

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JHONATAS EMÍLIO RIBEIRO DA CRUZ

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PLANTAS MEDICINAIS DE OCORRÊNCIA NO CERRADO**

PATOS DE MINAS – MG
FEVEREIRO DE 2019

JHONATAS EMÍLIO RIBEIRO DA CRUZ

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PLANTAS MEDICINAIS DE OCORRÊNCIA NO CERRADO**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Enyara Rezende Moraes
Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas

PATOS DE MINAS – MG
FEVEREIRO DE 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C957a Cruz, Jhonatas Emílio Ribeiro da, 1985-
2019 Análise fitoquímica e avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais de ocorrência no cerrado [recurso eletrônico / Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz. - 2019.

Orientadora: Enyara Rezende Moraes.

Coorientador: Guilherme Ramos Oliveira e Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.317>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Biotecnologia. 2. Doenças transmissíveis. 3. Produtos naturais. 4. Radicais livres (Química). I. Moraes, Enyara Rezende, 1983- (Orient.). II. Freitas, Guilherme Ramos Oliveira e, 1985- (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

JHONATAS EMÍLIO RIBEIRO DA CRUZ

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
PLANTAS MEDICINAIS DE OCORRÊNCIA NO CERRADO**

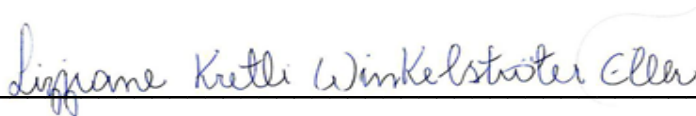
Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Aprovado em: 19 / 02 / 2019

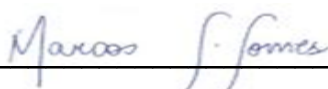
BANCA EXAMINADORA



Prof. (a) Dra. Enyara Resende Moraes



Prof. (a) Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter Eller



Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes

PATOS DE MINAS – MG

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus. Aos meus pais, Donizetti e Marlene, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e ensinado o verdadeiro significado da integridade. E a minha esposa, pelo companheirismo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve presente em minha vida me proporcionando muitas alegrias e sempre me dando força para superar as minhas dificuldades.

A Universidade Federal de Uberlândia, instituição a qual tenho grande orgulho de fazer parte.

Aos meus pais, Donizetti e Marlene, por me apoiarem e serem a minha referência de amor e união.

Aos meus irmãos, Washington e Maicon, pelo incentivo, vocês são os melhores amigos que eu poderia ter, vocês alegram muito a minha vida.

A minha esposa, Carla, as palavras expressas são poucas para revelar o quão é importante na minha vida, pelo amor sincero, companheirismo, incentivo constante, compreensão e dedicação.

Aos professores, pelos conhecimentos acadêmicos, técnicos e científicos aprendidos durante as disciplinas.

Aos membros da banca examinadora, que de modo gentil aceitaram o convite para avaliarem este trabalho.

Ao professor Dr. Marcos de Souza Gomes pelo interesse em ajudar com os experimentos, por me incentivar e ainda por acompanhar o meu trabalho com muito interesse.

Ao professor Guilherme Ramos Oliveira e Freitas pela compreensão, confiança e sugestões técnico-científicas que em muito contribuíram nos meus experimentos e para evolução do meu saber científico e humanitário.

A professora Dra. Enyara Rezende Moraes, por ter aceitado me orientar como aluno de mestrado, pelo acompanhamento e ensinamentos transmitidos durante todo o trabalho e pela sua dedicação de profissional. Muito obrigado!

RESUMO

As doenças infecciosas têm sido uma importante causa de morbimortalidade em todo o mundo. Apesar da descoberta e desenvolvimento dos antibióticos, o tratamento dessas doenças atualmente nem sempre tem sido bem-sucedido devido à emergência da resistência antimicrobiana. Assim, este estudo buscou avaliar a atividade antioxidante, o conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides totais e a ação antimicrobiana de seis extratos de plantas medicinais de ocorrência no Cerrado, Boldo (*Peumus boldus*), Goiaba (*Psidium guajava*), Assa-Peixe (*Vernonia polysphaera*), Abacate (*Persea americana*), Bálsamo (*Jatropha multifida*) e Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e a dosagem de flavonoides totais foi realizada pelo método de Cloreto de Alumínio. A atividade antioxidante foi avaliada usando os métodos de DPPH, ABTS e complexação do fosfomolibdênio. O extrato de Goiaba apresentou o maior rendimento de compostos fenólicos (532,56 mg EAG g⁻¹), flavonoides totais (406,01 mg EQ g⁻¹), atividade antioxidante pelos métodos DPPH (93,1%) e redução do complexo fosfomolibdênio (1613,3 mg EBHT g⁻¹), demonstrando que esta espécie contém componentes antioxidantes que podem sequestrar radicais livres em condições *in vitro*. Utilizou-se o método de disco difusão para a determinação da atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus fumigatus*. Nos testes de difusão em ágar, todos os extratos, exceto o de Assa-Peixe, revelaram promissores para o desenvolvimento de fito medicamentos inibindo o crescimento de *S. aureus*, com halos que variaram de 13 – 20 mm. Já nos testes de micro diluição todos os extratos foram ativos sobre *S. aureus*, com concentrações que variaram de 3,12 – 12,5 mg/mL, um resultado significativo, considerando que o *S. aureus* é um dos principais causadores de infecções hospitalares. Portanto, os extratos investigados são promissores e suas ações antioxidantes e antibacterianas devem ser minuciosamente estudadas.

Palavras-chave: Doenças Infecciosas. Produtos Naturais. Metabólitos Secundários. Radicais livres. Novos fármacos.

ABSTRACT

Infectious diseases have been a major cause of morbidity and mortality worldwide. Despite the discovery and development of antibiotics, the treatment of these diseases today has not always been successful due to the emergence of antimicrobial resistance. Thus, this study aimed to evaluate the antioxidant activity, the content of phenolic compounds, total flavonoids and the antimicrobial action of six extract of medicinal plants of Cerrado, Boldo (*Peumus boldus*), Goiaba (*Psidium guajava*), Assa-Peixe (*Vernonia polysphaera*), Avocado (*Persea americana*), Balm (*Jatropha multifida*) and Eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*). The content of total phenolics was determined by the Folin-Ciocalteu method and the total flavonoid dosage was performed by the Aluminum Chloride method. Antioxidant activity was assessed using DPPH methods, ABTS, and Phosphomolybdenum complexation. The extract of Guava showed the highest yield of phenolic compounds (532.56 mg EAG g⁻¹), total flavonoids (406.01 mg EQ g⁻¹), antioxidant activity by DPPH (93.1%) and reduction of the complex Phosphomolybdenum (1613.3 mg EBHT g⁻¹), demonstrating that this species contains antioxidant components that can sequester free radicals under *in vitro* conditions. The diffusion disc method was used to determine the antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus*. In the agar diffusion tests, all the extracts, except Assa-Peixe, revealed promising for the development of phytochemicals inhibiting the growth of *S. aureus*, with halos ranging from 13-20 mm. In the micro dilution tests, all extracts were active on *S. aureus*, with concentrations varying from 3.12 - 12.5 mg / mL, a significant result, considering that *S. aureus* is one of the main causes of hospital infections. Therefore, the extracts investigated are promising and their antibacterial e antioxidant actions should be thoroughly studied.

Key words: Infectious diseases. Natural products. Secondary metabolites. Free radicals. New drugs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Total phenolic content of the crude extracts studied.....	40
FIGURA 2. Total flavonoid content of the crude extracts studied.....	40
FIGURA 3. Antioxidant activity of the extracts and BHT standard at concentrations of 100, 250 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ by DPPH method.....	41
FIGURA 4. Antioxidant activity of the extracts and BHT standard at the concentrations of 100, 250 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ by the ABTS method.....	41
FIGURA 5. Total antioxidant capacity of the extracts from the phosphomolybdenum method.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Medicinal plants tested, exsiccate registration, plant organs used and therapeutic use.....	38
TABELA 2. Averages results the antimicrobial activity of the vegetal extracts against <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Aspergillus fumigatus</i>	43
TABELA 3. Mean (n = 3) of the minimal inhibitory concentration (MIC) of bacterial growth of plant extracts against <i>S. aureus</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA%	Atividade antioxidante
ABTS	2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Di-terc-butil metil fenol
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
°C	Graus Celsius
C	Caule
CC	Casca do Caule
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTI	Centro de terapia intensiva
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
Dra	Doutora
e	Etanol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended Spectrum β-lactamases
et al	Do latin et alii - e outros; e colaboradores
F	Folha
FS	Folhas Secas Caídas
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxila
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Km	Quilômetro
Km ²	Quilômetro quadrado
m	Metanol

M	Molar
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MIC	Minimum inhibitory concentration
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
OMS	Organização Mundial de Saúde
OH [•]	Radical hidroxila
O ₂ ^{•-}	Ânion radical superóxido
RNA	Ácido ribonucléico
%	Porcentagem
S	Seiva
SE	Sementes
sh	Solução hidroalcoólica a 90%
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
CFU/mL	Colony forming units
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
YAG	Yeast Agar Glucose

Sumário

CAPÍTULO 1	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Doença fúngica	13
2.1.1 Aspergilose Invasiva	14
2.2 Doenças bacterianas	16
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	17
2.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.3 Antibióticos e multirresistência bacteriana	19
2.4 Cerrado	21
2.5 Produtos naturais como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos	23
2.6 Metabólitos secundários	25
2.7 Antioxidantes	27
REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO 2	38
ABSTRACT	38
1. INTRODUCTION.....	38
2. MATERIALS AND METHOD	39
3. RESULTS AND DISCUSSION	41
4. CONCLUSION	45
REFERENCES	46
CONCLUSÃO	50
ANEXO 01 - Normas para publicação na revista “Current Pharmaceutical Biotechnonology”.	51
APÊNDICE 01 - Ensaio de Citotoxicidade	58

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, infecções bacterianas e fúngicas têm sido uma importante ameaça clínica, com significativa morbidade e mortalidades associadas que são devidos principalmente ao desenvolvimento de multirresistência microbiana frente aos antimicrobianos disponíveis na terapêutica.

Nos últimos anos, com o avanço alcançado no tratamento de pacientes transplantados, com câncer e doença como a AIDS, aumentou-se significativamente a incidência de infecções invasivas, porém, o desenvolvimento de novos antimicrobianos não acompanhou este crescimento.

Apesar da existência de potentes agentes antimicrobianos, os fármacos disponíveis atualmente, estão se tornando cada vez mais ineficientes e as opções terapêuticas estão cada vez mais limitadas, devido ao surgimento de mecanismos de resistência contra estes agentes terapêuticos. Deste modo, a identificação de novos alvos terapêuticos e compostos ativos contra as doenças infecciosas é uma necessidade urgente e o desafio clínico do tratamento se torna ainda maior devido ao desenvolvimento de resistências, toxicidade relacionada com a droga, interações medicamentosas significativas, biodisponibilidade insuficiente, alto custo financeiro e efeitos adversos relevantes.

Portanto, o estudo de plantas medicinais é importante por possibilitar a descoberta de produtos naturais para o desenvolvimento de novos fármacos. As plantas medicinais são uma importante fonte de substâncias químicas com potencial aplicabilidade terapêutica. O Brasil é o país com maior biodiversidade genética vegetal do mundo, existindo uma enorme e inexplorada fonte natural de metabólitos secundários vegetais com inúmeras propriedades químicas e medicinais ainda não reveladas.

O Cerrado constitui o segundo maior bioma da América Latina e um dos mais ricos e ameaçados biomas mundiais, porém, sua diversidade biológica é muito pouco conhecida e estudada. Assim, este estudo visa avaliar a atividade antioxidante e realizar uma triagem da

atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de plantas de ocorrência no bioma Cerrado (Goiaba, Boldo, Eucalipto, Bálsamo, Assa-Peixe e Abacate) sobre bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e o fungo *Aspergillus fumigatus* causadores de infecções hospitalares e comunitárias, com a perspectiva de descobrir novos agentes terapêuticos ou protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. O direcionamento de estudos com espécies vegetais que atuem sobre estes patógenos é uma ferramenta a mais na busca de novas moléculas bioativas a partir de plantas, uma vez que os produtos naturais são fontes promissoras de descoberta de novos agentes terapêuticos.

Considerando o importante impacto na saúde pública ocasionado pelas doenças infecciosas e a falta de terapias efetivas, os principais objetivos deste estudo foram:

- Realizar a seleção de espécies vegetais de ocorrência no Cerrado para estudo de prospecção fitoquímica;
- Obter os extratos vegetais selecionados;
- Dosar o teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e determinar a atividade antioxidante dos extratos vegetais;
- Realizar uma triagem inicial para determinar os extratos vegetais potencialmente ativos sobre o fungo *A. fumigatus* por disco difusão;
- Identificar extratos de plantas do Cerrado com atividade antimicrobiana sobre as bactérias *E.coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* por disco difusão;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos ativos por microdiluição.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Doença fúngica

2.1.1 Aspergilose Invasiva

O gênero *Aspergillus* contém mais de 200 espécies reconhecidas e pode ser encontrado no solo, em alimentos, material orgânico em decomposição e no ar (GARCIA et al., 2013).

Aspergilose é a patologia que pode ser causada por agentes etiológicos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Este gênero compreende várias espécies oportunistas que podem causar doenças invasivas, dentre elas; *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* e *A. terreus*. Entretanto, dentre as espécies causadoras desta doença, aproximadamente 50% a 90% dos casos são provocados pelo *A. fumigatus* (STEINBACH et al., 2012).

Atualmente é o fungo patogênico mais importante transmitido pela via inalatória, é saprófita e capaz de utilizar uma grande variedade de substratos orgânicos como fonte de nutrientes e se adapta bem a vastas condições ambientais. O micélio em contato com o ar forma estruturas especializadas, denominadas conidióforos. Estes produzem um grande número de conídios ou esporos, que são eficientemente dispersos através do ar e inalados pelos seres humanos (MCCORMICK et al., 2010).

Os esporos ao chegarem a um ambiente permissivo, como o pulmão de um paciente com o sistema imunológico comprometido, germinam e tornam-se hifas, a forma invasiva do *Aspergillus*. Apesar do ser humano ser exposto e inalar centenas de conídios diariamente, a maioria das pessoas não desenvolve doença e não apresenta evidências de anticorpos ou imunidade adquirida. Isso sugere que em condições normais a imunidade inata é suficiente para eliminar este microorganismo em indivíduos imunocompetentes (GARCIA et al., 2013).

A barreira física da mucosa é a primeira linha de defesa contra a instalação da patologia, sendo a resposta do hospedeiro é mediada por células do sistema imune inato e por mediadores solúveis. Uma vez que os fungos penetram na mucosa ocorre a ação coordenada entre o sistema imune inato e o adaptativo. É aceito que os linfócitos T desempenham um papel na derrota da aspergilose e das infecções fúngicas invasivas graves (GARCIA, et al., 2013, MCCORMICK et al., 2010).

A aspergilose invasiva está emergindo em indivíduos hospitalizados, principalmente em Centro de Terapia Intensiva (CTI), com condições predisponentes, como usuários de corticosteróides, pacientes com câncer, doença pulmonar obstrutiva crônica, cirrose hepática, infecção por HIV, diabéticos e transplantados (BASSETTI; BOUZA, 2017). A taxa de

mortalidade em indivíduos com condições predisponentes ou imunocomprometidos pode ser tão elevada quanto 40 % entre os pacientes diagnosticados com aspergilose invasiva (STEINBACH et al., 2012).

A anfotericina B, produzida em 1955 a partir do actinomiceto *Streptomyces nodosus*, foi historicamente o fármaco de escolha para o tratamento da aspergilose invasiva (CATALÁN; MONTEJO, 2006). Desde o final da década de 1990, uma série de preparações antifúngicas foi introduzida no mercado e demonstra eficácia semelhante à anfotericina B, mas com menores efeitos colaterais e toxicidade. Estas incluíram a segunda geração de triazóis de largo espectro (voriconazol, itraconazol, posaconazol, isavuconazol) e a equinocandina (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (LEDOUX et al., 2017).

Resistência aos antifúngicos em espécies de *Aspergillus* é uma preocupação crescente. Isto é especialmente alarmante para *A. fumigatus* cuja resistência adquirida foi documentada em pacientes com Aspergilose Invasiva (WIEDERHOLD; PATTERSON, 2015). Portanto, o desenvolvimento de drogas visando o controle de fungos patogênicos tem sido relativamente negligenciado. Deste modo, considerando a falta de um teste diagnóstico confirmatório, específico e sensível, efeitos adversos importantes dos antifúngicos utilizados atualmente na terapêutica, o desenvolvimento de resistência, disponibilidade limitada de drogas antifúngicas e os altos índices de incidência e mortalidade, existe a necessidade urgente de descobrir novos agentes terapêuticos para o tratamento de pacientes com infecções fúngicas invasivas (LOUDON et al., 1994; HOGAN et al., 1996; MASCHMEYER et al., 2007; NEWMAN; CRAGG, 2012; KUBITSCHKE-BARREIRA et al., 2013).

O espectro de ação da anfotericina B é amplo e pode ser observado contra *Aspergillus* spp., *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatidis*, *Absidia* spp, *Mucor* spp e *Rhizopus* (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

No entanto, a incidência de reações adversas produzidas pelo tratamento é elevada. O principal fator limitante para a sua utilização é a nefrotoxicidade. Além disso, o seu uso acarreta efeitos de toxicidade agudo como tremores, febre, calafrio, vômito e dor de cabeça. Além de efeitos crônicos como hipopotassemia e hipomagnesemia em 25% dos pacientes tratados, tromboflebite associada com a sua administração parenteral e distúrbios hematológicos como anemia (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Seu mecanismo de ação se dá pela ligação aos esteróis presentes na parede celular dos fungos. Portanto a afinidade é maior pelo ergosterol das células fúngicas do que pelo colesterol das células mamíferas, deste modo, ligando especificamente com o ergosterol, leva à formação de poros na membrana lipídica. Esta alteração leva a distúrbios na permeabilidade da membrana o que aumenta a perda de íons, ocasionando morte celular (CATALÁN; MONTEJO, 2006).

2.2 Doenças bacterianas

Desde a pré-história os micro-organismos tiveram efeitos devastadores e tem provocado diversas doenças no homem. A partir de 1878, com os trabalhos de Pasteur e Koch e seus contemporâneos, iniciou-se a compreensão de várias enfermidades de origem infecciosa (TAVARES, 2001).

As bactérias são seres unicelulares procarióticas desprovidas de membrana envoltória no núcleo e ribossomos que sintetizam seu próprio DNA, RNA e proteína. São classificadas de acordo com as características estruturais do invólucro bacteriano e identificadas por suas propriedades tintoriais através do corante de Gram. Nas bactérias Gram-positivas, o arcabouço da parede celular é simples constituída por uma espessa camada de peptídeoglicano, que representa 60% de sua composição. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa, com uma fina camada de peptídeoglicano, coberta por uma membrana externa constituída por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e proteínas (COTRAN et al., 2000; TAVARES, 2001).

A incidência de isolados cada vez mais resistentes aos antimicrobianos disponíveis na terapêutica atual vem crescendo tanto no meio hospitalar como no comunitário. As infecções causadas por esses micro-organismos, principalmente nos casos em que ocorrem em pacientes críticos, fazem com que a terapêutica não obtenha êxito, prolongando as internações hospitalares e aumentando a mortalidade (TAN, 2008; BAIDEN et al. 2010).

Os micro-organismos multirresistentes envolvidos em sérios casos de infecção são os mais variados quanto a suas fisiopatologias, sendo os de maior incidência o *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina que são denominados *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* produtoras de enzimas hidrolíticas capazes de inativar

antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos que são denominadas *Extended Spectrum β -Lactamase Producing* (ESBL) e existem também achados de ESBL em bactérias Gram-negativas não fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* (QUEIROZ et al. 2012).

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é uma bactéria esférica do grupo dos cocos Gram positivo, catalase-positivo, com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras). É a bactéria mais comum também em infecções ósseas, artrites sépticas e infecções de próteses ósseas. Essas infecções se caracterizam pela dificuldade de tratamento, que pode incluir intervenções cirúrgicas e longos períodos de antibioticoterapia (SANTOS et al., 2007).

A partir dos anos 50, houve um aumento drástico do número de isolados clínicos de *S. aureus* resistente à penicilina. No início da década de 60 a metilina começou a ser utilizada no tratamento de infecções resistentes à penicilina. Porém, um ano depois foi relatada uma cepa resistente a este antibiótico. Desde então *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) tem sido um patógeno frequente em infecções hospitalares em todo o mundo (BROWN; NGENO, 2007; WURSTER et al., 2018).

Em 1997, foi isolada uma cepa de *S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina (VRSA). Foi observado que cepas resistentes à vancomicina apresentam resistência também à metilina, macrolídeos, aminoglicosídeos e fluorquinolonas o que representa um desafio à terapêutica (LEVY, 2005).

2.2.2 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo, fermentadora de sacarose, anaeróbico facultativo da família *Enterobacteriaceae*, esta bactéria coloniza o intestino do homem algumas horas após o nascimento. É considerada um microrganismo da microbiota normal, mas existem cepas que

podem ser patogênicas e causar danos produzindo quadros clínicos distintos, incluindo diferentes infecções como entéricas, urinárias, bacteremias nosocomiais, síndrome hemolítico-urêmica e colite hemorrágica, utilizando diversas combinações de fatores de virulência (GUADALUPE, 2002).

Estudos têm identificado que enterobactérias produtoras de enzimas capazes de inativar antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (ESBL) é considerado um dos mecanismos mais importantes de resistência bacteriana em Gram-negativos em todo o mundo. A alta prevalência em vários representantes da família de *Enterobacteriaceae*, particularmente em *E. coli*, tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade, vem causando graves problemas de saúde pública. Este aumento de resistência em bactérias Gram-negativas se explica principalmente pela presença de genes móveis em plasmídeos que se disseminam facilmente e ao uso empírico de antimicrobianos (NICOLAS-CHANOINE; JARLIER 2008, FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009).

2.2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

O microrganismo foi isolado pela primeira vez em 1882, sendo uma de suas características a produção de um pigmento esverdeado denominado piocianina. É um bacilo Gram negativo, amplamente distribuída na natureza, tipicamente oportunista, aeróbio, facultativo com mínimas exigências nutricionais, tolera grandes variações de temperatura, vive no ambiente (solo, plantas, frutas e vegetais) e pode causar várias doenças. É um dos principais agentes de infecção em hospitais brasileiros, com elevados índices de morbidade e mortalidade. Infelizmente, com o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, a incidência de cepas isoladas de *P. aeruginosa* com elevada resistência a antibióticos está aumentando e o tratamento clínico destas infecções se torna um desafio no ambiente hospitalar (FERRAREZE et al., 2007; NEVES et al., 2011).

O sistema respiratório é o sítio mais frequente para isolados de *P. aeruginosa* multirresistente, que figura como o patógeno mais associado à aquisição de pneumonia, como mostram recentes pesquisas e sistemas de vigilância. O índice de óbito varia em torno de 50% a 60% dos pacientes infectados (FERRAREZE et al., 2007).

Em pacientes transplantados, a incidência de bacteremia por *P. aeruginosa* varia de 0,5% a 14,4% e as taxas de mortalidade são de até 40%. Aproximadamente 35% de todos os episódios de infecções da corrente sanguínea são bacteremia por *P. aeruginosa*, dos quais 47% são multirresistentes e 63% são extensivamente resistentes a drogas (LIU, ZHANG, WAN, 2018).

No Brasil, a *P. aeruginosa* foi o patógeno mais frequentemente isolado em pacientes com pneumonia hospitalar, a segunda causa mais frequente de infecção urinária e infecção de ferida cirúrgica, e o sétimo patógeno mais comum em infecções da corrente sanguínea. Durante as últimas quatro décadas a incidência por *P. aeruginosa* foi responsável por 10% de todas as infecções de origem hospitalar (FERRAREZE et al., 2007).

Os principais mecanismos relacionados com fenótipos multirresistentes de *P. aeruginosa* em hospitais brasileiros são produção de MBL do tipo SPM-1 e de metilase 16S rRNA RmtD, perda de porina OprD e superexpressão de bombas de efluxo, o que pode explicar os altos índices de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos. A emergência de isolados com essas características é preocupante e ocasiona grande impacto clínico, tendo em vista a escassez de terapias efetivas no tratamento de infecções por esse patógeno (NEVES et al., 2011).

2.3 Antibióticos e multirresistência bacteriana

Substâncias antibióticas ou antimicrobianas constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de plantas ou organismos vivos. São substâncias que em pequenas concentrações, devem possuir atividade inibitória ou letal contra muitas espécies microbianas, e além de prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes devem apresentar estabilidade química e ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, entre outras características (COWAN, 1999).

A história dos antimicrobianos iniciou-se em 1929, quando o cientista Alexander Fleming observou um halo de inibição em uma placa de cultura de *S. aureus* contaminada por um fungo. Essa descoberta levou ao isolamento, elucidação da estrutura, estudos clínicos e comercialização da primeira penicilina, designada Penicilina G (SINGH; BARRETT, 2006).

A introdução das penicilinas revolucionou a prática clínica pois a partir de sua utilização

houve uma redução drástica na mortalidade por doenças infecciosas. Nos anos seguintes a triagem de produtos naturais permitiu a descoberta de novos compostos com ação antimicrobiana, o que resultou na descoberta das classes de antibióticos conhecidas atualmente, das quais destacam-se além das penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, aminoglicosídeos, carbapenêmicos, oxazolidinonas e os glicopeptídeos (SINGH; BARRETT, 2006; TAYLOR et al., 2002).

Atualmente, infecções bacterianas têm sido uma importante ameaça clínica, com significativa morbidade e mortalidades associadas que são devidos principalmente ao desenvolvimento de multiresistência microbiana frente aos antimicrobianos disponíveis na terapêutica (GUSCHIN et al., 2015).

Por isso, a descoberta de novos antibióticos é um objetivo importante. Nas últimas décadas, foram intensificadas as investigações sobre fitoterápicos que possam oferecer tratamento alternativo no controle bacteriano (PUPO et al., 2007). À luz da crescente resistência aos antibióticos, o uso de agentes antimicrobianos derivados de plantas poderá servir como um tratamento alternativo eficaz contra infecções bacterianas (HICKL et al., 2018).

Com uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos provenientes de microrganismos, os antibióticos vegetais podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou inibindo reações e síntese enzimática ou mesmo modificando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005).

Nos últimos anos, o surgimento de microrganismos resistentes tem como causa principal o uso irracional dos antibióticos, a resistência se desenvolve como uma consequência natural da habilidade da população bacteriana de se adaptar. O uso indiscriminado de antibióticos aumenta a pressão seletiva e, também, a oportunidade de a bactéria ser exposta aos mesmos. Facilitando a aquisição de mecanismos de resistência. Ou ainda bactérias sensíveis podem adquirir genes de resistência, provenientes de outras espécies bacterianas através de mutação, seleção e transferência plasmidial de genes de resistência (JANSEN et al., 2006; SKURNIK; ANDREMONT, 2006).

Os mecanismos de resistência devem-se à possibilidade dos microrganismos de produzirem enzimas como as betalactamases, que destroem antibióticos betalactâmicos; expulsarem o medicamento da célula bacteriana por proteínas de membrana denominadas bombas de efluxo, impedindo-o de alcançar o sítio de ação; modificarem o arcabouço da

parede de forma que esta não contenha os locais de ligação aos antibióticos ou ainda sofrerem mutações e reduzirem o número de porinas, dificultando a entrada do antibiótico. Sendo assim, pesquisas voltadas para o estudo e a avaliação de produtos naturais como terapêuticos e principalmente com atividade antimicrobiana devem ser estimulados no intuito de criar novas drogas (TENOVER, 2006).

2.4 Cerrado

O Cerrado ocupa uma área de aproximadamente dois milhões de km², sendo o segundo maior bioma brasileiro, possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo com mais de 7.000 espécies, com alto nível de endemismo e possui 12 % das espécies vegetais do Brasil. Em área total, corresponde a cerca de 20% do território nacional. A destruição dos ecossistemas que o constituem continua de forma acelerada, estima-se que 55% já foram desmatados ou transformados pela ação humana, o que equivale a quase três vezes a área desmatada na Amazônia brasileira (KLINK; MACHADO, 2005).

Principalmente quando comparada ao que se dispõe sobre a Amazônia e a Mata Atlântica, sua diversidade biológica é ainda pouco conhecida e estudada. (BRASIL, 1999; MAURY, 2002). Apesar da riqueza vegetal, o cerrado está sendo rapidamente convertido em cultivo agrícola e pastagem. As transformações ocorridas no bioma também trouxeram grandes danos ambientais – fragmentação de habitats, extinção da biodiversidade, invasão de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos, degradação de ecossistemas, alterações nos regimes de queimadas, desequilíbrios no ciclo do carbono e possivelmente modificações climáticas regionais. Por isso, foi identificado como um dos mais ricos e ameaçados biomas mundiais. A excepcional concentração de espécies endêmicas está vivenciando grande perda de habitat (MYERS et al., 2000; RATTER et al., 1997, KLINK; MACHADO, 2005).

O Cerrado é um bioma com rica biodiversidade, estimado em 160 mil espécies de plantas, fungos e animais (RATTER et al., 1997). Dentre os biomas tipo savanas do mundo, o Cerrado possui a mais rica flora. As taxas de desmatamento têm sido historicamente superiores às da floresta Amazônica e o empenho de conservação deste bioma é muito inferior ao da Amazônia, apenas 2,2% da área do Cerrado se encontra legalmente protegida. Diversas espécies animais e vegetais estão ameaçadas de extinção e calcula-se que 20% das espécies

ameaçadas ou endêmicas não ocorram nas áreas legalmente protegidas (KLINK; MACHADO, 2005).

As principais ameaças à biodiversidade do Cerrado são a degradação dos diversos tipos de vegetação presentes no bioma, a erosão dos solos e a invasão biológica causada por plantas exóticas. O uso do fogo para a abertura de áreas virgens e para estimular o um novo broto das pastagens também é prejudicial, mesmo embora a vegetação do Cerrado possua adaptação ao fogo através da casca grosso do tronco das árvores (KLINK; MACHADO, 2005).

O clima dessa região é estacional, onde um período chuvoso, que dura de outubro a março, é seguido por um período seco, de abril a setembro. O índice médio de precipitação anual é de 1.500 mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 22°C e 27°C em média (KLINK; MACHADO, 2005).

A característica mais comum de sua vegetação é uma formação aberta de árvores e arbustos baixos coexistindo com uma camada rasteira de gramíneas. Existem, entretanto, várias outras fisionomias, indo desde os campos limpos até as formações arbóreas densas e fechadas. As árvores e arbustos grandes, geralmente atingem cerca de 2 a 8 metros de altura, pertencentes a muitas espécies e produzindo 10 a 60% de cobertura do solo. As árvores têm características peculiares, tipicamente com tronco contorcido, casca grossa e folhas rígidas. Algumas são sempre verdes, enquanto outras são decíduas em períodos de estação seca. Muitas das árvores e plantas menores têm flores intensamente coloridas e o Cerrado virgem muitas vezes se assemelha a um jardim selvagem (RATTER et al., 1997, MAURY, 2002).

Este bioma é uma das áreas consideradas mais críticas para a conservação no mundo, devido à riqueza biológica e à elevada pressão antrópica a que vem sendo submetido. Existe uma impressão equivocada de que é um bioma biologicamente pobre, ao contrário, esta é uma das regiões de maior biodiversidade do planeta e cobre 25% do território nacional. Calcula-se que mais de 40% das espécies de plantas lenhosas e 50% das espécies de abelhas sejam endêmicas, isto é, só ocorrem nas savanas brasileiras. Devido a esta excepcional riqueza biológica, o Cerrado, ao lado da Mata Atlântica, é considerado um dos *hotspots* mundiais, isto é, um dos biomas mais ricos e ameaçados do Planeta (MAURY, 2002).

Neste existe uma enorme diversidade de espécies vegetais e habitats diferentes, aproximadamente 44% da sua flora é endêmica, ou seja, nativa e restrita a apenas a este bioma. O número de plantas vasculares é superior aquele encontrado na maioria das regiões

do mundo; plantas herbáceas, arbustivas, cipós e arbóreas somam mais de 7.000 espécies. No entanto, sua rica biodiversidade, geralmente é menosprezada e pouco estudada com o intuito de encontrar novos princípios ativos naturais com potencial terapêutico (MENDONÇA et al., 1998, RATTER et al., 2003).

2.5 Produtos naturais como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos

A busca pelos poderes curativos das plantas é uma idéia antiga que remonta à pré-história. Pessoas em todos os continentes há muito tempo aplicaram cataplasmas e infusões de centenas, se não milhares, de plantas com propriedades medicinais. Historicamente, os resultados terapêuticos foram diversos, resultando diversas vezes em curas ou alívio dos sintomas, entretanto ocorreram também elevadas taxas de envenenamentos (COWAN, 1999).

Um dos fatores de extrema importância para a descoberta de substâncias ativas consiste, principalmente, na interação entre a química e a farmacologia. Neste contexto, os produtos naturais têm atraído à atenção especial de pesquisadores de diversas áreas, em virtude do grande número de micromoléculas biologicamente ativas que podem ser extraídas de plantas medicinais da flora brasileira e que possam ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, nos últimos 20 anos, cerca de 40% dos novos medicamentos introduzidos no mercado foram obtidos tendo como base estudos com protótipos de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2012).

Os produtos naturais e, especialmente as plantas medicinais, possuem grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos empregados na medicina humana. O reino vegetal tem contribuído significativamente para o desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados no tratamento de diversas doenças (NEWMAN; CRAGG, 2012). Vários fármacos sintéticos foram e continuam sendo obtidos a partir de precursores naturais (BALUNAS; KINGHORN, 2005; ELISABETSKY et al., 1995), uma vez que estes representam uma valiosa alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos. Deste modo, as plantas medicinais são uma importante fonte de substâncias químicas com potenciais aplicabilidades terapêuticas.

Adicionalmente, a investigação farmacológica de princípios ativos de plantas medicinais tem proporcionado importantes avanços na abordagem terapêutica de várias patologias, sendo

que várias substâncias encontradas nas plantas têm sido utilizadas como alvos úteis em estudos farmacológicos, fisiológicos e bioquímicos (RATES, 2001; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Por outro lado, a descoberta de produtos naturais bioativos consiste na identificação de novas substâncias que podem servir de modelos (protótipos) para o desenvolvimento de novos fármacos e requer a caracterização das propriedades das moléculas (MONTANARI; BOLZANI, 2001). A partir da descoberta das moléculas naturais “modelo” avalia-se também o potencial farmacológico de seus análogos estruturais, o que permite em muitos casos, selecionar compostos correlatos ainda mais promissores (BARREIRO, 2002; VUORELA et al., 2004).

Antigamente, muitos pesquisadores da área de produtos naturais preocupavam-se principalmente em elucidar as estruturas e propriedades químicas dos metabólitos vegetais sintetizados e/ou isolados. Recentemente, grande número de estudos tem se concentrado na investigação das propriedades biológicas desempenhadas por tais substâncias. Como consequência, diversas classes de metabólitos secundários vegetais, incluindo lignóides, chalconas e auronas, estão sendo “redescobertas”, já que suas potencialidades biológicas estão sendo investigadas por meio do emprego de grande variedade de novos ensaios e metodologias biológicas (DA SILVA FILHO et al., 2004; 2008; VUORELLA et al., 2004; RATES, 2001).

Essa tendência multidisciplinar envolvendo o descobrimento de protótipos naturais, associado às metodologias de modificação estrutural, isolamento e identificação química de constituintes e análogos a partir de novas fontes botânicas, bem como da avaliação das atividades farmacológicas e toxicológicas dessas moléculas demonstram grandes perspectivas para o desenvolvimento racional de novos fármacos (BARREIRO, 2002; VUORELA et al., 2004).

De acordo com Elisabetsky; Moraes (1988) há três diferentes formas para se selecionar as plantas medicinais para estudos farmacológicos: a seleção randômica, onde não há critérios para a escolha das plantas; a seleção quimiotaxonômica ou filogenética, quando as espécies são selecionadas de acordo com uma dada categoria de substâncias químicas de um determinado gênero ou família; e a seleção etnofarmacológica, na qual a seleção das plantas é baseada em seus usos terapêuticos pela medicina popular. De acordo com Souza Brito (1996), se a seleção das plantas para estudos biológicos é feita tendo como base principalmente seu uso medicinal, as chances de sucesso destas pesquisas são ainda maiores.

Estes critérios de seleção são extremamente importantes, já que o Brasil é o país com maior biodiversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies (GUERRA; NODARI, 1999). Além disso, considerando a enorme riqueza da flora do Brasil, que possui 22% das espécies de plantas sobre o planeta, ainda existe uma enorme e inexplorada fonte natural de metabólitos secundários vegetais com inúmeras propriedades químicas e medicinais ainda não reveladas (RATES, 2001).

As pesquisas em química de produtos naturais mostraram grande avanço devido ao emprego de novas abordagens para a seleção e coleta de plantas e à automatização de testes biológicos, que monitorando o isolamento, têm possibilitado a avaliação de grande número de extratos e novas substâncias. As substâncias bioativas isoladas são importantes não só pela sua ação farmacológica, mas, principalmente, pelo papel fundamental que as mesmas representam como modelos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos. Produtos naturais de plantas representam uma das mais importantes fontes de protótipos para as indústrias farmacêuticas, sendo que mais de 40% dos fármacos modernos são derivados de fontes naturais, empregando a própria substância ou seu derivado (JASSIM; NAJI, 2003; CORDELL, 2000; PHILLIPSON, 1994).

2.6 Metabólitos secundários

As plantas produzem dois tipos principais de metabólitos, os primários, ligados diretamente ao crescimento e desenvolvimento do vegetal, tais como aminoácidos, lipídeos e carboidratos e os metabólitos secundários que são distintos dos componentes do metabolismo primário por não serem essenciais para os processos metabólicos básicos da planta e são substâncias produzidas em pequenas quantidades e possuem características químicas variadas e as vezes complexas (DIXON, 2001).

As plantas elaboram uma vasta gama de produtos naturais, muitos dos quais evoluíram para conferir vantagens seletivas e mecanismos de defesa contra ataque microbiano, predação de insetos e animais herbívoros. Além disso, favorecem a atração de polinizadores e dispersores de sementes. Acrescidos a esses fatores os metabólitos secundários proteje o

vegetal de influências ambientais como radiação ultravioleta, temperatura e umidade (DIXON, 2001; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Estima-se que coletivamente as plantas produzam uma variedade de mais de 100.000 metabólitos secundários (DIXON, 2001) e esses compostos são quimicamente subdivididos em três principais grupos: compostos nitrogenados, terpenos e compostos fenólicos (ALVES, 2001; ALONSO, 2004).

Os compostos nitrogenados são provenientes de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano) os quais são derivados do ácido chiquímico, sendo representados, principalmente pela subclasse dos alcaloides. A cafeína, a vincristina e a nicotina são alguns exemplos de compostos nitrogenados (ALVES, 2001).

Os terpenos são representados pelos óleos essenciais e são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato (no cloroplasto), são frequentemente utilizados na indústria farmacêutica, por sua propriedade antibacteriana e alimentícia, como aromatizantes (ALVES, 2001; ALONSO, 2004). Os terpenos são metabólitos secundários altamente enriquecidos em compostos baseados em isopreno e são substâncias líquidas, oleosas, voláteis e aromáticas que conferem fragância as plantas. Eles ocorrem como hemiterpenos (C_5), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). São uma classe de substâncias naturais que possuem atividade antifúngica e o mecanismo de ação envolve a ruptura da membrana lipídica do microrganismo (COWAN, 1999).

Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico, variam muito com relação a sua estrutura química e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São muito utilizados industrialmente na produção de resinas, corantes, na produção de tintas (ácido gálico) e na indústria alimentícia, como antioxidantes. São divididos em três classes: derivados do ácido benzóico e cumárico; flavonóides, isoflavonóides e antocianinas e taninos. No primeiro grupo, encontra-se, por exemplo, as cumarinas, que são substâncias com diversos efeitos biológico (relaxante vascular, anticoagulante, imunossupressor, etc.). Já os flavonóides são compostos responsáveis pela coloração de frutos e flores, além de atuar na dispersão e polinização da planta. Por último, os taninos, que é um grupo de substâncias fenólicas poliméricas capazes de curtir couros ou precipitar gelatina em solução, uma propriedade conhecida como adstringência. São substâncias hidrossolúveis com grande importância terapêutica principalmente pela atividade de coagulação de proteínas. E eles são encontrados

em quase todas as partes das plantas: casca, madeira, folhas, frutos e raízes. Uma de suas ações moleculares é complexar com proteínas através de forças ditas inespecíficas, tais como ligações de hidrogênio e efeitos hidrofóbicos, bem como por formação de ligação covalente (COWAN, 1999; ALVES, 2001; SIMÕES, 2007; TAIZ & ZEIGER, 2009).

O mecanismo de toxicidade dos taninos sobre as células microbianas ocorre por inibição da atividade enzimática, privação de substratos, alteração do metabolismo e a complexação com íons metálicos essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

2.7 Antioxidantes

Espécies reativas de oxigênio (EROs), são encontradas em todos os sistemas biológicos e formadas naturalmente no organismo pelo processo respiratório e pelas inúmeras reações oxidativas das células aeróbicas, sendo que 2 a 3% do oxigênio consumido pela célula são convertidos em radicais livres, que contêm um ou mais elétrons livres em sua órbita (WICKENS, 2001; SILVA et al., 2010).

A principal formação de radicais livres ocorre nas mitocôndrias, onde o oxigênio é reduzido em várias etapas até a formação da água. Os principais produtos intermediários dessas reações são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (WICKENS, 2001).

As EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono gerados podem reagir com oxigênio formando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, propagando a reação. Estes peróxidos podem causar alterações na fluidez e na elasticidade da membrana, e podem levar ao rompimento da célula, principalmente em células perenes, como os neurônios (SOUSA et al., 2007).

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis por afetar os lipídios, as lipoproteínas, os ácidos nucleicos e os carboidratos, podendo vir a acarretar envelhecimento e doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças

cardiovasculares, inflamatórias, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e arteriosclerose (BOROSKI et al., 2015).

Vários estudos demonstram que os extratos e as substâncias isoladas de espécies vegetais apresentam atividade antioxidante, principalmente pela ação dos compostos fenólicos (LI et al., 2009; MARTINS et al., 2015). Atribui-se aos compostos fenólicos, terpenos, alcaloides e aos flavonoides multifuncionalidades como atividades antimicrobianas contra bactérias, vírus e fungos (COWAN, 1999).

Dentre os diversos compostos fenólicos, podem ser mencionados os três grupos principais: ácidos fenólicos, taninos e flavonoides. Os ácidos fenólicos consistem de dois subgrupos: os ácidos hidroxibenzoicos (incluindo ácido gálico e ácido vanílico) e hidroxicinâmicos (como ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cumarínico). Os taninos incluem os ésteres de ácido gálico, como galotaninos e elagitaninos e proantocianidinas. Os flavonoides incluem compostos como flavonóis, isoflavonas, flavonas, flavanonas, flavanóis (catequinas), flavanonóis e antocianidinas (REYNERTSON et al., 2008).

Comparados ao substrato oxidável, os antioxidantes são substâncias presentes em baixas concentrações que retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia que seria danoso para a célula; eles são neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis (SOUSA et al., 2007).

O organismo humano desenvolveu sistemas de defesa para lidar com o estresse oxidativo. Para alcançar uma proteção eficiente, os tecidos dispõem de um sistema antioxidante integrado, que consiste de um arranjo de diversos componentes que inclui sistemas enzimáticos (catalases, superóxido dismutase e glutathione peroxidase/redutase) que são reconhecidamente muito eficientes no sequestro e inibição de ERO. Os principais antioxidantes não-enzimáticos presentes no organismo humano são a melatonina, glutathione, bilirrubina, ácido úrico, coenzima Q, melanina, cisteína e os hormônios sexuais estrogênicos (QIAN; NIHORIMBERE, 2004; McLEAN et al., 2005).

Os compostos antioxidantes são essenciais para a manutenção do equilíbrio do organismo, pois atuam no sequestro de radicais livres produzidos em excesso durante o processo metabólico e, conseqüentemente, previne várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Neste sentido, é crescente o interesse pela investigação de antioxidantes

provenientes de fontes naturais, os quais, ao contrário dos antioxidantes sintéticos, não apresentam efeitos nocivos à saúde (LI et al., 2014).

Os principais antioxidantes naturais são o tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), os carotenóides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides. Esses antioxidantes podem atrasar ou impedir o início ou a propagação de uma reação oxidativa em cadeia e, então, prevenir ou reparar os danos causados pelas EROs às células do organismo, causando um impacto benéfico na saúde humana (BOROSKI et al, 2015).

REFERÊNCIAS

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p. 10-15, 2001.

ALONSO, J. **Tratado de fitofármacos y nutracéuticos**. Rosário, Argentina. Editora Corpus. p.69-72, 2004.

BAIDEN F., OWUSU-AGYEI S., WEBSTER J., et al. The need for new antibiotics. **Lancet**, v. 375, p. 637-638, 2010.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60265-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60265-6)

BALUNAS M.J., KINGHORN A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78(5), p. 431-441, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>

BARREIRO, E.J. Estratégia de simplificação molecular no planejamento racional de fármacos: a descoberta de um novo agente cardioativo. **Química Nova**, v. 25, p. 1172-1180, 2002.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000700018>

BASSETTI, M., BOUZA, E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. **Journal Antimicrobiology Chemother**, v. 72, p. 39-47, 2017.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx032>

BOROSKI, M., VISENTAINER, J. V., COTTICA, S. M., et al. **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticos**, 1ª ed. – Curitiba, Appris, 2015.

BROWN, P. D., NGENO, C. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* from hospital and community sources in southern Jamaica. **International Journal of Infectious Diseases**. v.11, p. 220-225, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2006.04.005>

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. **Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal**. Brasília: 26 p.1999.

CATALÁN M., MONTEJO J. C. Antifungicos sistemicos. Farmacodinamia y Farmacocinetica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 39-49, 2006.
[https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(06\)70012-2](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(06)70012-2)

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery – a simbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, p. 463-480, 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00230-2)

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. et al. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

COWAN M.M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.
<https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>

DA SILVA FILHO, A.A., SILVA, M.L.A.E., CARVALHO, J.C.T., et al. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats. **Journal of Pharmaceutical Pharmacology** v. 56, p. 1179-1184, 2004a.
<https://doi.org/10.1211/0022357044058>

DA SILVA FILHO, A. A., ALBUQUERQUE, S., SILVA, M. L. A. E., et al. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with trypanocidal activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 42–45, 2004b.
<https://doi.org/10.1021/np0302697>

DA SILVA FILHO, A. A.; COSTA, E. S.; CUNHA, W. R., et al. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1307–1310, 2008.
<https://doi.org/10.1002/ptr.2486>

DIXON R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p. 843-847, 2001.
<https://doi.org/10.1038/35081178>

ELISABETSKY E., AMADOR T. A., ALBUQUERQUE R.R., NUNES D.S., CARVALHO A.C. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48(2), p. 77-83, 1995.
[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01287-N](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01287-N)

ELISABETSKY E., MORAES J. A. R. Ethnopharmacology: a technological development strategy. **First International Congress of Ethnobiology**, v. 2, p. 111-118, 1988.

FALAGAS M.E., KARAGEORGOPOULOS D.E. Extended-spectrum β lactamase producing organisms. **Journal Hospital Infection**, v. 73(4), p. 345-354, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.02.021>

FERRAREZE M. V. G., LEOPOLDO V. C., ANDRADE D., et al. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20(1), p. 207-211, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0103-21002007000100002>

GARCIA V. C., VIASUS D., CARRATALA J. Pathogenesis of invasive fungal infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, p. 270-276, 2013.

<https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32835fb920>

GUADALUPE R. A., Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud pública de México**, Cuernavaca , v. 44, n. 5, p. 464-475, 2002.

GUERRA M. P., NODARI R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, locais e éticos. IN: SIMÕES, C.M.O. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre-RS, Editora da UFSC, 1ª edição, p.13, 1999.

GUSCHIN A., RYZHIKH P., RUMYANTSEVA T., et al. Treatment efficacy, treatment failures and selection of macrolide resistance in patients with high load of *Mycoplasma genitalium* during treatment of male urethritis with Josamycin, **BMC Infectious Diseases** v. 15, p. 1-7, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12879-015-0781-7>

HICKL J., ARGYROPOULOU A., SAKAVITSI M.E., et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **PLoS One**, 12; 13(12), 2018.

HOGAN L.H, KLEIN B.S, LEVITZ S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 469-488, 1996.

<https://doi.org/10.1128/CMR.9.4.469>

JANSEN, W.T.M, van der BRUGGEN J.T., VERHOEF J., et al. Bacterial

resistance: a sensitive issue complexity of the challenge and containment strategy in Europe. **Drug Resistance Updates**. v. 9, p. 123-133, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.06.002>

JASSIM S.A, NAJI M.A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95(3), p. 412-27, 2003.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02026.x>

KLINK, C.A., MACHADO, R.B. **A conservação do cerrado brasileiro**. Megadiversidade, 1: 147-155, 2005.

KUBITSCHKE-BARREIRA P.H, CURTY N., NEVES G. W.P., et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, p. 310-350, 2013.

LEDOUX. M. P., TOUSSAINT. E., DENIS. J., et al. New pharmacological opportunities for the treatment of invasive mould diseases, **Journal Antimicrobiology Chemother**, v .72 p. 48–58, 2017.

LEVY, S. B. Antibiotic resistance – the problem intensifies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1446-1450, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.001>

LI, H., HAO, Z., WANG, X., et al. Antioxidant activities of extracts and fractions from *Lysimachia foenum-graecum* Hance. **Bioresource Technology**, v.100, p.970-974, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.021>

LI, SEN., CHEN, GUOWEI., ZHANG, CHAO. et al. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. **Food Science and Human Wellness**, v.3, n. 3-4, p. 110–116, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.11.002>

LIU T., ZHANG Y., WAN Q. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia among liver transplant recipients. **Infectious Drugs Resistance** v.16 (11), p. 2345-2356, 2018.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S180283>

LOUDON K.W., COKE A.P., BURNIE J.P., et al. Invasive aspergillosis: clusters and sources? **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, p. 217-224, 1994.
<https://doi.org/10.1080/02681219480000281>

MARTINS, N., BARROS, L., BUELGA S. C., et al. Invasive aspergillosis: Epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. **Drugs**, v. 67, p. 1567–601, 2015.

MASCHMEYER G., HASS A., CORNELLY O. A. Invasive aspergillosis epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. **Drugs**, v. 67, p.1567- 601, 2007.

<https://doi.org/10.2165/00003495-200767110-00004>

MAURY, C. M. (Org). **Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA, DF. 2002. 404p.

MCCORMICK A., LOEFFLER J., EBEL F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. **Cellular Microbiology**, v. 12(11), p. 1535-1543, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01517.x>

McLEAN, J. A.; KARADAS, F.; SURAI, P.; McDEVITTI, R.; SPEAKE, B. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 141, n. B, p. 366- 372, 2005.

MENDONÇA, R., FELFILI, J., WALTER, B. et al. **Flora vascular do Cerrado**. In: S. Sano & S. Almeida (eds.). Cerrado. Ambiente e flora. pp. 288-556. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa - Cerrados, Planaltina, Brasil. 1998.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p.316-320, 2005.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000400010>

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422001000100018>

MYERS N., MITTERMEIER R. A., MITTERMEIER C. G., FONSECA G. A. B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

<https://doi.org/10.1038/35002501>

NEVES P. R., MAMIZUKA E. M., LEVY C. E., et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000400004>

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural product as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Product**, v. 75, p. 311-335, 2012.

<https://doi.org/10.1021/np200906s>

NICOLAS-CHANOINE M.H., JARLIER V. Extended-spectrum betalactamases in long term care facilities. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 14(1), p. 111-116, 2008.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01862.x>

PHILLIPSON J.D. Natural products as drugs. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.88, Suppl 1, p. S17-9, 1994.

[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(94\)90464-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90464-2)

PUPO, M.T. et al. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, v.30, n.6, p. 1446-1455, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000600014>

QJAN H., NIHORIMBERE V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. **Journal of Zhejiang University Science**. v. 5, n. 6, p. 676-83, 2004.

<https://doi.org/10.1631/jzus.2004.0676>

QUEIROZ G. M., SILVA L. M., PIETRO R. C. L. R., et al. **Revista Brasileira de Clínica Médica**. São Paulo, v. 10(2), 132-138, 2012.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon Journal**, vol. 39, pp. 603-613, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(00\)00154-9](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(00)00154-9)

RATTER J. A., RIBEIRO J. F., BRIDGEWATER S. The brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, 80: 223–230, 1997.

<https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0469>

RATTER, J. A, BRIDGEWATER, S., RIBEIRO, J.F. 2003. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation. III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany** 60: 57-109, 2003.

<https://doi.org/10.1017/S0960428603000064>

REYNERTSON, K.A, YANG, H., YIANG, B., et al. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, n. 4, v.109, p.883-90, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.021>

SANTOS A. L., SANTOS D. O., FREITAS C. C., et al. **Jornal Brasileiro de Patololgia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

<https://doi.org/10.1590/S1676-24442007000600005>

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

[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n° 3, p. 669-682, 2010.

<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n3p669>

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª Edição. Porto Alegre, RS. Editora da UFRGS; Florianópolis, SC. Editora da UFSC, p.519-556; 577-614, 2007.

SINGH, S.B., BARRETT, J.F. Empirical antibacterial drug discovery—Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**. v. 71, p. 1006-1015, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.016>

SKURNIK, D., ANDREMONT, A. Antibiotherapie selectionnante. De la theorie a la pratique. **Réanimation**. v. 15, p. 198-204, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2006.03.002>

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA BRITO A.R.M. How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries. **Journal Ethnopharmacology**, v. 54, p. 131-138, 1996.

[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(96\)01460-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(96)01460-2)

STEINBACH, W.J., MARR, K. A., ANAISSIE, E. J., et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. **Journal of Infection**, n.65, p.453-464, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.08.003>

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; **Fisiologia Vegetal** - 4ª Edição. Porto Alegre – RS. Editora Artmed, p.345-372, 2009.

TAVARES, W. **Manual de antibioticos e quimioterapicos antiinfeciosos**. 3ª ed. Sao Paulo: Atheneu; 2001.

TAYLOR, P.W., STAPLETON, P.D., LUZIO, P.J. New way to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**. v. 7, p. 1086-1091, 2002.

[https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02498-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02498-4)

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**. v. 119 (6A), p. S3-S10, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011>

VUORELA, P., LEINONEN, M., SAIKKU, P., et al. Natural products in the process of finding new drug candidates. **Current Medical Chemistry**, v. 11, p. 1375-1389, 2004.

<https://doi.org/10.2174/0929867043365116>

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, v. 128, p.379–391, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0034-5687\(01\)00313-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5687(01)00313-9)

WIEDERHOLD, N. P., PATTERSON, T. F. Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus*, **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**; v. 36, p. 673–680, 2015.

<https://doi.org/10.1055/s-0035-1562894>

WURSTER J.I., BISPO P.J.M., VAN TYNE D, et al. *Staphylococcus aureus* from ocular and otolaryngology infections are frequently resistant to clinically important antibiotics and are associated with lineages of community and hospital origins. **PLoS One**. v. 6; 13(12), 2018.

CAPÍTULO 2

RESEARCH ARTICLE

Phytochemical Analysis and Evaluation of Antimicrobial Activity of Medicinal Plants Found in the Brazilian Cerrado

Jhonatas Emílio Ribeiro da Cruz^a, Joyce Ferreira da Costa Guerra^a, Guilherme Ramos Oliveira e Freitas^a, Enyara Rezende Morais^{*a}.

^a*Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Campus Patos de Minas, Bloco Palácio dos Cristais, Sala 202, Avenida Getúlio Vargas, 230, Patos de Minas, Minas Gerais, Brazil.*

ARTICLE HISTORY

Received:
Revised:
Accepted:

DOI:

ABSTRACT Background: Currently, the treatment of infectious diseases has not always been successful due to the emergence of microbial resistance worldwide. **Objectives:** This study aimed to evaluate the antioxidant activity, content of total phenolic compounds and flavonoids, antifungal potential and antibacterial action of six medicinal plants found in the Cerrado: Boldo (*Peumus boldus*), Goiaba (*Psidium guajava*), Assa-Peixe (*Vernonia polysphaera*), Abacate (*Persea americana*), Bálsamo (*Jatropha multifida*) and Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). **Method:** The antioxidant activity was also determined through the DPPH, ABTS and phosphomolybdenum assays. In addition, the total phenolic content and flavonoid dosage were analyzed using the Folin-Ciocalteu method and the aluminum chloride test, respectively. **Results and Conclusion:** All extracts, except from Assa-Peixe, showed promising values against *Staphylococcus aureus*, with halos varying from 13–20 mm. Analysis of the minimum inhibitory concentration (MIC) values of the six medicinal plants revealed inhibitory activity of *S. aureus*, with concentrations varying from 3.12–12.5 mg/mL, which is a significant result considering that *S. aureus* is one of the main causes of hospital infections. In the analysis of the phytochemical profile, Goiaba contained the best yield of phenolic compounds (532.56 mg EAG g⁻¹) and total flavonoids (406.01 mg EQ g⁻¹), as well as higher antioxidant activity by DPPH (93.1%) and phosphomolybdenum (1613.3 mg EBHT g⁻¹), demonstrating that this species contains antioxidant components that can sequester free radicals under *in vitro* conditions. Therefore, the extracts investigated are promising and their antibacterial and antioxidant actions should be thoroughly studied.

Keywords: Antioxidants, flavonoids, infectious diseases, natural products, secondary metabolites, new antibiotics.

1. INTRODUCTION

Bacterial and fungal infections are important in clinical settings, with great morbidity and associated mortality due to the development of microbial multiresistance against available antimicrobial agents [1,2,3].

For this reason, the discovery of new antibiotics is an important goal. In recent decades, investigations into herbal medicines that may offer alternative treatment in bacterial control have intensified [4,5].

Natural products are a major source of new antibiotics; they are derived from prokaryotes, animals and plants. Products of plant origin occupy most of the antimicrobial compounds discovered so far [6].

The study of these agents is important in the field of health, since it is searching for substances that are less toxic to patients, more effective against bacterial resistance and capable of combating new pathogens worldwide [7,8].

In order to investigate the phytotherapeutic potential of species found in the Brazilian Cerrado and to encourage the renewable use of these resources, this study carried out the phytochemical screening of secondary metabolites and tested the antimicrobial potential of extracts obtained from plants of Brazilian popular medicine.

Thus, extracts of Boldo (*Peumus boldus*), Goiaba (*Psidium guajava*), Assa-Peixe (*Vernonia polysphaera*), Abacate (*Persea americana*), Bálsamo (*Jatropha multifida*) and Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) were analyzed for their antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, as well as the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*, all of which

*Address correspondence to this author at the Department of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, CEP 38700-128, Patos de Minas, Brazil; Tel/Fax: (34) 99308-6278; (34) 3823-3714. E-mails: ermoraais@ufu.br

are agents of high prevalence in the etiology of infectious processes.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. Collection and Identification of Plants

The selected species were collected in April 2017, at the Olhos D'Água site, Arapuá, Minas Gerais, Brazil, at 19° 02' 02" South, 46° 09' 20" West and 1,031 m of altitude. The materials were identified by Prof. Dr. Terezinha Aparecida Teixeira. Vouchers specimens (Table 1) were deposited in the Uberlandense Herbarium of Biology Institute, Federal University of Uberlândia, Brazil (HUFU).

After collecting and obtaining the plant materials, they were washed in water to remove impurities, and the plant organs were separated and then stored in an ultra-freezer (Coldlab[®], Piracicaba, SP, Brazil) at a temperature of -80°C.

2.2. Obtaining Raw Plant Extracts

For the production of the crude extracts, the collected plants were removed from the ultra-freezer and placed in a freeze dryer to desiccate (Liotop[®] L101, São Carlos, SP, Brazil) for a period of 72 h, then they were ground in a knife mill (Willey[®] Star FT50, Piracicaba, SP, Brazil) to a fine powder state.

The obtained powders were macerated through multiple contacts to ensure the exhaustion of all extractable substances by the solvents. Ethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA), a hydro alcoholic solution of 70% ethanol and methanol (Sigma) were used for extraction. The extractive solutions were filtered and evaporated in a rotary evaporator (Fisatom[®], Perdizes, SP, Brazil) at a temperature between 50–55°C for the total elimination of the solvent (Table 1).

2.3. Phytochemical Screening

2.3.1. Determination of Total Phenolic Content

An aliquot of 0.5 mL of the diluted sample (50 g L⁻¹) was mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma; 0.2 mol L⁻¹). Subsequently, 2 mL of saturated sodium carbonate solution (Sigma; 75 g L⁻¹) was added to the reaction mixture. Absorbance readings were performed at 760 nm after incubation at room temperature for 2 h. Gallic acid (Neon,

Suzano, SP, Brazil) at concentrations of 16.125, 31.25, 62.5, 125 and 250 µg mL⁻¹ was used as the reference standard and the results were expressed in milligrams gallic acid equivalent (mg EAG) per gram of dry weight of plant material. All tests were performed in triplicate [9].

2.3.2. Determination of Total Flavonoid Content

An aliquot of 100 µL of plant extract samples was added to 20 µL of 10% aluminum chloride (Sigma), 20 µL of 1 M potassium acetate (Sigma) and 60 µL of H₂O. The samples were homogenized at room temperature, and after 30 min the absorbance was determined at 415 nm in a spectrophotometer (Gehaka[®] UV-340G, São Paulo, SP, Brazil).

The total flavonoid content was determined using a standard Quercetin (Sigma) curve at six concentration points (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 µg/mL). All analyses were performed in triplicate. Total flavonoid content was expressed as mg equivalents of Quercetin (mg EQ) per gram of extract [10].

2.4. Analysis of Antioxidant Activity

2.4.1. DPPH Radical Capture Method

An ethanolic solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH; Sigma) was prepared at a concentration of 40 µg mL⁻¹. For the evaluation, 2.7 mL of the DPPH solution was added to test tubes, followed by the addition of 0.3 mL of each dilution of the extract (100, 250 and 1000 µg mL⁻¹).

In parallel, the negative control was prepared containing all reagents except the extract. For comparison of the activities, the butylated hydroxytoluene (BHT; Sigma) standard was evaluated. After 60 min, readings were performed using the spectrophotometer at a wavelength of 517 nm. Absorbance values were converted to percentage of antioxidant activity (AA%) [11]. The antioxidant activity was calculated by using the following equation:

$$AA\% = [(A_{cn} - A_{Amo}) / A_{cn}] * 100,$$

where A_{Amo} and A_{cn} are absorbance of DPPH with sample and ethanol, respectively

Table 1. Medicinal plants tested, exsiccate registration, plant organs used and therapeutic use.

Name Scientific	Popular name	Voucher	Plant Organ	Solvent Used	Indication Therapy
<i>Peumus boldus</i>	Boldo	75383	Leaves	Hydrous alcohol solution 70%.	Anti-inflammatory hepatoprotective ^a
<i>Psidium guajava</i>	Goiaba	75385	Leaves	Hydrous alcohol solution 70%.	Wounds, diarrhea, vaginitis ^b
<i>Vernonia polysphaera</i>	Assa-Peixe	75380	Leaves	*Ethanol P.A.	Dermatitis, bronchitis, abscesses ^c
<i>Persea Americana</i>	Abacate	75382	Dry Leaves	Ethanol P.A.	Rheumatism, diuretic, cystitis ^d
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Eucalipto	75384	Leaves	Methanol P.A.	Antifungal, antiseptic and antibacterial ^e
<i>Jatropha multifida</i>	Bálsamo	75381	Raw sap	No solvent used	Healing of infected lesions and wounds ^f

* Pro Analyze. ^a[54], ^b[44], ^{c,d}[66], ^e[48], ^f[51].

2.4.2. ABTS Radical Inhibition Method

For the assay, 10 μL of the extract (100, 250 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and 990 μL of 2,2-azinobis-3-ethyl-benzothiazolin-6-sulfonic acid solution (ABTS; Sigma). The absorbance of a sample containing the same amount of ethanol and a solution of the ABTS radical served as a negative control, and the values of the antioxidant activity of the extracts were compared with the BHT standard. Absorbance results were converted to percentage of antioxidant activity (AA%) [12]. The antioxidant activity was calculated by using the following equation:

$$\text{AA\%} = [(A_{\text{cn}} - A_{\text{Am}}) / A_{\text{cn}}] * 100,$$

where A_{cn} and A_{Am} are absorbance of negative control and sample, respectively.

2.4.3. Phosphomolybdenum Complexation Method

For the preparation of the reaction medium, an aliquot of 100 μL of each extract was conditioned in test tubes, then 1 mL of the reagent (4 mmol L^{-1} ammonium molybdate, 28 mmol L^{-1} sodium phosphate and 0.6 mol L^{-1} sulfuric acid; Sigma) was added to the same tubes.

The tubes were incubated in a 95°C water bath (Cientec[®], Belo Horizonte, MG, Brazil) for 90 min, after which time the reading was carried out at 695 nm. The assays were performed in triplicate, with BHT serving as the reference substance. An analytical curve was constructed with the BHT absorbance values at different concentrations (125, 250, 500, 1000 and 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), thus obtaining the equation of the line that was used to determine the total antioxidant capacity of the samples to be expressed as mg equivalents of BHT per gram of extract [13].

2.5. Antimicrobial Activity of Plant Extracts

2.5.1. Disc Diffusion Method

2.5.1.1. Antifungal Test

To evaluate the antifungal action of the crude extracts, the species *Aspergillus fumigatus*, wild strain CEA17 and devoid of mutations, was used. After counting the spores in a Neubauer chamber under an optical microscope (Leica[®] ICC 50, Barra Funda, SP, Brazil), a volume containing 10^6 spores was calculated, mixed with 60 mL yeast agar glucose medium (YAG; Sigma) and poured into 100 x 10 mm plates, where solidification of the medium containing the spores was expected to proceed. The extracts were diluted and initially tested at concentrations of 500 mg mL^{-1} . The antifungal itraconazole (Sigma) was used as a positive control. As negative control, 100% sterile of dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma), was used.

With the aid of tweezers, sterile paper disks (6mm diameter) were added to the plates that were impregnated with the plant extracts and controls to be tested. At the end, the plates were placed in an oven (Ethik[®] technology, Vargem Grande Paulista, SP, Brazil) at 37°C. The reading

was performed after 72 h, verifying the presence of a zone of growth inhibition. The test was performed in triplicate and the results were presented as the mean of the halo measurements.

2.5.1.2. Antibacterial Test

Strains from the American Type Culture Collection (ATCC) were used for the antibacterial evaluations. The microorganisms used in the tests were *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gram-negative bacillus), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Gram-negative bacillus) and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Gram-positive coccus).

Methodology adopted by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [14] was used. Bacteria were maintained on Mueller-Hinton agar (bioMérieux, Jacarepaguá, RJ, Brazil) incubated for 24 h in a 37°C incubator, then resuspended in 0.85% sterile saline solution and adjusted according to the 0.5 McFarland scale standard (10^8 CFU/mL).

The suspension containing the bacteria was inoculated homogeneously into Petri dishes containing 70 mL of Mueller-Hinton agar. After 15 minutes sterile filter paper discs (6 mm diameter) were deposited on the surface of the culture medium, with a minimum distance of 24 mm between them, 10 μL of the 500 mg/mL diluted extract was deposited on the plates and the plates were incubated at 37°C for 24 h. The tests were performed in triplicate.

2.5.2. Micro Dilution Test

The tested extracts that showed antibacterial activity in the preliminary evaluation were submitted to MIC determination by the broth micro dilution technique (CLSI) [14]. Tests were performed in Luria Bertani medium (LB; Kasvi, São Jose dos Pinhais, PR, Brazil) in a sterile 96-well plate. An aliquot of 10 μL of each extract at concentrations of 1.562, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 and 200 mg/mL was deposited in each well of the plate containing LB medium and suspension of microorganisms to a final volume of 200 μL per well. For the experiment, a negative control (5% DMSO) and a positive control Chloramphenicol (Cecon, São Paulo, SP, Brazil) were performed. The experiment was carried out in triplicate.

The bacterial inoculum was dissolved in saline at a concentration equivalent to the standard 0.5 McFarland scale (10^8 CFU mL^{-1}), diluted 1/10 to obtain the concentration 10^7 CFU mL^{-1} and inoculated into each well of the plate containing the dilutions serial. The plates were incubated at 37°C for 24 h. To indicate bacterial growth, 10 μL of methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT; Sigma) at 0.2 mg mL^{-1} was added to each well and incubated for 4 h. The MIC was defined as the lowest concentration of the extract capable of inhibiting microbial growth.

2.6. Statistical Analysis

For the evaluation of antioxidant, total flavonoid and phenolic content, the experiment was arranged in a completely randomized design for the six types of extracts (three replicates). The statistical program used was the Variance Analysis System for Balanced Data (Sisvar), with data submitted to analysis of variance and the means compared by the Scott-Knott test at a 5% probability level. The Pearson correlation coefficient (ρ) was used to evaluate the relationship between antioxidant activity and amount of total phenolic compounds in the samples.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Phytochemical Screening

The results obtained in the determination of total phenols (FT) by the Folin-Ciocalteu method, expressed as milligrams of gallic acid equivalent (mg GAE g^{-1}) per gram of dry weight of plant material, are presented in (Figure 1).

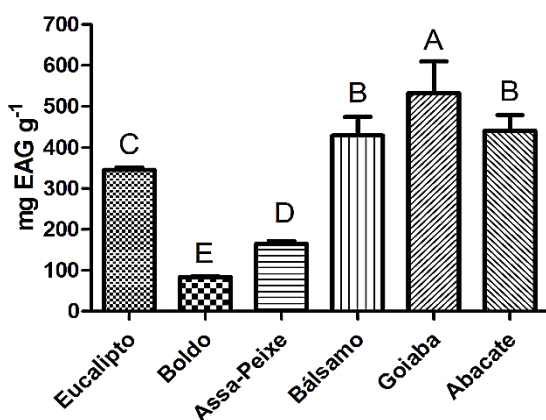


Figure 1. Total phenolic content of the crude extracts studied. Averages followed by the same letter do not differ significantly at 5% probability by the Scott-Knott test.

It was observed that the extracts of Goiaba (532.56 mg EAG g^{-1}) presented the highest level of FT, followed by extracts of Abacate (440.94 mg EAG g^{-1}) and Bálsamo (428.80 mg EAG g^{-1}), which were both statistically similar. There is a highly positive relationship between FT content and antioxidant activity in many plant species [15,16]. This analysis suggests that the metabolites present in these extracts may have a free radical scavenging action and possible antioxidant activity.

The isolated substances of vegetal species present antioxidant activity, mainly by the action of phenolic compounds. These bioactive compounds are associated with the retardation of aging and prevention of various diseases, such as inflammatory reactions, cancer, cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cataract and diabetes [17,18,19].

In this sense, there is a growing interest in the investigation of antioxidants from natural sources, which, unlike synthetic antioxidants, do not present harmful health effects [20,21]. Natural antioxidants become the alternative

targets to minimize and delay the processes of oxidative deterioration [21].

In this study, the Goiaba extract presented the highest FT content, with values of 532.56 mg EAG g^{-1} . In comparison to the results in the literature, one study found higher values in the leaves of Goiaba (575.3 mg EAG g^{-1}) [22]. However, in another study, lower values (154.36 mg EAG g^{-1}) were obtained in the leaf extract of this species [23]. Generally, variations for compounds present in plant extracts may be due to differences in extraction methods, climate variation, temperature and collection time, and even in factors such as plant development and age [24].

The data obtained from the total flavonoid contents of the six tested plant extracts determined by the Aluminum Chloride method (AlCl_3), expressed as milligrams of quercetin equivalent per gram of sample (mg EQ g^{-1}), are shown in (Figure 2).

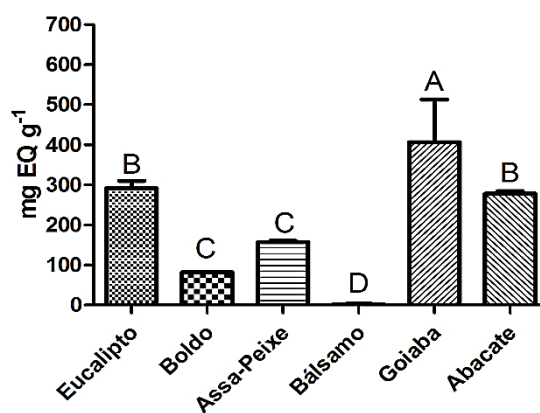


Figure 2. Total flavonoid content of the crude extracts studied. Averages followed by the same letter do not differ significantly at 5% probability by the Scott-Knott test.

Statistical analysis using the Scott-Knott test ($p < 0.05$) showed that the Goiaba extract was the sample with the highest total flavonoid content, with a value of 406.01 mg EQ g^{-1} , followed by extracts from Eucalipto (291.42 mg EQ g^{-1}) and Abacate (277.67 mg EQ g^{-1}), which were both statistically similar.

Furthermore, a significant amount of flavonoids was detected in the leaves of the Goiaba, besides the presence of tannins, saponins, steroids and polyphenols [25]. In general, flavonoids may offer some important therapeutic activities, such as a considerable antitumor action, and may also have an anti-inflammatory, antiviral, antimicrobial and antioxidant effect due to the presence of aromatic hydroxyls [26].

The mechanisms of the antioxidant action of flavonoids occur in three ways: suppression of the formation of reactive oxygen species through enzymatic inhibition, neutralization of reactive oxygen species and enhancement or protection of the antioxidant defense system [27].

3.2. Determination of Antioxidant Activity

Antioxidant activity was determined by the removal of the DPPH free radical from the six tested plant extracts and the BHT standard at concentrations of 100, 250 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the results of which are shown in Figure 3.

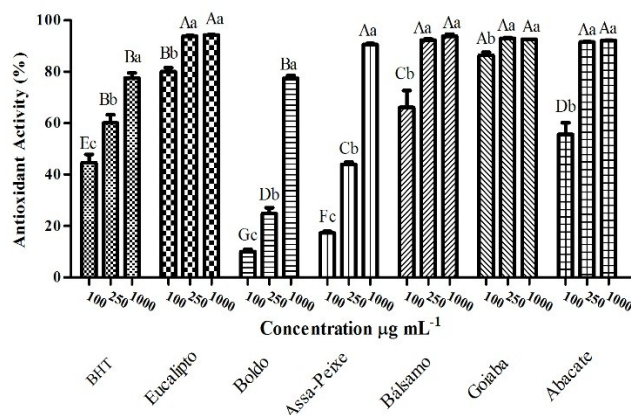


Figure 3. Antioxidant activity of the extracts and BHT standard at concentrations of 100, 250 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ by DPPH method. Mean values followed by the same letter (upper case to compare the concentration between extracts and lowercase to compare the concentration within each extract) did not differ significantly at 5% probability by the Scott-Knott test.

Currently, this method has been widely applied in several samples, such as vegetables, herbs and medicinal plants, as it is a quick and easy method to apply and has a high sensitivity [28]. The results demonstrate that there was antioxidant activity in the extracts tested and that the antioxidant percentage is dose-dependent; that is, as the concentration increases, a higher antioxidant action is obtained.

Extracts that exhibit percentages of antioxidant activity above 70% have a strong ability to sequester free radicals, while those that manifest between 50% and 70% have moderate activity and those below 50%, have poor sequestration capacity [29].

At a concentration of 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the extracts from Abacate (91.5%), Balsamo (92.3%), Goiaba (93.0%) and Eucalipto (93.9%) presented strong antioxidant activity (above 70%), and all showed superior performance compared to the BHT standard (77.5%). However, extracts from Boldo (24.8%) and Assa-Peixe (43.9%) presented weak antioxidant activity (below 50%).

Furthermore, the Goiaba extract was the one that presented the highest level of antioxidant activity at all the tested concentrations, obtaining 86.3%, 93.1 and 92.6%, at concentrations of 100, 250 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. These results can be explained by the considerable concentration of FT in the guava leaf, which have a great capacity to donate electrons to the DPPH radical and stabilize it. Meanwhile, the Boldo and Assa-Peixe extracts

obtained lower action than the BHT standard, probably due to the presence of substances with lower reducing power.

Goiaba leaves are known for their significant chemical constituents, including flavonoids, saponins, steroids, carbohydrates, glycosides and phenolic compounds [25]. While more constituents were reported in another study that found several ellagic tannins, predominating pedunculagin and guavas, the presence of flavonoids such as quercetin and arabino-quercetin were also identified [30].

In a previous study [31], it was proposed that the phenolic compounds and flavonoids may be directly responsible for the sequestration capacity of free radicals in the extract. Phenolic compounds and flavonoids act as antioxidants, not only for their ability to donate hydrogen or electrons, metal chelators, but also because of their stable intermediate radicals, which prevent oxidation.

The results of the quantitative evaluation of the antioxidant activity of the six tested plant extracts and the BHT standard at the various concentrations as determined by the ABTS assay are shown in Figure 4.

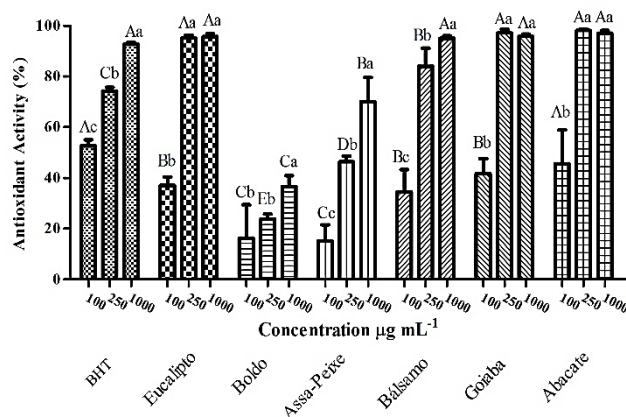


Figure 4. Antioxidant activity of the extracts and BHT standard at the concentrations of 100, 250 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ by the ABTS method. Means followed by the same letter, upper case to compare the concentration between extracts and lowercase to compare the concentration within each extract, did not differ significantly at 5% probability by the Scott-Knott test.

As can be observed, the extracts with the highest antioxidant activity by the ABTS method were also the extracts of Balsamo (84.0%), Eucalipto (95.1%), Goiaba (97.1%) and Abacate (98.1%), all of which were superior when compared to the BHT standard (74.2%). This result is indicative that all tested species can be considered important sources of compounds with antioxidant activity.

Similar to that observed in the DPPH assay, extracts of Assa-Peixe (46.3%) and Boldo (23.8%) also resulted in values lower than the BHT standard when using the ABTS method. This result may be due to the fact that these plants contain other metabolites than phenolic compounds.

The Abacate extract was the one that presented the highest antioxidant activity in all the tested concentrations, obtaining 45.6%, 98.1% and 97.0% at concentrations of 100, 250 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. This suggests that the capacity of free radical sequestration can be explained by the considerable concentration of total phenolic compounds in the leaf of Abacate, a class that was evidenced in this sample. Phytochemical analyses performed on the methanolic extract of Abacate leaves demonstrated the presence of secondary metabolites such as tannins, alkaloids and the presence of flavonoids [32].

The antioxidant activity of the plant extracts in the two tests performed, DPPH and ABTS, was similar, which was expected since both methods have the capacity to measure this activity and both involve the transfer of electrons and atoms of hydrogen [33].

Pearson's correlation coefficient showed a very strong correlation for both the DPPH and total phenolic variables ($\rho = 0.90$), as well as for the ABTS and total phenolic variables ($\rho = 0.93$). Thus, the antioxidant action found in this study was directly related to the presence of phenolic compounds, which have free hydroxylates to neutralize free radicals, and which form an important class of natural antioxidants.

Figure 5 shows the total antioxidant capacity of the six tested plant extracts, as determined by the phosphomolybdenum complexation method, expressed as milligrams of BHT equivalent per gram of sample (mg EBHT g^{-1}).

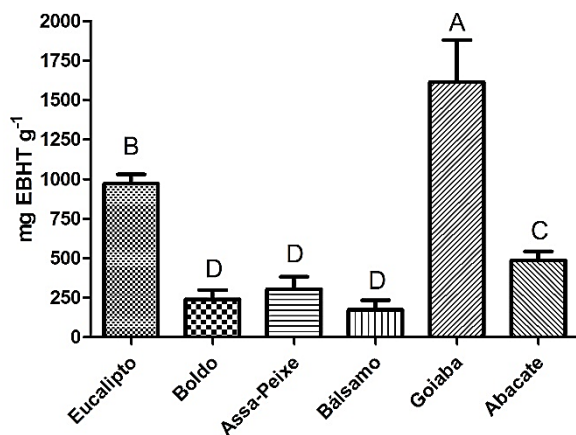


Figure 5. Total antioxidant capacity of the extracts from the phosphomolybdenum method. Mean values followed by the same letter are not significantly at 5% probability by the Scott-Knott test.

By statistical analysis using the Scott test ($p < 0.05$), it was observed that the Goiaba extract was the one with the best total antioxidant capacity, with a value of 1613.3 mg EBHT g^{-1} . The antioxidant activity in the phosphomolybdenum assay may be related to a complex mixture of chemical components with a synergism between them [34].

On the other hand, the extract that exhibited the lowest total antioxidant capacity was Bálamo, with values of 173.3 mg EBHT g^{-1} . After Bálamo were the Boldo and Assa-Peixe leaf extracts, which were statistically similar, with values of 238.9 and 305.5 mg EBHT g^{-1} , respectively.

In analyzing the assays pertaining to groups of secondary metabolites using spectrophotometric methods, it was observed that the Goiaba leaf extract had the highest yields of phenolic compounds (532.56 mg EAG g^{-1}) and total flavonoids (406.01 mg EQ g^{-1}). This high content of phenolic substances is directly related to the higher antioxidant activity, as seen by the methods DPPH (93.1%), ABST (97.1%) and the complex reduction in the phosphomolybdenum assay (1613.3 mg EBHT g^{-1}). These data suggest that the phenolic compounds, particularly the flavonoid class, contribute effectively to the free radical scavenging action in the extract of this species. Other studies have shown a correlation between phenolic content and antioxidant activity [35,36].

3.3. Antimicrobial Activity of Plant Extracts

3.3.1. Disc Diffusion Method

3.3.1.1. Antifungal Test

The crude extracts of the six medicinal plants evaluated were not able to inhibit fungal growth at the tested concentration of 500 mg mL^{-1} . The results obtained in the disk diffusion test with the *A. fumigatus* fungus are shown in Table 2.

In a previous study, the crude aqueous extract of Goiaba was tested against fungi of clinical importance for humans and animals, which were classified into three groups, including dermatophytes (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* and *M. gypseum*), yeasts (*Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*) and filamentous fungi (*Aspergillus niger* and *Penicillium* spp.), demonstrating activity against all strains, with zones of inhibition ranging from 7 to 15 mm [37].

The antifungal activity of the methanolic extract of *Eucalyptus* spp. leaves was verified against *Aspergillus niger* (MIC of $0.47 \pm 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$) and *Aspergillus flavus* (MIC of $0.43 \pm 0.02 \text{ mg mL}^{-1}$) [38]. For the other medicinal plants tested in this work, including Boldo, Assa-Peixe, Abacate and Bálamo, the results were noteworthy, since this is the first report on the evaluation of the antimicrobial potential on fungi using polar solvents to obtain the crude extract.

In the absence of antifungal activity found in this study, it was suggested that this fact may be related to factors such as the polarity of the solvents used for extraction and the class of extracted components, as well as the characteristics of the cell surface of *A. fumigatus*. In the preparation of the extracts, solvents like water-ethanol, methanol and ethanol were used for the extraction of the bioactive compounds; that is, polar solvents were used, which have the capacity to extract phenolic compounds, tannins and some types of flavonoids that are hydrophilic compounds.

It is believed that this was one of the reasons why none of the plant extracts used in this study demonstrated efficiency against the fungus tested. Several studies suggest that lipophilicity could be an influential factor in the fungicidal activity of fungus-targeted drugs, in which an increase in lipophilicity increases the toxicity of the compounds in fungi [39], mainly due to the lipophilic structures present on the surface of *A. fumigatus*.

In addition, the conidia of *A. fumigatus* have on their surface structures with hydrophobic proteins called "rodlets" which may make them less susceptible to the natural substances present in the plant extracts, and consequently, may have diminished the interaction of the extract substances with the fungal surface [40].

3.3.1.2. Antibacterial Test

In the determination of antibacterial activity, the six crude extracts were tested at a concentration of 500 mg mL⁻¹ against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Table 2).

For the interpretation of the sensitivity tests, the results are expressed in terms of the inhibition halo diameter: < 9 mm is resistant (R); 9 mm to 12 mm is intermediate (I); > 12 mm is sensitive (S) [41].

According to the parameters described in a previous study [41], all tested plant extracts, except from Assa-Peixe, presented antimicrobial activity, with inhibition halos varying from 13–20 mm. Such activity was observed with Gram-positive *S. aureus* species (ATCC 25923), a significant finding when *S. aureus* is often resistant to a variety of well-known antibiotics [3]. The positive result with Gram-positive bacteria is more common to verify, since they are more sensitive to plant metabolites. Other authors confirm the results found in this experiment [42].

On the other hand, for the Gram-negative species *E. coli* (ATCC 25922) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) the

extracts showed no antibiotic action, which may be related to the lower susceptibility of Gram-negative bacteria to plant extracts, probably due to the more complex structure of its cell wall, which is largely responsible for the impermeability and natural resistance to the penetration of antibiotic molecules.

In this study, it was observed that for the Goiaba extract greater antibiotic action against the strain *S. aureus* (ATCC 25923), with a formation of halo of inhibition of 20 mm. Another study, also using the agar diffusion method, however using a 50% hydroalcoholic extract of the leaves of Goiaba, found sensitivity to *S. aureus* bacteria, with a halo of inhibition of 21 mm, with no action against *E. coli* (ATCC 25922) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) [43].

Goiaba has been used for the treatment of several diseases that suggest bacterial activity, such as respiratory and genitourinary infections [44]. In the species, there is a great variety of active principles against microorganisms, including tannins and flavonoids [25]. The antimicrobial properties of tannins are well known. One of its molecular actions is to form complexes with proteins through hydrogen bonds and covalent bonds [45]. Thus, the inhibition of enzymes that are essential for bacterial metabolism may occur, leading to the death of the microorganism. The flavonoids have antimicrobial activity, whose mechanism of action is probably due to their ability to complex with the cell wall of bacteria [46].

In our study, comparing the phytochemical profile of the leaves of Goiaba with that of the other species, it was observed that the extract contained the highest concentration of flavonoids (406.01 mg EQ g⁻¹) and phenolic compounds (532.56 mg EAG g⁻¹). Therefore, considering the presence of such compounds that have proven antimicrobial activity, we conclude that the antimicrobial activity of this extract may be related to the presence of these compounds.

Table 2. Averages results the antimicrobial activity of the vegetal extracts against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Aspergillus fumigatus*.

Plant extracts (500 mg/mL)	Microorganisms			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. fumigatus</i>
	Result of the antimicrobial activity			
Boldo F ^a (e) ^b	S 13	R	R	R
Goiaba F (sh)	S 20	R	R	R
Assa-Peixe F (sh)	I 11	R	R	R
Abacate FS (m)	S 15	R	R	R
Eucalipto F (m)	S 19	R	R	R
Bálsamo S	S 15	R	R	R
Ampicillin 10 µg ^c	- ^g	17	-	-
Aztreonam 30 µg ^d	-	-	25	-
Erythromycin 15 µg ^e	23	-	-	-
DMSO 5% ^f	R	R	R	R
Itraconazole 100 mg mL ^{-1h}	-	-	-	8

^a F: Leaves; S: Sap; FS: Fallen dried leaves. ^b e: Ethanol; m: Methanol; sh: 70% Hydroalcoholic solution. ^c: Positive control for *E. coli*. ^d: Positive control for *P. aeruginosa*. ^e: Positive control for *S. aureus*. ^f: Negative control. ^g: Has not been tested or does not apply to this bacterial strain. ^h: Positive control for *A. fumigatus*. R = Resistant (halo of inhibition < 9mm), I = Intermediate (there was weak development of inhibition halo, between 9 and 12 mm), S = Sensitive (development of inhibition halo > 12 mm).

Eucalipto extract also expressed antibiotic action against the strain *S. aureus* (ATCC 25923), with a 19 mm halo of inhibition. This plant species is considered useful in medicinal areas, with antifungal, antiseptic and antibacterial properties. It has also been widely used as an effective treatment for sore throats, bronchitis and pneumonia [47,48].

Similar results were obtained in another study, in which the authors reported the antibacterial properties of Eucalipto extract against *S. aureus* ATCC strain, with a 9 mm inhibition halo, as well as against *E. coli* ATCC strain, with a 4 mm halo of inhibition, although they found no inhibition of *P. aeruginosa* ATCC [49]. This result confirms those obtained in this study, but there is a divergence in the size of the halos, which could be explained by the methodology applied in obtaining the extracts or by the concentration at which it was used.

Bálsamo latex revealed antibiotic activity against *S. aureus* (ATCC 25923), with an inhibition halo of 15 mm. In popular medicine, there are reports on the use of Bálsamo latex for the treatment of infected wounds and skin infections. This species produces abundant amounts of colorless sap and is known by the popular names Coral-flower, Bálsamo and Mertiolate [50,51]. Therefore, this study indicates that this species has antibiotic action, corroborating its popular use in the treatment of infections. Further, a 50% aqueous solution of Bálsamo latex also displayed a weak activity for *E. coli* and *Pseudomonas* sp. that were isolated from wounds [52].

Antibiotic activity was also noted for the extract of Abacate against *S. aureus* (ATCC 25923), with an inhibition halo of 15 mm. However, in another study, which also used the agar diffusion method and 20% hydroalcoholic extract of Abacate leaves, a sensitivity to *S. aureus* was found, with a halo of 24 mm, but there was no inhibition of *E. coli* and *P. aeruginosa* [43]. This disparity in results can most likely be explained by the technique used to obtain the extract, or due to the origin of the plant. The phytochemical composition of the Abacate leaves is very diverse and has large amount of tannins, saponins and flavonoids [53].

For the Boldo extract, there is an large antibiotic action against *S. aureus*, with a halo of 13 mm. In popular medicine, Boldo is used as anti-inflammatory, antipyretic, hepatoprotective and antioxidant [54]. Its leaves are endowed with several secondary metabolites, among them flavonoids, essential oils and alkaloids [55].

In our study, none of the extracts revealed activity against the Gram-negative species *E. coli* and *P. aeruginosa*, most likely due to the structure of its more complex cellular wall. The lipopolysaccharides of the outer membrane have a negative charge, which is largely responsible for the antimicrobial resistance. The penetration of hydrophobic molecules is quite slow, contributing to the natural resistance to many antibiotics [56].

The structure of the cell wall of Gram-positive *S. aureus* species is less complex and is hydrophilic, which causes many antibiotics, disinfectants and antiseptics to penetrate it [57]. The results found in this study confirm the antibacterial action of all plants, except Assa-Peixe, against *S. aureus*.

3.3.2. Micro Dilution Test

Plants with antimicrobial activity at minimum inhibitory concentrations (MICs) of less than 100 mg mL⁻¹ are considered relevant for research on therapeutic substances [58].

Therefore, the results obtained in this study for Bálsamo latex (3.12 mg mL⁻¹) and crude extracts of Abacate (3.12 mg mL⁻¹), Eucalipto (6.25 mg mL⁻¹), Boldo (6.25 mg mL⁻¹), Assa-Peixe (6.25 mg mL⁻¹) and Goiaba (12.5 mg mL⁻¹) against *S. aureus* infer antimicrobial properties at concentrations of less than 100 mg mL⁻¹. Therefore, there is a potential for obtaining antimicrobial drugs from these plants (Table 3).

Table 3. Mean (n = 3) of the minimal inhibitory concentration (MIC) of bacterial growth of plant extracts against *S. aureus*.

Plant extracts	<i>S. aureus</i>
	Antimicrobial activity (MIC mg mL ⁻¹)
Boldo F ^a (e) ^b	6.25
Goiaba F (sh)	12.50
Assa-Peixe F (sh)	6.25
Abacate FS (m)	3.12
Eucalipto F (m)	6.25
Bálsamo S	3.12
Chloramphenicol 30 mg mL ⁻¹ ^c	1.56
DMSO 5% ^d	- ^e

^a Used parts: F - Leaves; S: Sap; FS: Fallen Leaves. ^b solvents: e: ethanol; m: methanol; sh: 70% hydro alcoholic solution. ^c Positive control for *S. aureus*. ^d Negative control. ^e Did not inhibit growth.

Bálsamo sap exhibited a lower MIC of 3.12 mg mL⁻¹. In a previous study, the MIC for the crude sap of Bálsamo was 12.5 mg mL⁻¹ against *S. aureus* [59]. The importance of this result should be emphasized, since *S. aureus* is involved in the etiology of skin infections and wounds, as well as still being responsible for serious infections, such as meningitis and pneumonia [60,61]. This difference in MIC results can probably be explained by the technique of obtaining the extract or by the origin of the plant.

In this study, an MIC of 12.5 mg mL⁻¹ was observed for the hydrous alcohol extract of Goiaba against the *S. aureus* pathogen. However, in the literature, the foliar methanolic extract of Goiaba when tested against *S. aureus* revealed considerable antibiotic potential *in vitro*, presenting an MIC of 0.025 mg mL⁻¹ [62], confirming those obtained in this study. The divergence in the MIC can be explained by the solvent used. Considering this, a solvent of more hydrophilic

character, like methanol, has a greater capacity for extraction of phenolic compounds and, consequently, greater antimicrobial action.

For medicinal purposes, Goiaba leaves are used for the treatment of gastrointestinal, inflammatory, vaginal problems, respiratory diseases, diseases caused by microorganisms, treatment of wounds, ulcerations and skin infections, among other diseases [44,63].

The antibacterial activity of Goiaba against *S. aureus* can be correlated with the chemical composition of the extract, in regard to the groups of the components. The chemical constituents contained in the ethanolic extract of leaves from the city of Ujjain, India were isolated and later tested to evaluate the antimicrobial action against *S. aureus*, and the results indicate that the compounds hexaeicosan-16-ol and nonacosan-23-ene -3-ol presented a recognized antibacterial action against *S. aureus* [64].

The methanolic extract of Abacate showed activity against *S. aureus* with a MIC of 3.12 mg mL⁻¹. Confirming this finding the MIC for the ethanolic extract of 96.4% of the leaves of Abacate from the southern region of Brazil was 0.2 mg mL⁻¹ against *S. aureus* [65]. It can be stated that both results presented strong activity against *S. aureus*, since the two MICs were less than 100 mg mL⁻¹ [58]. This difference in MIC may be related to the origin of the plants or the solvent used to obtain the extract.

Abacate leaves are used in traditional medicine as an antidiarrheal and anti-infective for the kidneys and bladder. Also homemade alcoholic extract, prepared with its dry leaves, is indicated for external use for rheumatic pains, bruises and headaches [66,67]. The results confirm the ethnomedicinal use with antimicrobial purpose of this plant, justifying the empirical medical indications of infections caused by *S. aureus*.

The methanolic extract of Eucalipto (*E. citriodora*) showed antimicrobial activity up to the lowest concentration of 6.25 mg mL⁻¹ against *S. aureus*. This result is noteworthy, since in the literature there were no data found regarding the antimicrobial activity of this species. However, there were reports of studies testing other species, such as in previous work [68], where the antimicrobial activity of 26 Eucalipto strains was tested, of which *E. robusta* extracts (MIC of 31.0 mg mL⁻¹) and *E. maculata* (MIC of 3.9 mg mL⁻¹) inhibited the growth of Gram-positive bacteria, among them *S. aureus* and *Enterococcus faecalis*.

In this study, antibacterial activity at an MIC of 6.25 mg mL⁻¹ was observed for the Boldo ethanolic extract against *S. aureus*. The results of a previous study demonstrate the action of the Boldo extract against *S. aureus* up to the concentration of 100.0 mg mL⁻¹ [69]. In popular medicine, leaf teas made from this plant are ingested as an infusion and

are indicated for the treatment of poor digestion, hepatic disorders and urinary tract infections [70]. Considering the antimicrobial activity displayed in this study by the Boldo extract, as also indicated in the literature, it was concluded that its popular use and the empirical medicinal indications of this plant for infections are justified.

The hydrous alcohol extract of Assa-Peixe also displayed antimicrobial activity against *S. aureus* until the lowest concentration of 6.25 mg mL⁻¹. These results are consistent with previous research which presented an MIC for the crude Assa-Peixe extract of 10.0 mg mL⁻¹ for the same pathogen, yet it did not show antibiotic activity against *E. coli* [71]. Phytochemical analyses of their tissues revealed the presence of alkaloids, flavonoids and simple phenols, among others [72]. In homemade medicine, the leaves of Assa-Peixe in decoction are used for the treatment of bronchitis and persistent cough. Its external use for skin conditions, muscular pain and rheumatism in the form of compresses of crushed fresh leaves has also been reported [66]. The results from this study confirm these ethnomedicinal uses, suggesting an antimicrobial purpose for this plant.

Information based on ethnopharmacological studies is of great value in the search for new substances with therapeutic potential [73]. The *in vitro* antimicrobial activity of the plant extracts tested in this study is in line with their ethnomedicinal uses, which has been an important tool in the discovery of new drugs. The results presented here are significant because the *S. aureus* bacterium is among the main agents that cause hospital infections, such as infections of surgical sites, pneumonia and bacteremia [74,75].

However, although these extracts are considered promising, further investigations into the clinical evidence of their efficacy are necessary. It is also important to emphasize that for the medicinal use of these plants as antimicrobials, future studies, such as those related to cytotoxicity, *in vivo* pharmacokinetics and clinical trials, should be performed.

4. CONCLUSION

Based on the investigation into its phytochemical profile, the Goiaba extract showed the highest content of phenolic compounds and total flavonoids among the tested plant species. Taking these findings into account, it is reasonable to say that the antioxidant activity obtained by Goiaba is expressive and is related to these two groups of metabolites. In addition, the other results suggest that the six evaluated plants displayed *in vitro* antibacterial activity against *S. aureus*, with promising MIC values. Such a finding is relevant, considering that *S. aureus* is often resistant to a variety of widely known antibiotics. The results indicate the clinical importance of the evaluation of alternative means and economically viable compounds for the control of infectious diseases. In this context, further research is

suggested for the possible use of these substances in therapeutics.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that the content of this article represents no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

Cruz, J.E.R, thanks the Universidade Federal de Uberlândia for the excellent teaching service offered. The authors are grateful to Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Federal de Uberlândia (PROPP-UFU) for the support provided.

REFERENCES

- [1] Guschin, A.; Ryzhikh, P.; Rumyantseva, T.; Gomberg, M.; Unemo, M., Treatment efficacy, treatment failures and selection of macrolide resistance in patients with high load of *Mycoplasma genitalium* during treatment of male urethritis with josamycin. *BMC Infect Dis* **2015**, *15*, 40.
- [2] Bassetti, M.; Bouza, E., Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2017**, *72* (suppl_1), i39-i47.
- [3] Wurster, J. I.; Bispo, P. J. M. A.-O. h. o. o.; Van Tyne, D.; Cadorette, J. J.; Boody, R.; Gilmore, M. S., *Staphylococcus aureus* from ocular and otolaryngology infections are frequently resistant to clinically important antibiotics and are associated with lineages of community and hospital origins. **2018**, (1932-6203 (Electronic)).
- [4] Pupo, M. T.; Gallo, M. B. C.; Vieira, P. C., Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. *Quím. Nova* **2007**, *30* (6), 1446.
- [5] Ramos S. R.; de Albuquerque Sarmento, P.; Lins, T. H.; Martins Leite Lúcio, I.; Conserva, L. M.; de Assis Bastos, M. L., Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *Zeyheria tuberculosa*. *Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste* **2012**, *13* (5).
- [6] Berdy, J., Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **2005**, *58* (1), 1-26.
- [7] Barbosa-Filho, J. M.; Nascimento Júnior, F. A. d.; Tomaz, A. C. d. A.; Athayde-Filho, P. F. d.; Silva, M. S. d.; Cunha, E. V.; Souza, M. d. F.; Batista, L. M.; Diniz, M. F., Natural products with antileprotic activity. *Rev. bras. farmacogn.* **2007**, *17* (1), 141-148.
- [8] Hickl, J.; Argyropoulou, A.; Sakavitsi, M. E. A.-O. h. o. o. X.; Halabalaki, M.; Al-Ahmad, A.; Hellwig, E.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, A. L.; Wittmer, A.; Vach, K.; Karygianni, L. A.-O. h. o. o., Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. **2018**, 1932-6203 (Electronic)).
- [9] Singleton, V. L.; Rossi, J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16* (3), 144-158.
- [10] Hossain, M. A.; Rahman, S. M., Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International* **2011**, *44* (3), 672-676.
- [11] Guimarães, L. G. d. L.; Cardoso, M. d. G.; Sousa, P. E. d.; Andrade, J. d.; Vieira, S. S., Antioxidant and fungitoxic activities of the lemongrass essential oil and citral. *Rev. Ciênc. Agron.* **2011**, *42* (2), 464-472.
- [12] Antunes, M. D.; Dandlen, S.; Cavaco, A. M.; Miguel, G., Effects of postharvest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit. *J Agric Food Chem* **2010**, *58* (10), 6173-81.
- [13] Prieto, P.; Pineda, M.; Aguilar, M., Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry* **1999**, *269* (2), 337-341.
- [14] CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*. 27 ed.; Wayne, PA, USA, **2017**; Vol. Approved standard M100.
- [15] Chen, H.-Y.; Yen, G.-C., Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food chemistry* **2007**, *101* (2), 686-694.
- [16] Sousa de Sá, P. G.; Leite Guimarães, A.; de Oliveira, A. P.; de Siqueira Filho, J. A.; Paviotti Fontana, A.; Damasceno, F.; Kauanna, P.; Cardoso Branco, C. R.; Branco, A.; Guedes da Silva Almeida, J. R., Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (*Selaginellaceae*). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* **2012**, *33* (4).
- [17] Rocha, E.; Sartori, R.; Navarro, F., A aplicação de alimentos antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo. *Revista Científica da FHO-UNIARARAS* **2016**, *4* (1), 19-26.
- [18] Nascimento, K. S. d. Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande do Sul. Universidade de São Paulo, **2016**.
- [19] Silva, C. M. S., R.A.; Cavalcante, C.F.C., Os benefícios da nutrição na prevenção do

- envelhecimento cutâneo. *Revista Conexão Eletrônica* **2016**, 13(1).
- [20] Li, S.; Chen, G.; Zhang, C.; Wu, M.; Wu, S.; Liu, Q., Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Science and Human Wellness* **2014**, 3 (3-4), 110-116.
- [21] Falcão, H. R. d. C., Síntese e caracterização de novo antioxidante fenólico derivado da biomassa da castanha de caju (LCC-técnico) para biodiesel por método eletroanalítico. **2016**.
- [22] Ojan, H.; Nihorimbere, V., Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava*. *Journal of Zhejiang University of Science* **2004**, 5, 676-683.
- [23] Chen, H.-Y.; Lin, Y.-C.; Hsieh, C.-L., Evaluation of antioxidant activity of aqueous extract of some selected nutraceutical herbs. *Food chemistry* **2007**, 104 (4), 1418-1424.
- [24] Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P., Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova* **2007**, 30 (2), 374.
- [25] Thenmozhi, S.; Rajan, S., GC-MS analysis of bioactive compounds in *Psidium guajava* leaves. *Journal of pharmacognosy and phytochemistry* **2015**, 3 (5), 162-166.
- [26] Zuanazzi, J. A. S. M., J. A.; Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5 ed.; Porto Alegre, RS., **2005**.
- [27] Pietta, P. G., Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* **2000**, 63 (7), 1035-42.
- [28] Boroski, M.; Visentainer, J.; Cottica, S.; Morais, D., Antioxidantes: princípios e métodos. *Appris*: **2015**.
- [29] de Almeida Melo, E.; Maciel, M. I. S.; de Lima, V. L. A. G.; do Nascimento, R. J., Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2008**, 44 (2), 193-201.
- [30] Lozoya, X.; Meckes, M.; Abou-Zaid, M.; Tortoriello, J.; Nozzolillo, C.; Arnason, J. T., Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch Med Res* **1994**, 25 (1), 11-5.
- [31] Sonal, A. P., S. , Evaluation of antioxidant potential of a functional food formulation comprising *Psidium guajava* fruit, *Juglans regia* L. Fruit and whey. *Advances in Research in Pharmaceutical Biology* **2012**, 2(1).
- [32] Asaolu, M.; Asaolu, S.; Fakunle, J.; Emman-Onon, B.; Ajayi, E.; Togun, R., Evaluation of in-vitro antioxidant activities of methanol extracts of *Persea americana* and *Cnidiosculus aconitifolius*. *Pak J Nutr* **2010**, 9 (11), 1074-1077.
- [33] Prior, R. L.; Wu, X.; Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* **2005**, 53 (10), 4290-302.
- [34] Balestrin, L.; Dias, J. F. G.; Miguel, O. G.; Dall'Stella, D. S.; Miguel, M. D., Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiflora* Miquel (*Moraceae*) com abordagem em atividade antioxidante. *Rev Bras Farmacogn* **2008**, 18, 230-235.
- [35] Campos, R.; de oliveira, V. B.; paula, C. D. S.; Pontarolo, R.; dias, J. D. F. G.; Miguel, M. D.; Warumby, S. M.; Zanin, O. G. M., Multivariate analysis between the phytochemical features and antioxidant properties of the stems of *Bauhinia glabra* Jacq. (FABACEAE). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2014**, 6 (8), 151-155.
- [36] Veber, J.; Petrini, L.; Andrade, L.; Siviero, J., Determinação dos compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de Jambolão (*Syzygium cumini* L.). *Rev. bras. plantas med.* **2015**, 17 (2), 267-273.
- [37] Suwanmanee, S.; Kitisin, T.; Luplertlop, N., *In vitro* screening of 10 edible Thai plants for potential antifungal properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**.
- [38] Elansary, H. O.; Salem, M. Z. M.; Ashmawy, N. A.; Yessoufou, K.; El-Settawy, A. A. A., *In vitro* antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Eucalyptus spp.* leaf extracts related to phenolic composition. *Nat Prod Res* **2017**, 31 (24), 2927-2930.
- [39] Wedge, D.; Galindo, J.; Macias, F., Fungicidal activity of natural and synthetic sesquiterpene lactone analogs. *Phytochemistry* **2000**, 53 (7), 747-757.
- [40] Pasqualotto, A. C., Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Med Mycol* **2009**, 47 Suppl 1, S261-70.
- [41] Alves, T. M.; Silva, A. F.; Brandao, M.; Grandi, T. S.; Smania, E.; Smania Junior, A.; Zani, C. L., Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **2000**, 95 (3), 367-73.
- [42] Eller S. C. W.; Feitosa, V. A.; Arruda, T. A.; Antunes, R. M. P.; Catão, R. M. R., Avaliação antimicrobiana de extratos vegetais e possível interação farmacológica in vitro. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences* **2015**, 36 (1).
- [43] Gonçalves, A. L., Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais. **2007**.

- [44] Braga, M. F. B. M. *Composição química e avaliação da atividade antifúngica de extratos de Psidium guajava L. (goiabeira) e Psidium brownianum Mart. Ex Dc. (araçá de vado) sobre espécies de Candida*. Thesis (PhD in Ethnobiology and Nature Conservation) - Federal Rural University of Pernambuco, PE, **2016**.
- [45] Cowan, M. M., Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **1999**, *12* (4), 564-82.
- [46] Tsuchiya, H.; Sato, M.; Miyazaki, T.; Fujiwara, S.; Tanigaki, S.; Ohya, M.; Tanaka, T.; Iinuma, M., Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology* **1996**, *50* (1), 27-34.
- [47] González-Quevedo Rodríguez, M., Acción antibacteriana del extracto fluido de *Eucalyptus citriodora* Hook: estudio in Vitro. *Rev. cuba. med. mil* **1994**, *23* (1), 3-6.
- [48] Vaghasiya, Y.; Nair, R.; Chanda, S., Antibacterial and preliminary phytochemical and physico-chemical analysis of *Eucalyptus citriodora* Hk leaf. *Natural product research* **2008**, *22* (9), 754-762.
- [49] Nair, R.; Vaghasiya, Y.; Chanda, S., Antibacterial activity of *Eucalyptus citriodora* Hk. oil on few clinically important bacteria. *African Journal of Biotechnology* **2008**, *7* (1).
- [50] Kosasi, S.; Van Der Sluis, W. G.; Labadie, R., Multifidol and multifidol glucoside from the latex of *Jatropha multifida*. *Phytochemistry* **1989**, *28* (9), 2439-2441.
- [51] Buch, D. R.; Arantes, A. B.; Campelo, P. M. S., Verificação da atividade cicatrizante do exudato de folhas de *Jatropha multifida* L. *Rev Bras Farm* **2008**, *89*, 142-145.
- [52] Ongtengco, D. C., The in vitro antibacterial activity of *Jatropha multifida* Linn. latex against common bacterial wound isolates. *Acta Manila Ser A* **1992**, *40* (0), 25-28.
- [53] Ogundipe, O.; Oladipupo, B., The phytochemical and antimicrobial studies of *Persea americana* Mill.(Lauraceae). *Hamdard Med* **2001**, *44*, 44-50.
- [54] Srivastava, A.; Tandon, P.; Ayala, A.; Jain, S., Solid state characterization of an antioxidant alkaloid boldine using vibrational spectroscopy and quantum chemical calculations. *Vibrational Spectroscopy* **2011**, *56* (1), 82-88.
- [55] Schmeda-Hirschmann, G.; Rodriguez, J.; Theoduloz, C.; Astudillo, S.; Feresin, G.; Tapia, A., Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). *Free radical research* **2003**, *37* (4), 447-452.
- [56] Denyer, S. P.; Maillard, J. Y., Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *Journal of applied microbiology* **2002**, *92*, 35S-45S.
- [57] Lambert, P. A., Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**, *57* (10), 1471-85.
- [58] Chavasco, J. M.; Felipe, P. E.; Muniz, B. H.; Cerdeira, C. D.; Leandro, F. D.; Coelho, L. F. L.; Silva, J. J. d.; Chavasco, J. K.; Dias, A. L. T., Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais cerrado. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* **2014**, *56* (1), 13-20.
- [59] Suffredini, I. B.; Varella, A. D.; Younes, R. N., Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration results from three selected antibacterial plant extracts from the Amazon. *Rev Inst Ciênc Saúde* **2007**, *25* (2), 131-2.
- [60] Santos, A. L. d.; Santos, D. O.; Freitas, C. C. d.; Ferreira, B. L. A.; Afonso, I. F.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C., *Staphylococcus aureus*: visiting a strain of clinical importance. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2007**, *43* (6), 413-423.
- [61] Tong, S. Y.; Davis, J. S.; Eichenberger, E.; Holland, T. L.; Fowler, V. G., *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews* **2015**, *28* (3), 603-661.
- [62] Madduluri, S.; Rao, K. B.; Sitaram, B., In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extract against five bacterial pathogens of human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2013**, *5* (4), 679-684.
- [63] Chandra, K. A.; Wanda, D., Traditional Method of Initial Diarrhea Treatment in Children. **2017**, (2469-4207 (Electronic)).
- [64] Mehta, B.; Nigam, R.; Nigam, V.; Singh, A., Isolation & antimicrobial screening of ten long chain aliphatic compounds from *Psidium guajava* (leaves). *Asian Journal of Plant Science and Research* **2012**, *2* (3), 318-322.
- [65] Reis, M. O. R. *Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of the leaves' hydroalcoholic extract Persea gratissima Gaertn - avacateiro - (Laraceae)*. MSc Dissertation in health promotion, University: Franca 2006.
- [66] Panizza, S., *Plantas que Curam (Cheiro de Mato)*, . 3 ed.; São Paulo, **1998**.

- [67] Christian, E. O.; Okwesili Fc, N.; Parker, E. J.; Okechukwu Pc, U., Acute Toxicity Investigation and Anti-diarrhoeal Effect of the Chloroform-Methanol Extract of the Leaves of *Persea americana*. **2018**, (1735-0328 (Print)).
- [68] Takahashi, T.; Kokubo, R.; Sakaino, M., Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in applied microbiology* **2004**, 39 (1), 60-64.
- [69] de Sá Azevedo, R. R.; Almeida, V. G. A.; Silva, E. M. F.; de Lira Silva, A.; da Silva Gomes, N. R.; da Silva Matias, T. M.; de Souza, L. I. O.; dos Santos, A. F., Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás. *Revista Semente* **2013**, 6 (6).
- [70] Matos, F. d. A.; Sousa, M.; Matos, M.; Machado, M.; Craveiro, A., Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de plantas medicinais brasileiras. *Editora UFC, Fortaleza* **2004**.
- [71] Brasileiro, B. G.; Pizziolo, V. R.; Raslan, D. S.; Jamal, C. M.; Silveira, D., Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **2006**, 42 (2), 195-202.
- [72] Bouzada, M. L. M. I. Fabri, R.L.I.; Garcia, G.D.; Scio, E.I. , Antimicrobial and cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. Resumos XIII Congresso Ibero-Americano de Plantas Medicinais, Havana, Cuba. *Revista Cubana Planta Médica* **2004**.
- [73] Raza, M., A role for physicians in ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of ethnopharmacology* **2006**, 104 (3), 297-301.
- [74] Van Hal, S. J.; Jensen, S. O.; Vaska, V. L.; Espedido, B. A.; Paterson, D. L.; Gosbell, I. B., Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical microbiology reviews* **2012**, 25 (2), 362-386.
- [75] Chatterjee, A.; Rai, S.; Guddattu, V.; Mukhopadhyay, C.; Saravu, K., Is methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection associated with higher mortality and morbidity in hospitalized patients? A cohort study of 551 patients from South Western India. **2018**, (1179-1594 (Print)).

CONCLUSÃO

Neste estudo ficou demonstrado, que o maior teor de compostos fenólicos com o uso do reagente Folin-Ciocalteu e o de flavonoides totais com o uso do reagente cloreto de alumínio foram verificados para o extrato das folhas de Goiaba, sendo assim, esta planta pode ser apontada como boa fonte de antioxidantes naturais.

Os resultados mostraram que o extrato de Goiaba demonstrou o maior potencial antioxidante entre as espécies vegetais testadas. E neste sentido este extrato possui características que viabilizam futuros estudos sobre seus constituintes bioativos para verificação da atividade biológica com base na presença dos constituintes fitoquímicos relevantes, como compostos fenólicos e flavonoídicos.

Dentre o que foi exposto, verifica-se que as pesquisas envolvendo agentes antioxidantes em espécies vegetais devem continuar, pois as mesmas se mostram de suma importância tanto para a indústria alimentícia quanto para a indústria farmacêutica. Neste sentido, sob o ponto de vista da indústria farmacêutica, a busca é por substâncias com potencial farmacológico quanto aos aspectos funcionais no combate aos radicais livres e todos os possíveis males que podem causar à saúde humana.

Além disso, este estudo demonstrou, que as seis plantas medicinais apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* sobre *S. aureus*, tanto pela técnica de difusão em ágar quanto por microdiluição. Tal achado é significativo, quando se considera que *S. aureus* é frequentemente resistente a uma variedade de antibióticos comerciais bem conhecidos. Este achado é promissor e estimula sua continuidade, na perspectiva de que se possa isolar e caracterizar compostos com atividade antimicrobiana, que sirvam no futuro como fonte ou protótipo para o desenvolvimento de um novo fitofármaco.

ANEXO 01 - Normas para publicação na revista “Current Pharmaceutical Biotechnonology”.

Manuscript preparation

The manuscript should be written in English in a clear, direct and active style. All pages must be numbered sequentially, facilitating in the reviewing and editing of the manuscript.

Sections in manuscripts

Manuscripts submitted for research and review articles in the journal should be divided into the following sections:

- Title
- Title page
- Structured Abstract
- Graphical Abstract
- Keywords
- Text Organization
- Conclusion
- List of Abbreviations (if any)
- Consent for Publication
- Conflict of Interest
- Acknowledgements
- References
- Appendices
- Figures/Illustrations (if any)
- Chemical Structures (if any)
- Tables (if any)
- Supportive/Supplementary Material (if any)

Title

The title of the article should be precise and brief and must not be more than 120 characters. Authors should avoid the use of non-standard

abbreviations and question marks in titles. The first letter of each word should be in capital letters except for articles, conjunctions and prepositions.

Authors should also provide a short 'running title'. Title, running title, byline, correspondent, footnote and keywords should be written as presented in original manuscripts.

Title Page

Title page should include paper title, author(s) full name and affiliation, corresponding author(s) names complete affiliation/address, along with phone, fax and email.

Structured Abstract

The abstract of an article should be its clear, concise and accurate summary, having no more than 250 words, and including the explicit sub-headings (as in-line or run-in headings in bold). Use of abbreviations should be avoided and the references should not be cited in the abstract. Ideally, each abstract should include the following sub-headings, but these may vary according to requirements of the article.

- Background
- Objective
- Method
- Results
- Conclusion

Keywords

Choose important and relevant keywords that researchers in your field will be searching for so that your paper will appear in a database search. 6 to 8 keywords must be provided.

Text Organization

The main text should begin on a separate page and should be divided into separate sections. The manuscript should be divided into title page, abstract and the main text. The text may be subdivided further according to the areas to be discussed, which should be followed by the Acknowledgements and Reference sections. For Research articles the manuscript should begin with the title page and abstract followed by the main text, which must be structured into

separate sections as **Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Ethics Approval and Consent to Participate, Human and Animal Rights, Conflict of Interest, Acknowledgements and References**. The Review article should mention any previous important old and recent reviews in the field and contain a comprehensive discussion starting with the general background of the field. It should then go on to discuss the salient features of recent developments. For Letters articles, the manuscript should begin with the title page and abstract followed by the main text, which must be structured into separate sections as **Introduction, Materials and Methods, Conclusion, Acknowledgements and References**. The authors should avoid presenting material which has already been published in a previous review. The authors are advised to present and discuss their observations in brief. The manuscript style must be uniform throughout the text and 10 pt Times New Roman fonts should be used. The full term for an abbreviation should precede its first appearance in the text unless it is a standard unit of measurement. The reference numbers should be given in square brackets in the text. Italics should be used for Binomial names of organisms (Genus and Species), for emphasis and for unfamiliar words or phrases. Non-assimilated words from Latin or other languages should also be italicized e.g. *per se*, *et al.* etc.

Section headings

Section headings should be numbered sequentially, left aligned and have the first letter capitalized, starting with the introduction. Sub-section headings however, should be in lower-case and italicized with their initials capitalized. They should be numbered as 1.1, 1.2, *etc.*

Introduction

The Introduction section should include the background and aims of the research in a comprehensive manner.

Materials and methods

This section provides details of the methodology used along with information on any previous efforts with corresponding references. Any details for further modifications and research should be included.

Experimental

Repeated information should not be reported in the text of an article. A calculation section must include experimental data, facts and practical development from a theoretical perspective.

Results

Results should be precise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, present a reproducible procedure and emphasize the importance of the article in the light of recent developments in the field. Extensive citations and discussion of published literature should be avoided.

The Results and Discussion may be presented together under one heading of “Results and Discussion”. Alternatively, they may be presented under two separate sections (“Results” section and “Discussion” Sections). Short sub-headings may be added in each section if required.

Conclusion

A small paragraph summarizing the contents of the article, presenting the final outcome of the research or proposing further study on the subject, may be given at the end of the article under the Conclusion section.

Greek Symbols and Special Characters

Greek symbols and special characters often undergo formatting changes and get corrupted or lost during preparation of manuscript for publication. To ensure that all special characters used are embedded in the text, these special characters should be inserted as a symbol but should not be a result of any format styling (*Symbol* font face) otherwise they will be lost during conversion to PDF/XML.

Authors are encouraged to consult reporting guidelines. These guidelines provide a set of recommendations comprising a list of items relevant to their specific research design. Chemical equations, chemical names, mathematical usage, unit of measurements, chemical and physical quantity & units must conform to SI and Chemical Abstracts or IUPAC. All kinds of measurements should be reported only in International System of Units (SI).

Appendices

In case there is a need to present lengthy, but essential methodological details, use appendices, which can be a part of the article. An appendix must not exceed three pages (Times New Roman, 10 point fonts, 900 max. words per page). The information should be provided in a condensed form, ruling out the need of full sentences. A single appendix should be titled APPENDIX, while more than one can be titled APPENDIX A, APPENDIX B, and so on.

Supportive/supplementary material

We do encourage to append supportive material, for example a PowerPoint file containing a talk about the study, a PowerPoint file containing additional screenshots, a Word, RTF, or PDF document showing the original instrument(s) used, a video, or the original data (SAS/SPSS files, Excel files, Access Db files etc.) provided it is inevitable or endorsed by the journal's Editor.

Supportive/Supplementary material intended for publication must be numbered and referred to in the manuscript but should not be a part of the submitted paper. In-text citations as well as a section with the heading "Supportive/Supplementary Material" before the "References" section should be provided. Here, list all Supportive/Supplementary Material and include a brief caption line for each file describing its contents.

Any additional files will be linked to the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the paper. They will be made available in exactly the same form as originally provided only on our Web site. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet). Supportive/Supplementary material must be provided in a single zipped file not larger than 4 MB.

Authors must clearly indicate if these files are not for publication but meant for the reviewers'/editors' perusal only.

List of Abbreviations

If abbreviations are used in the text either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided.

References

References must be listed in the ACS Style only. All references should be numbered sequentially [in square brackets] in the text and listed in the same numerical order in the reference section. The reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Some important points to remember

- All references must be complete and accurate.
- All authors must be cited and there should be no use of the phrase *et al.*
- Date of access should be provided for online citations.
- Journal names should be abbreviated according to the Index Medicus/MEDLINE.
- Punctuation should be properly applied as mentioned in the examples given above.
- Superscript in the in-text citations and reference section should be avoided.
- Abstracts, unpublished data and personal communications (which can only be included if prior permission has been obtained) should not be given in the references section. The details may however appear in the footnotes.
- The authors are encouraged to use a recent version of EndNote (version 5 and above) or Reference Manager (version 10) when formatting their reference list, as this allows references to be automatically extracted.

Tables

- Data Tables should be submitted in Microsoft Word table format.
- Each table should include a title/caption being explanatory in itself with respect to the details discussed in the table. Detailed legends may then follow.
- Table number in bold font *i.e.* Table **1**, should follow a title. The title should be in small case with the first letter in caps. A full stop should be placed at the end of the title.
- Tables should be embedded in the text exactly according to their appropriate placement in the submitted manuscript.

- Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell are displayed as black lines.
- Tables should be numbered in Arabic numerals sequentially in order of their citation in the body of the text.
- If a reference is cited in both the table and text, please insert a lettered footnote in the table to refer to the numbered reference in the text.
- Tabular data provided as additional files can be submitted as an MS Excel spreadsheet.

APÊNDICE 01 - Ensaio de Citotoxicidade

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo Celular

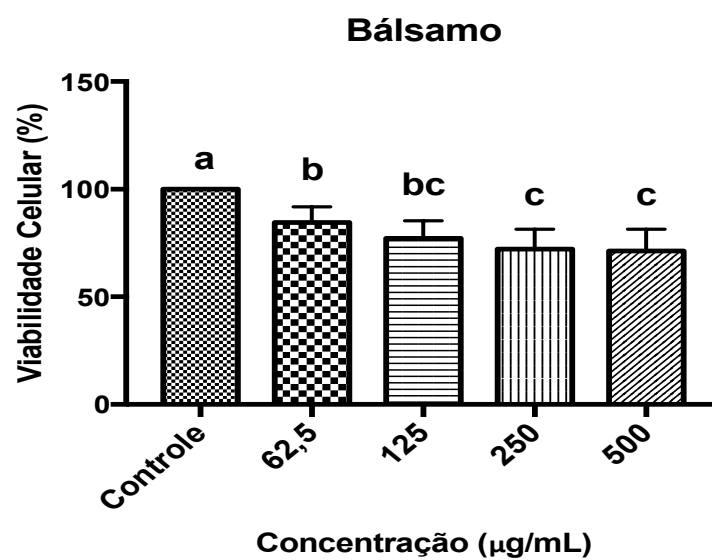
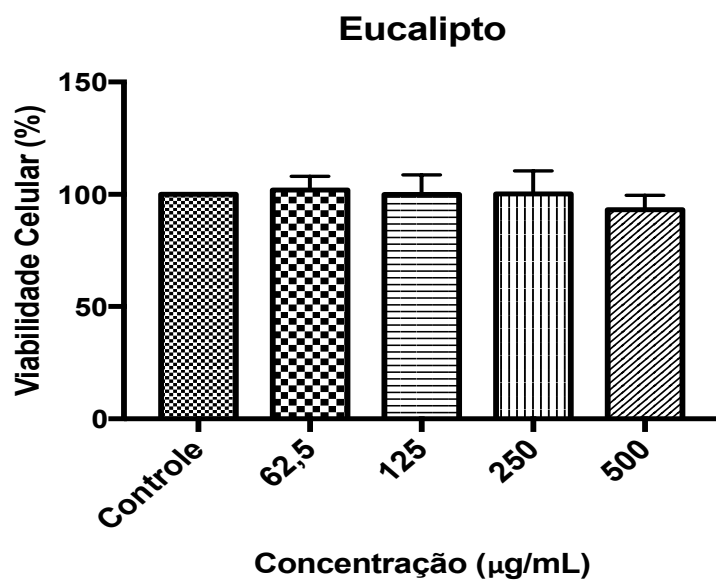
As células hepáticas humanas da linhagem contínua HepG2 foram mantidas em meio DMEM, com 10% de soro fetal bovino (SFB), gentamicina (50 µg/ml), penicilina potássica (200 U/ml) e fungizona (2,5 µg/ml), incubadas em estufa a 37°C, sob atmosfera umidificada a 5% de CO₂. Os subcultivos foram realizados em intervalos de 3 dias após adesão das células, utilizando-se solução de tripsina/EDTA.

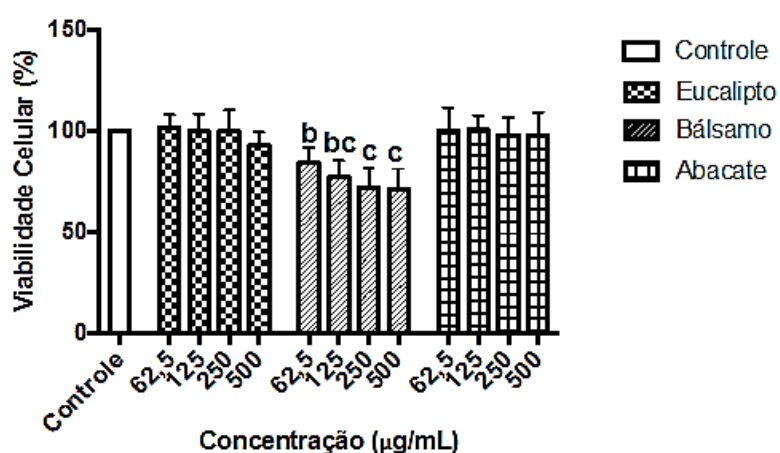
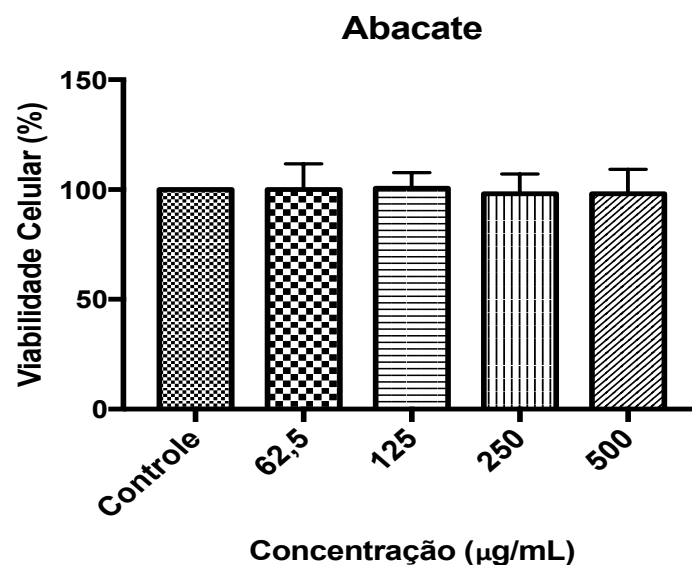
Determinação da viabilidade celular

A técnica de MTT é um ensaio quantitativo, colorimétrico e de fácil execução. O método baseia-se na redução do MTT a cristais de formazan de cor azul, através da ação da succinato desidrogenase. A quantidade de cristais de formazan formados é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983). As células da linhagem HepG2 ($0,5 \times 10^5$ /mL) foram semeadas em microplacas de 96 poços com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas por 24 horas em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 37°C, para adesão. As células foram então submetidas aos tratamentos com os extratos nas concentrações de 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL por 24 horas. Após esse período o sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Posteriormente, foi adicionada solução contendo 5 mg mL⁻¹ de MTT em DMEM e as placas foram incubadas por 4 h a 37 °C. A solução de MTT foi então removida e 200 µL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 560 nm. Os dados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação a controle. De acordo com a *International Standard Organization* (ISO 10993-5)

um extrato é considerado citotóxico quando a viabilidade celular é menor ou igual a 70%.

RESULTADOS





Apenas o extrato da seiva bruta de bálamo apresentou diferenças significativas entre os grupos, no entanto nenhum extrato apresentou efeito citotóxico nas concentrações testadas, uma vez que de acordo com a *International Standard Organization* (ISO 10993-5) um extrato é considerado citotóxico quando a viabilidade celular é menor ou igual a 70%.

	% de viabilidade celular (média ± desvio padrão)			
	62,5	125	250	500
Eucalipto	102 ± 6,04	99,95 ± 8,79	100 ± 10,33	93,24 ± 6,28
Bálamo	84,62 ± 7,20	77,17 ± 8,17	72,17 ± 9,28	71,37 ± 10,03
Abacate	100 ± 11,66	100 ± 7,2	98,12 ± 8,92	98,1 ± 11,11

Referências

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10993-5:1999 (E) - Biological evaluation of medical devices - **Part 5: tests for in vitro cytotoxicity**. 3 ed. Gêneze: ISO; 2009.