistry**. 01: 1-5.

Magalhães, A.F.; Tozzi, A.M.A.; Magalhães, E.G.; Nogueira, M.A.; Queiroz, S.C.N. (2000). Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. **Phytochemistry**. 55: 787-792.

Magalhães, A.F.; Tozzi, A.M.G.A.; Magalhães, E.G.; Sannomiya, M.; Soriano, M.D.P.C.; Perez, M.A.F.; Azevedo, A.M.G. (2007). Flavonoids of *Lonchocarpus Montanus* and Biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 79: 351-367.

Maia, J.G.S.; Vasconcelos, M.N.L. (1976). Estudo químico de *Derris negrensis*. **Acta Amazonica**. 6: 56-61.

Maier, H.G. (1975). **Métodos modernos de análises de alimentos**. Zaragoza:Acribia, 116p.

Mann, C.M.; Markham, J.L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**. 84: 538-544.

Martins, J.E.C. (1989). **Plantas medicinais de uso na Amazônia**. 2 ed. Editora Gengis Freire: Belém, 98p.

Mascaro, U.C.P.; Rodrigues, L.A.; Basto, J.K.; Santos, E.; Chaves da Costa, J.P. (1998). Valores de DI_{50} em peixes e no rato tratado com pó de raízes de *Derris* spp., e suas implicações ecotoxicológicas. **Pesquisa veterinária brasileira**. 18: 53-56.

McGinnis, M.R. (1964). **Laboratory Procedures in Clinical Mycology**. Ed. Govt. Print. Dept. of the Army. Washington, United State, 131p.

Mims, S.C.; Playfair, J.; Roitt, I.; Watelin, D.; Willians, R. (1999). **Microbiologia Médica**. 2 ed. Manole: São Paulo, 358p.

Miranda, E.T.; Silva, R.A.M.; Fusco-Almeida, A.M.; Melhem, M.C.S.; Pukinskas, S.R.B.S.; Mendes-Giannini, M.J.S. (2003). Epidemiologia de candidíase hospitalar: importância da identificação específica. **Rev. Ciên. Farm.** 24: 39-45.

Montanari, C.A.; Bolzani, V.S. (2001). Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**. 24: 105-111.

Moreira, A.C.; Muller, A.C.A.; Pereira Jr, N.; Antunes, M.A.S. (2006). Pharmaceutical patents on plant derived materials in Brazil: policy, Law and statistics. **World Patent Inf.** 28: 34-42.

Moura, R.A.; Wada, C.S.; Purchio, A.; Almeida, T.V. (2002). **Técnicas de Laboratório**. 3. Ed. Editora Atheneu: São Paulo, 214p.

Mundim, G.J.; Dezena, R.A.; de Oliveira, A.C.S.; da Silva, P.R.; Cardoso, M.; Pereira, G.A.; de Moraes, C.A.; Terra, A.P.S. (2003). Avaliação da presença de *Staphylococcus aureus* nos leitos do centro de terapia intensiva do hospital escola da faculdade de medicina do triângulo mineiro, em relação à posição no colchão antes e após a limpeza. **Rev. Bras. Med. Trop.** 36: 685-688.

Murray, P.R. (1999). Manual of clinical microbiology. Washington D.C.: **American Society of Microbiology Press**, 297-305.

Paiva, S.R.; Figueiredo, M.R.; Aragão, T.V.; Kaplan, M.A.C. (2003). Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from plumbago species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 98: 959-961.

Pannakal, S.T.; Ganapaty, S.; Srilakshmi, G.V.K.; Lakshmi, P.; Waterman, P.G.; Brun, R. (2008). Pumilanol, an antiprotozoal isoflavanol from *Trephosia pumila*. **Phytochemistry Letters**. 1: 175-178.

Pietta, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. **Journal Natural Productos**. 63: 1035-1042.

Pohlit, A.M.; Quignard, E.L.J.; Nunomura, S.M.; Tadei, W.P.; Hidalgo, A.F.; Pinto, A.C.S.; Santos, E.V.M.; Moraes, S.K.R.; Saraiva, R.C.G.; Ming, L.C.; Alecrim, A.M.; Ferraz, A.B.; Pedroso, A.C.S.; Diniz, E.V.; Finney, E.K.; Gomes, E.O.; Dias, H.B.; Souza, K.S.; Oliveira, L.C.P.; Don, L.C.; Queiroz, M.M.A.; Henrique, M.C.; Santos, M.; Lacerda Júnior, O.S.; Pinto, P.S.; Silva, S.G.; Graça, Y.R. (2004). Screening of plants found in the State of Amazonas, Brazil for larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae. **Acta Amazônica**. 34: 97-105p.

Pretto, J.B. (2005). Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas medicinais brasileira. **Dissertação de Mestrado**. Universidade do Vale do Itajai. 74p.

- Quignard, E.L.J.; Nunomura, S.M.; Pohlit, A.M.; Alecrim, A.M.; Pinto, A.C.S.; Portela, C.N.; Oliveira, L.C.P.; Don, L.C.; Silva, L.F.R.; Henrique, M.C.; Santos, M.; Pinto, P.S.; Silva, S.G. (2004). Median Lethal Concentrations of Amazonian Plant Extracts in the Brine Shrimp Assay. **Pharm. Biol.** 42: 253-257.
- Randerath, K. (1966). **Thin-layer chromatography**. 2. Ed. New York: Academic Press, 285p.
- Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M. (1997). **Farmacologia**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 692p.
- Rauha, J.P.; Remes, S.; Heimonen, M.; Hopia, A.; Kahkonen, M.; Kujal, Y.; Pihlaja, K.; Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **J. Food Microbiol.** 56: 3-12.
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Elchhorn, S.E. (2007). **Biologia vegetal**. 7ª ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 724p.
- Razzini, C.T.; Mors, W.B. (1995). **Botânica econômica brasileira**. 2 ed. Âmbito cultural: Rio de Janeiro, 113p.
- Reschke, A.; Marques, L.M.; Mayworm, M.A.S. (2007). Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.** 9: 67-70.
- Ribeiro, J.E.L.S.; Hopkins, M.J.G.; Vicentini, A.; Sothers, C.A.; Costa, M.A.S.; Brito, J.M.; Souza, M.A.D.; Martins, L.H.P.; Lohmann, L.G.; Assunção, P.A.C.L.; Pereira, E.C.; Silva, C.F.; Mesquita, M.R.; Procópio, L.C. (1999). **Flora da Reserva Ducke. Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-firme na Amazônia Central**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 799p.
- Rodrigues, D.P.R. (2001). Papel dos alimentos na veiculação da resistência antibacteriana. In: **Anais XII Encontro Nacional de Analistas Alimentos (ENAAL)**. Alagoas, 33-34p.
- Rije, E.; Out, P.; Niesen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography**. A1112: 31-63.
- Sader, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; Mendes, R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R.N. (2001). Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian Hospitals: Summary of results from three years of the SENTRY antibacterial surveillance Program. **Brazilian journal of infectious diseases**. 5: 200-214.
- Salisbury, F.B.; Ross, C.W. (1991). **Plant physiology**. 4ª ed. Library of Congress Cataloging in Publications Data. 448p.
- Sampaio, S.A.P.; Rivitti, E.A. (2007). **Micoses superficiais**. Editora Artes Médicas: São Paulo, 1155p.
- Sannomiya, M. (1994). Análise fitoquímica de *Platymiscium floribundum* var. latifolium e *Lonchocarpus montanus*. Isolamento, determinação estrutural e atividade biológica. **Tese de**

Doutorado em Ciências. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, Brasil.

Santos, J.C.L.; Lobato, M.P.; Souza, J.R.V.; Souza, K.M.R.; Filho, A.P.S.S.; Arruda, M.S.P.; Guilhon, G.M.S.P.; Santos, A.S.; Muller, A.H.; Arruda, A.C.; Santos, L.S. (2007). Potencial alelopático dos extratos etanólicos de duas espécies de *Derris*. 29ª **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Rio de Janeiro.

Santos, M.R. (2008). Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para determinação do itraconazol matéria prima e cápsula. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul, Brasil.

Santos, E.L.; Costa, E.V.; Marques, F.A.; Vaz, N.P.; Maia, B.H.L.N.S.; Magalhães, E.G.; Tozzi, A.M.A. (2009). Toxicidade e atividade antioxidante de flavonóides das cascas das raízes de *Lonchocarpus filipes*. **Química Nova**. 9: 2255-2258.

Sartori, M.R.K. (2005). Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* SPRENG (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). **Dissertação de mestrado**. Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, Santa Catarina, Brasil.

Sato, N.T.; Tanaka, H.; Fujiwaras, S.; Hirata, M.; Yamaguchi, R.; Etoh, H.; Tokuda, C. (2002). Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacterial. **Phytomedicine**. 9: 427-433.

Schaechter, M.; Engleberg, N.C.; Eisenstein, B.I.; Medoff, G. (2002). **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 642p.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannis. **Phytochemistry**. 30: 3875-83.

Schenkel, E.P.; Gosmam, G.; Petrovick, P.R. (2004). Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.R.; Gosmam, G.; Mello, J.C.P. de; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Editora da UFRGS. Porto Alegre, cap. 15.

Schijlen, E.G.W.M.; Vos, C.H.R.; Tunen, A.J.; Bovy, A.G. (2004). Modification of flavonoids biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**. 65: 2631-2648.

Schmourlo, G.; Mendonça-Filho, R.R.; Alviano, C.S.; Costa, S.S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, 96: 563-8.

Schvartsman, S. (1992). **Plantas venenosas e animais peçonhentos**. Sanvier: São Paulo, 129p.

Selitrennikoff, C.P. (1992). Screening for antifungal drugs. In: Biotechnology of Filamentous Fungi-**Technology and Products**. Boston: Butterum Henemann. 189-217p.

Sidrim, J.J.C.; Moreira, J.L.B. (1999). **Fundamentos clínicos e laboratórias da micologia médica**. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 212p.

Sikkema, J.; De bont, J.A.; Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol Rev.** 59: 201-22

Simões, C.M.O.; Guerra, M.P.; Schenkel, E.P.; Zannin, M.; Mentz, L.A.; Bordignon, S.A.L.; Irgang, B. (2004). **Farmacognosia-da planta ao medicamento.** 5ª ed. Editora UFRGS, 959p.

Sittwet, C.; Puangpronpitag, D. (2009). Propriedades antimicrobianas de *Derris scandens* em extrato aquoso. **J. Biol. Sci.** 9: 607-611.

Sixel, P.J.; Pecinalli, N.R. (2002). Seleção de plantas para pesquisas farmacológicas. **INFARMA.** 15: 70-73.

Soares, F.M.P.; Romeiro, R.S.; Oliveira, J.R.; Ventura, J.A.; Perez, F.S. (1990). Metodologia de testagem de um meio seletivo para *Pseudomonas marginalis*, agente etiológico da queima bacteriana do alho. **Fitopatologia Brasileira.** 15: 140.

Somchit, M.N.; Reezal, I.; Nur, I.E.; Mutilib, A.R. (2003). In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology.** 84: 1-3.

Souza, R.F.; Vale, J.K.L.; Ribeiro, K.M.; Banna, D.A.D.S.; Guilhon, G.M.S.P.; Santos, A.S. (2008). Avaliação fungitóxica do extrato hidroalcoólico bruto e frações das raízes de duas espécies vegetais do gênero *Derris*. **60ª Reunião Anual da SBPC.**

Souza, T.M.; Severi, J.A.; Silva, V.Y.A.; Santos, E.; Pietro, R.C.L.R. (2007). Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *S. adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada.** 28: 221-226.

Sriwanthana, B.; Chavalittumrong, P. (2001). Efeito *in vitro* de *Derris scandens* sobre a proliferação de linfócitos normais e suas atividades sobre as células natural killer em indivíduos normais e um paciente HIV-infectado. **J. Ethnopharmacology.** 76: 125-129.

Sthal, E. (1969). **Thin-Layer chromatography.** 2. Ed. Berlin:Springer-Verlag, 1041p.

Strohl, W.A.; Rouse, H.; Fischer, B.D. (2004). **Microbiologia Ilustrada.** Ed. Artmed: Porto Alegre, 532p.

Tavares, W. (1996). **Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos.** 2 ed. Editora Atheneu: São Paulo, 792p.

Telles, M.A.S.; Mosca, A. (2000). Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação da concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** 59: 15-19.

Tiangburanatham, W. (1996). **Dicionário tailandês de plantas medicinais.** Prachachumtong impressão: Bangkok, 350p.

- Toledo, C.E.M. (2002). Estudos anatômicos, químicos e biológicos de casca e extrato obtidos de Barbatimão (*S. adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, São Paulo.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. (2005). **Microbiologia**. 8 ed. Artmed: Porto Alegre, 894p.
- Touchstone, J.C. (1992). **Practice of thin layer chromatography**. 3. Ed. New York:John Wiley, 377p.
- Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Gompertz, O.F.; Candeias, J.A.N. (2008). **Microbiologia**. 5 ed. Editora Atheneu: São Paulo, 780p.
- Trabulsi, L.R.; Alterthum, F.; Gompertz, O.F.; Candeias, J.A.N. (1999). **Microbiologia**. 3 ed. Editora Atheneu: São Paulo, 586p.
- Turolla, M.S.R.; Nascimento, E.S. (2006). Informações toxicológicas de alguns fitofármacos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Cien. Farm.** 42: 289-306.
- Vanden Berghe, D.A.; Vlietinck, A.J. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Dey, P.M.; Harbone, J.D. (eds), *Methods in plant biochemistry*, **Academic Press**, London. p. 47-69.
- Vasconcelos, J.N.; Lima, J.Q.; Lemos, T.L.G.; Oliveira, M.C.F.; Almeida, M.M.B.; Neto, M.A.; Mafezoli, J.; Arriaga, A.M.C. (2009). Estudo químico e biológico de *Tephrosia toxicaria* Pers. **Química Nova**. 32: 382-386.
- Veluri, R. Weir, T.L.; Bais, H.P.; Stermitz, F.R.; Vivanco, J.M. (2004). Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. **J. Agric. Food Chem.** 54: 1077-82.
- Villas Boas, P.J.F.; Ruiz, T. (2005). Ocorrência de infecções hospitalares em idosos internados em hospitais universitários. **Rev. Saúde Pública**. v.38; n. 3.
- Wink, M.; Mohamed, G. I. A. (2003). Evolution of chemical defense traits in the leguminose: mapping of distribution patterns of secondary metabolites and a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcl* gene. **Biochemical systematic and ecology**. 31: 897-917.
- Zacchino, S.A.; Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V.; Enriz, R.D.; Kouznetsov, V.; Ribas, J.C. (2003). The need for new antifungal drugs: screening for antifungal compound with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall in: Rai, M.; Mares, D. *Plant derived antimycotic: current trends and future prospects*. **The Haworth Press**. 1-41.
- Zhang, Y.; Liu, S.; Che, Y.; Liu, X. (2007). Epicoccins A-D, epipolythiolpiperazines from a cordyceps-colonizing isolated of *Epicoccum nigrum*. **Journal of Natural Products**. 70: 1522-1525.
- Zoghbi, M.G.B.; Marques, M.F.S.; Cabral, J.A.S.; Filho, R.B. (1988). Isolamento de cumestrol de uma espécie do gênero *Derris*. **Acta Amazônica**. 18: 57-60.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.