



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS
EXTRATOS FRACIONADOS DE CASCA E FOLHA DA
Schinopsis brasiliensis ENGLER. ATRAVÉS DE ANÁLISE
COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM
DISCO E DE CAVIDADE EM PLACA**

SUELLEN EMILLIANY FEITOSA MACHADO

CAMPUS I
Campina Grande/PB, 2012.

Suellen Emilliany Feitosa Machado

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FRACIONADOS DE CASCA E FOLHA DA *Schinopsis brasiliensis* ENGLER. ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM DISCO E DE CAVIDADE EM PLACA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em forma de Artigo Científico ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadores: Prof^o Dr. Delcio de Castro Felismino (UEPB/CCBS/DB)

MSc. Thiago Pereira Chaves (Doutorando,UEPB/UFRPE/URCA).

Campina Grande, PB
Novembro, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

- M149a Machado, Suellen Emilliany Feitosa.
Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados de casca e folha da *Schinopsis Brasiliensis* Engler. através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa. [manuscrito] / Suellen Emilliany Feitosa Machado. – 2012.
27 f. : il.
- Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.
- “Orientação: Prof. Dr. Délcio de Castro Felismino, Departamento de Biologia.”
1. Etnobotânica. 2. Braúna. 3. Fitoterapia. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

Suellen Emilliany Feitosa Machado

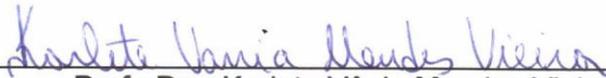
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
FRACIONADOS DE CASCA E FOLHA DA *Schinopsis brasiliensis* ENGLER.
ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE
DIFUSÃO EM DISCO E DE CAVIDADE EM PLACA

Aprovado(a) em: 23/11/12

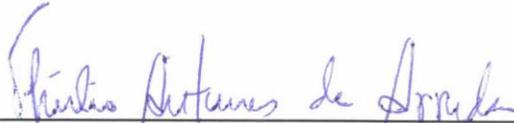
BANCA EXAMINADORA:



Profº Dr. Delcio de Castro Felismino
Depto. Biologia/CCBS/UEPB
Orientador



Profa Dra. Karlete Vânia Mendes Vieira
Depto. Farmácia/CCBS/UEPB
Examinadora



Profº Dr. Thúlio Antunes de Arruda
Depto. Farmácia/CCBS/UEPB
Examinador

A DEUS, fonte inesgotável de fé e perseverança, por ser sempre justo e bondoso, por me permitir a conclusão deste curso e por sua infinita misericórdia,

À MINHA FAMÍLIA, pelo amor incondicional, por sempre acreditar na minha capacidade de conquistar os meus objetivos, pelas palavras amigas sempre presentes e pelo constante incentivo na realização dos meus sonhos,

AOS MEUS AMIGOS, aqueles que sempre estiveram ao meu lado, me encorajando a nunca desistir e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A **Deus**,
pelos dons da vida e da sabedoria. Aquele que é meu porto seguro, que me acalma nos momentos de desespero e angústias e que nunca permitiu que eu desistisse dos meus objetivos. A Tua força divina é quem comanda os meus passos!

Aos meus pais, **Salves e Rosália**,
meus anjos que sempre me guiaram. Serei eternamente grata pelos ensinamentos passados ao longo da vida. Vocês são o meu maior exemplo de união, companheirismo e, principalmente, amor! Se hoje sou vitoriosa, é porque vocês me ensinaram que não existem limites quando se tem fé. Muito obrigada por TUDO!

Ao meu amigo e orientador deste trabalho e de tantos outros, **Delcio**.
Sempre te agradecerei pelo incentivo à pesquisa. Muito obrigada pelos inúmeros conhecimentos que foram passados e pela paciência para orientar meus passos. Conseguimos, 'filhinho'!

Ao meu irmão, **Sávio Samuel**,
pelas sábias palavras sempre proferidas nos momentos mais difíceis, por ser meu exemplo de inteligência e, principalmente, paciência. Muito obrigada pelo incentivo!

Ao meu amigo e namorado **Paulo Victor**,
pela cumplicidade, companheirismo, paciência, incentivo e pelo amor que tens por mim. Obrigada por se fazer sempre presente, mesmo estando tão distante (fisicamente). Ter você ao meu lado é muito mais que um presente e essa vitória também é sua!

Aos professores, **Thúlio e Karlete**,
por aceitarem participar da banca avaliadora deste trabalho. É uma honra tê-los presentes neste momento. Vocês são exemplos de verdadeira paixão pela nossa profissão, sem contar no carisma de ambos.

Aos meus inúmeros **amigos**,
que participaram ativamente ou não da realização deste sonho. Sempre soube que nunca estive só, pois o apoio dado por cada um foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Vocês são a minha fortaleza!

“Antes de chorar sobre os limites que possui, antes de reclamar de suas inadequações, e fadar o seu destino ao fim, aceita o desafio de pousar os olhos sobre este aparente estado de fraqueza, e ouse acreditar, que mesmo em estradas de pavimentações precárias, há sempre um destino que poderá nos levar ao local onde o sol se põe tão cheio de beleza”.

(Fábio de Melo)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FRACIONADOS DE CASCA E FOLHA DA *Schinopsis brasiliensis* ENGLER. ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM DISCO E CAVIDADE EM PLACA

Suellen Emilliany Feitosa Machado¹; Delcio de Castro Felismino²

Devido ao limitado espectro de ação dos antimicrobianos e dos seus efeitos indesejáveis, necessita-se descobrir novas terapias. Estudos buscam novos fármacos, sendo as pesquisas com substâncias vegetais boas perspectivas. A *Schinopsis brasiliensis* Engler. (braúna) é popularmente utilizada como fitoterápico, sendo eficaz contra microrganismos. Este trabalho objetivou verificar a atividade antimicrobiana dos extratos fracionados de hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol da casca e da folha da *S. brasiliensis* frente às cepas padronizadas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e cavidade em placa. Os extratos fracionados, a partir da casca e das folhas, foram obtidos por extrações sucessivas através de maceração a frio. A avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos foi realizada pelos métodos de difusão em disco e cavidade em placa, sendo cada ensaio realizado em triplicata. Constatou-se que as frações dos extratos de casca e folha, em ambos os métodos, foram efetivos contra as cepas de *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Com relação às cepas de *P. aeruginosa*, a fração metanólica/casca teve ação antimicrobiana, em ambos os métodos, enquanto que as frações dos extratos da folha, acetato etílico/poço, etanólica e metanólica, em ambas as metodologias, mostraram-se efetivas. Por outro lado, as frações metanólica/casca/poço, etanólica e metanólica/folha, em ambos os métodos, apresentaram efeito inibitório frente à *E. coli*. Os resultados sugerem que a maioria dos compostos ativos são apolares na casca e polares na folha e o método da cavidade em placa apresenta-se mais eficiente, além de incentivar novas pesquisas para melhor investigação do potencial antimicrobiano da espécie estudada.

Palavras-chave: Etnobotânica, Maceração, Braúna, Polaridade.

-
1. Acadêmica de Farmácia/Departamento de Farmácia/CCBS/Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: suellen_feitosa_@hotmail.com
 2. Professor Doutor/Departamento de Biologia/CCBS/Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: dcfelismino@ccbs.uepb.edu.br

1 INTRODUÇÃO

A prescrição excessiva e o uso inapropriado de antibióticos propiciaram um aumento significativo na prevalência de patógenos resistentes a múltiplos fármacos. Isto é possível devido ao fato dos microrganismos terem a habilidade genética de adquirir e transmitir resistência às drogas (COHEN, 1992).

Neste contexto, insere-se a necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas. Portanto, as plantas medicinais estão dentre os produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos; isso se deve à diversidade de seus constituintes (NASCIMENTO et al., 2000; PESSINI et al., 2003; MICHELIN et al., 2005).

A *Schinopsis brasiliensis* Engler, conhecida popularmente como braúna, é uma planta pertencente ao bioma da Caatinga, amplamente utilizada como fitoterápico. Dentre suas propriedades terapêuticas, pesquisas têm demonstrado sua eficácia no combate a microrganismos (PEREIRA, 2007; CHAVES, 2010; SANTANA e FELISMINO, 2010).

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para a maioria dos estudos fitoquímicos. Portanto, a escolha do solvente utilizado na confecção desses extratos deve ser levada em consideração, visto que os compostos ativos dos vegetais encontram-se em diferentes faixas de polaridade. Conseqüentemente, a utilização de solventes de polaridades diferentes durante o processo de extração aumenta a quantidade obtida de princípios ativos oriundos da planta, implicando no aumento da atividade antimicrobiana da referida planta.

Atualmente, existem diversas técnicas de *screening* para definir se o extrato de uma determinada planta possui atividade antimicrobiana, desde as mais simples, que podem ser realizadas rotineiramente, até as mais sofisticadas. Dentre as técnicas, as de difusão em disco e cavidades estão entre as mais comumente utilizadas em testes (NASCIMENTO et al., 2007).

Portanto, este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antimicrobiana dos extratos fracionados de hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e metanol da casca e da folha da braúna frente às cepas padronizadas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidades em placa.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Resistência microbiana

Em geral, as bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos (COHEN, 1992). Este fato é preocupante, visto que estes seres são microrganismos associados diretamente à maioria das infecções, principalmente às de âmbito hospitalar.

Nascimento et al. (2001) afirmam que, como consequência da resistência a antimicrobianos, tanto as drogas consideradas clássicas no arsenal terapêutico como aquelas de introdução recente no comércio vêm se tornando ineficientes. Neste sentido, este quadro tende a se agravar, principalmente nos casos de patógenos, que tanto infectam animais como humanos. Mesmo quando estes não são coincidentes, sempre há possibilidade de transferência dessa resistência entre bactérias, inclusive em espécies diferentes. Além do mais, o surgimento de patógenos resistentes estimula a busca por novos antibióticos que sejam eficazes, o que incentiva a evolução das pesquisas; porém, o desenvolvimento de qualquer novo antimicrobiano vem acompanhado pela resistência dos microrganismos.

Katzung (2003) acrescenta que a seleção de microrganismos resistentes significa uma consequência inevitável do uso de agentes antimicrobianos. O uso inapropriado e a prescrição excessiva de antibióticos propiciaram um aumento significativo na prevalência de patógenos resistentes a múltiplos fármacos, levando alguns estudiosos a especular que estamos próximos do fim da era dos antibióticos sintéticos.

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva futura do uso de drogas antimicrobianas, incerta. Torna-se urgente adotar, portanto, medidas de enfrentar o problema, entre elas a do controle no uso de antibióticos, a do desenvolvimento de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos da resistência microbiana e a da continuação dos estudos acerca de novas drogas, sintéticas e naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

2.2 Atividade antimicrobiana vegetal

Desde 1977, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios da utilização de medicamentos fitoterápicos e

de conhecer, ao mesmo tempo, os riscos de seu uso indevido. O uso de extratos vegetais e fitoquímicos de conhecida atividade antimicrobiana pode adquirir significado nos tratamentos terapêuticos (LOGUERCIO et al., 2005).

As plantas medicinais estão dentre os produtos naturais de grande interesse científico devido à possibilidade de empregá-las como fitofármacos, por proporcionarem grandes chances de obterem-se moléculas protótipos devido a sua diversidade de seus constituintes (NASCIMENTO et al., 2000; PESSINI et al., 2003; MICHELIN et al., 2005).

A *S. brasiliensis* Engler. é uma planta muito comum no Nordeste do Brasil, principalmente na região da Caatinga. Atinge a altura de 12 a 22 metros. Apresenta caule aéreo tipo tronco forte e lenhoso, possui ramos espinhosos, folhas aromáticas, com flores alvas e pequenas, e fruto alado (LORENZI e MATOS, 2002). Segundo Lima (1989), é classificada como uma planta xerófita, heliófita, totalmente decídua durante o período seco e que floresce em épocas variáveis do ano.

Segundo Dantas et al. (2002), os raizeiros da cidade de Campina Grande indicam a braúna contra problemas diversos, como inflamações nos dentes, faringite, laringite, diarreia, disenteria, catarro, gripe, tosse, ação anti-séptica e cicatrizante. Provavelmente, estas ações se devem à composição fitoquímica do extrato da braúna, o qual contém taninos, flavonóides, antocianinas, saponinas, alcalóides, flavonóis e flavonas (CLAUS E TYLER, 1965; DUKE, 1992; TESKE E TRENTINI, 1995; DANTAS, 2002), pois estudos têm comprovado a ação antimicrobiana da referida planta (PEREIRA, 2007; CHAVES, 2010; SANTANA E FELISMINO, 2010).

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto de partida para a maioria dos estudos fitoquímicos, onde a escolha do solvente para extração, purificação, preparação e manipulação dos extratos e frações são fatores relevantes para o sucesso da pesquisa fitoquímica.

Nas últimas décadas, é crescente o desenvolvimento de técnicas para extrair de plantas com fins medicinais seus ativos de maior valor. O método mais comumente usado é a extração com solventes líquidos, um processo dependente de fatores como solubilidade dos constituintes fitoquímicos e fatores inerentes ao processo como, por exemplo, temperatura e agitação do meio, polaridade e toxicidade dos solventes. As diferentes classes de compostos existentes nas plantas apresentam diferentes polaridades, fato que possibilita selecionar a extração de

substâncias ou classes que possuem atividade biológica de interesse dependendo do sistema extração/solvente escolhido (DI STASI, 1996; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998; VALE, 2002; BAZYKINA et al., 2002; MACIEL et al., 2002; SIMÕES et al., 2003).

Segundo a literatura (ROEL et al., 2000; PEITZ et al., 2003; ANDREO e JORGE, 2006; SANTOS et al., 2008; SILVA et al., 2008; TOMAZIM JÚNIOR, 2008; MELLO JÚNIOR, 2010), esses solventes são utilizados na extração de compostos ativos de materiais vegetais, de acordo com a polaridade dos mesmos. Como exemplo de solventes usados para este fim, cita-se hexano, éter de petróleo, tolueno, clorofórmio, acetato de etila, acetona, etanol e metanol.

Daí a importância de ser trabalhar com solventes de polaridades distintas, que são capazes de extrair os diferentes compostos ativos presentes nos vegetais, tendo em vista que os mesmos também se encontram em faixas de polaridade distintas e são atraídos pelos solventes de maior afinidade.

Existem vários métodos descritos na literatura, propostos para mensurar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Entretanto, as pesquisas sobre essa atividade têm sido dificultadas pela ausência de métodos padronizados, o que dificulta a comparação entre os estudos além de inviabilizar sua reprodutibilidade (NASCIMENTO, 2007). Dentre as técnicas mais comumente utilizadas, pode-se citar os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa. Os discos permitem rapidez e praticidade durante a execução dos testes; já as perfurações no ágar exigem o uso de uma maior quantidade de extrato, o que facilita a disseminação do mesmo no meio de cultura.

Santos et al. (2007) constataram a eficiência da técnica de difusão em disco ao testarem o efeito antimicrobiano do extrato da casca de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes frente à cepas de bactérias. Já Lima et. al (2006) tiveram resultados satisfatórios ao utilizarem a técnica de cavidades em placa para testar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de várias plantas frente à cepas de *Candida* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do estudo

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Botânica e de Desenvolvimento de Medicamentos (LABDEM), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba.

3.2 Obtenção do material vegetal, localização e época da coleta

Os materiais vegetais foram obtidos através da raspagem da casca do caule e coleta das folhas de plantas adultas de *S. brasiliensis*, devidamente selecionadas, baseando-se nas características botânicas e fitossanitárias, no período de 8:00 às 10:00h, respeitando a época ideal de coleta (estádios vegetativo e reprodutivo). A coleta ocorreu nas imediações do Sítio Cardoso, município de Massaranduba/Paraíba, situado entre as coordenadas 7° 13.345'S e 35° 49.703'O, com altitude de 418 m acima do nível do mar. Foram realizadas, manualmente, duas coletas das respectivas amostras de cascas e folhas, as quais foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel Kraft. A primeira coleta foi uma representação da planta, no estágio de floração, a qual foi utilizada para identificação da referida espécie no Herbário Arruda Câmara/Laboratório de Botânica/UEPB, registrada sob número 53. A segunda representou a aquisição do material, no estágio vegetativo, o qual foi submetido à obtenção dos respectivos extratos e análise microbiológica no LABDEM/UEPB.

3.3 Obtenção dos extratos vegetais

3.3.1 Secagem

As cascas e folhas foram acondicionadas, separadamente, em embalagens de papel Kraft e submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada (FANEM®, modelo 330), à temperatura de 40 °C, até estabilização da umidade.

3.3.2 Moagem

Após a secagem, os materiais secos(cascas e folhas) foram triturados, separadamente, em moinho do tipo Willey®, e os compostos resultantes (materiais moídos) foram peneirados em tamis de numeração 10 mesh. Em seguida, os materiais moídos (pós) foram acondicionados, separadamente, em embalagens

hermeticamente fechadas, e protegidas do ar e da radiação solar. Posteriormente, os referidos pós foram utilizados na obtenção dos respectivos extratos vegetais.

3.3.3 Obtenção dos extratos fracionados

Os extratos fracionados foram obtidos por maceração a frio, segundo procedimento proposto por Cechinel Filho e Yunes (1998), os quais afirmam que é um método alternativo para obtenção de extratos e visa obter uma melhor extração dos princípios ativos presentes na planta em estudo e, conseqüentemente, resultados mais efetivos.

A metodologia consistiu em extrações sucessivas através de maceração a frio das folhas e casca, separadamente, com solventes de polaridade crescente. Inicialmente, 150g do pó da planta foram macerados durante 5 dias diretamente com 1,5L do solvente hexano; após obter o líquido extrativo, este foi filtrado, separando-o do pó da planta. Em seguida, este pó foi colocado em uma capela de fluxo para evaporação do hexano (Figura 1). Após a completa evaporação, o pó da planta foi submetido a maceração utilizando-se 1,5L do solvente diclorometano, durante 5 dias (Figura 1). Após este período, procedeu-se o mesmo método aplicado à fração hexânica. Em seguida, realizou-se o mesmo processo com outros solventes de polaridade crescente, na seguinte ordem: acetato de etila > etanol > metanol, os quais foram submetidos às mesmas etapas realizadas com os líquidos extrativos hexano e diclorometano (Figura 1), utilizando-se, para cada solvente, o mesmo volume.

Posteriormente, o líquido extrativo obtido pelo hexano foi submetido à completa evaporação, no evaporador rotativo à temperatura constante de 40°C. Após a completa extração do hexano, o material foi armazenado sob refrigeração a 5°C, até o momento da realização dos testes. O mesmo processo foi aplicado aos demais líquidos extrativos.

3.4 Análise microbiológica

3.4.1 Cepas de microrganismos

Foram selecionadas para os ensaios da atividade antimicrobiana dos produtos vegetais, cepas-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (25923), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) e *Klebsiella pneumoniae* (13883), disponibilizadas pela Fundação Oswaldo

Cruz (FIOCRUZ–RJ). As cepas liofilizadas foram reativadas, em câmara asséptica, seguindo as recomendações da referida Fundação.

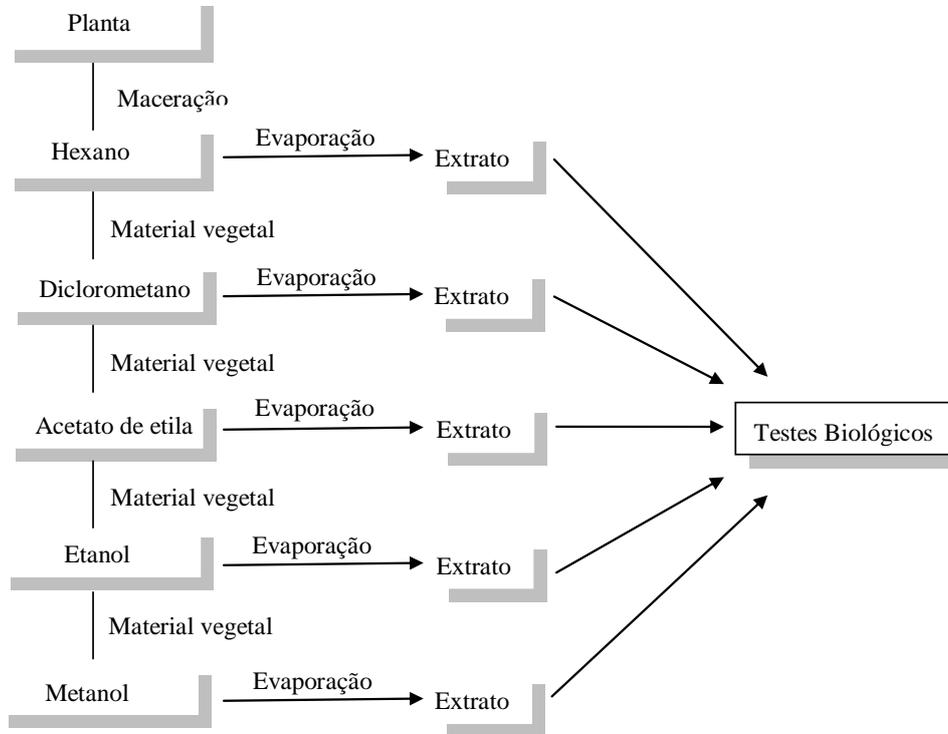


Figura 1. Esquema de maceração do material vegetal com solventes de polaridades diferentes.
Fonte: Adaptado de Cechinel Filho e Yunes (1998).

3.4.2 Preparação do inóculo

Os inóculos microbianos foram padronizados de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI, 2005). As colônias isoladas das bactérias foram transferidas, com o auxílio de uma alça bacteriológica, para tubos de ensaio de vidro estéreis contendo solução salina, de modo a obter suspensões diluídas com transmitância de 85%, no comprimento de onda de 625nm em espectrofotômetro, em cubetas de vidro, a fim de obter-se uma carga microbiana com concentração final próxima a 10^6 UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia)/mL para bactérias (BAUER et al., 1966; HADACECK e GREGER, 2000).

3.4.3 Testes de sensibilidade microbiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados da casca e da folha da *S. brasiliensis* diante das cepas de bactérias, foram testados os métodos de difusão em meio sólido utilizando-se discos e cavidades em placa (método do poço).

Após a rotaevaporação dos referidos extratos, verificou-se que os mesmos se apresentaram em estado pastoso, impossibilitando a utilização. Portanto, foi necessário redissolver os mesmos. Foram realizados testes preliminares utilizando-se Lauril Sulfato de Sódio, DMSO, Tween 80 e Hexano, em diferentes concentrações, com intuito de identificar o solvente ideal, sem que o mesmo produzisse efeito antimicrobiano frente às cepas testadas. Após os referidos testes, concluiu-se que o Lauril Sulfato de Sódio a 10% foi o que melhor se adequou às condições dos mesmos.

Após a escolha do solvente, os extratos de *S. brasiliensis*, rotaevaporados, foram dissolvidos em lauril sulfato de sódio a 10%, na proporção de 9mL:1g de extrato, visando permitir a absorção dos extratos pelos discos de papel e melhor difusibilidade pelo meio de cultura, após serem depositados nas cavidades.

O método de disco foi realizado seguindo os procedimentos de Kirby-Bauer (NCCLS/CLSI, 2005), sendo utilizadas placas de Petri contendo 20mL de Müller-Hinton, no qual foram inoculadas as respectivas cepas a serem analisadas, pela técnica de espalhamento em superfície (BAUER et al., 1966), com auxílio de swabs estéreis, mergulhados na suspensão contendo o inóculo. Após este procedimento, discos de papel de filtro estéreis (nº3 e ø6,0mm) foram impregnados, separadamente, com 20µL dos extratos de casca e folha redissolvidos com o solvente lauril sulfato de sódio a 10%, esperando-se 20 minutos antes de distribuí-los nas placas.

No método de cavidades em placa, 20mL do meio de cultura foram distribuídos uniformemente em cada placa, sendo estas dispostas em superfícies niveladas para assegurar que a camada de meio tenha profundidade uniforme. Após solidificação do ágar, as placas foram devidamente tampadas. Os inóculos padronizados foram dispostos, separadamente, nas placas com o auxílio de swabs estéreis, retirando o excesso de líquido comprimindo a ponta do swab nas paredes do tubo de ensaio. Depois, espalhou-se o conteúdo do “swab” sobre o meio de cultura sólido (Müller-Hinton) distribuído na placa de Petri. Procedeu-se, então, a

formação das cavidades, usando-se canalículas ($\varnothing 6,0\text{mm}$), nas quais foram colocados $50\mu\text{L}$ dos extratos fracionados, separadamente, de casca e folha de *S. brasiliensis*.

Para ambos os ensaios, como controle positivo, foram utilizados discos antibióticos ($\varnothing 6,0\text{mm}$) de Cefalexina ($30\mu\text{g}$) para *S. aureus* e Gentamicina ($10\mu\text{g}$) para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*; como controle negativo, usou-se discos de papel de filtro estéreis ($n^{\circ}3$ e $\varnothing 6,0\text{mm}$), impregnados em solução de lauril sulfato de sódio a 10%.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C , por 48 horas, sendo os ensaios realizados em triplicata. Após este período, foram realizadas as análises dos efeitos dos referidos extratos fracionados, comparando-se as metodologias utilizadas no ensaio.

3.5 Análise dos dados

O resultado final foi determinado pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição (mm), obtidos nas triplicatas de cada ensaio, aferidos por halômetro.

Foi considerada como possuidora de atividade antimicrobiana aquela concentração do extrato aquoso que quando aplicada sobre o meio de cultura contendo a suspensão do microrganismo apresentou um halo de inibição de crescimento igual ou superior a $8,0\text{mm}$ de diâmetro (LIMA et al., 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a rotaevaporação dos extratos fracionados, foram obtidos materiais sólidos com pesos correspondentes às frações hexânica (folha: 1,2g e casca: 0,8g); diclorometânica (folha: 0,8g e casca: 1,0g); acetato etílico: (folha: 1,0g e casca: 0,8g); etanólica (folha: 1,4g e casca: 1,3g) e metanólica (folha: 1,3g e casca: 1,4g).

Ao observar as Tabelas 1 e 2, todas as frações dos extratos de casca e folha de *Schinopsis brasiliensis*, em ambos os métodos, foram efetivos contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*, tendo os extratos etanólico e metanólico produzido as maiores médias aritméticas de tamanho dos halos. Com relação às cepas de *P. aeruginosa*, a fração metanólica/casca apresentou efeito antimicrobiano, em ambos os métodos, enquanto que as frações dos extratos da folha, acetato etílico/poço, etanólica e metanólica, em ambas as metodologias, mostraram-se efetivas. Por outro lado, as frações metanólica/casca/poço, etanólica e metanólica/folha, em ambos os métodos, apresentaram efeito inibitório frente à *E. coli*.

Ao comparar a eficácia dos extratos da casca e das folhas, observa-se que, na maioria dos resultados, a casca foi mais efetiva nas frações hexânica, diclorometânica e acetato etílico, e a folha nas frações etanólica e metanólica. Portanto, considerando-se o tamanho dos halos de inibição, presume-se que, provavelmente, os princípios ativos presentes são predominantemente apolares na casca e polares na folha.

Virtuoso et al.(2005) afirmam que os esteróides e triterpenos presentes nas plantas estão concentrados geralmente na fração mais apolar e são conhecidos pela atividade antimicrobiana. Aparentemente estas substâncias inibem o crescimento de *S. aureus* e *K. pneumoniae*, enquanto que os halos formados pelas frações hexânicas foram de tamanhos consideráveis. Esta mesma fração não produziu efeito diante das cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*. Resultados semelhantes foram encontrados por França et al. (2009), que ao testarem o extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, constataram atividade antimicrobiana somente diante da *S. aureus*. Os autores explicam que isso pode ocorrer devido à presença de uma estrutura na membrana externa das bactérias Gram negativas, a qual incapacita a passagem de moléculas (McCUTCHEON et al., 1992; RABE e VAN STADEN, 1997; e

Tabela 1. Diâmetro dos halos formados pelos extratos fracionados da casca da *S. brasiliensis*, na concentração 100%, utilizando-se as técnicas de difusão em meio sólido com disco e cavidades em placa (método do poço).

Microrganismos	Extratos de casca										Controle positivo		Controle negativo
	DiscosxCavidades/ Diâmetro dos halos (mm)										Cefa-lexina	Genta-micina	Lauril Sulfato de Sódio a 10%
	Hexânica		Diclorometânica		Acetato etílica		Etanólica		Metanólica				
Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço				
<i>S. aureus</i>	15,5	18,0	15,5	22,0	16,0	23,0	17,0	20,0	17,0	23,0	11,80	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0	12,0	-	20,97	-
<i>K. pneumoniae</i>	21,0	23,0	21,0	24,0	22,0	25,0	23,0	24,0	22,0	26,0	-	19,16	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,0	-	18,33	-

Tabela 2. Diâmetro dos halos formados pelos extratos fracionados da folha da *S. brasiliensis*, na concentração 100%, utilizando-se as técnicas de difusão em meio sólido com disco e cavidades em placa (método do poço).

Microrganismos	Extratos de folha										Controle positivo		Controle negativo
	DiscosxCavidades/ Diâmetro dos halos (mm)										Cefa-lexina	Genta-micina	Lauril Sulfato de Sódio a 10%
	Hexânica		Diclorometânica		Acetato etílica		Etanólica		Metanólica				
Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço	Disco	Poço				
<i>S. aureus</i>	15,0	17,0	15,0	17,0	16,0	20,0	19,5	20,0	18,0	24,0	11,80	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	13,0	8,0	18,0	12,0	18,0	-	20,97	-
<i>K. pneumoniae</i>	20,0	24,0	20,0	24,0	21,0	25,0	24,0	23,0	24,0	28,0	-	19,16	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	9,0	17,0	18,0	25,0	-	18,33	-

MOTHANA LINDEQUIST, 2005).

As frações diclorometânica e acetato etílica foram consideravelmente efetivas com relação à *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Entretanto, não formaram nenhum halo de inibição frente à *E. coli* e apenas a fração acetato etílica/folha, usando-se o método do poço, teve ação antimicrobiana diante da *P. aeruginosa*. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2002), ao testarem os extratos das partes aéreas da *Mikani lanuginosa* e por Andrade et al. (2005) das flores de *Acacia podalyriifolia*. Portanto, presume-se que os princípios ativos arrastados por esses solventes não são efetivos contra o crescimento de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

A fração etanólica/folha produziu efeito antimicrobiano diante das quatro cepas testadas, em ambas as metodologias, sendo significativo o tamanho dos halos de inibição contra *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Este estudo corrobora com os resultados obtidos por Chaves (2010), o qual testou o efeito do extrato etanólico das folhas de *S. brasiliensis* frente às mesmas cepas, o que comprova que a fração etanólica contém compostos ativos capazes de impedir os seus crescimentos. No entanto, o extrato da casca não produziu nenhum halo de inibição diante da *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo efetivo para *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

Tais resultados são discordantes do estudo realizado Pereira (2007), o qual verificou atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca da *S. brasiliensis*, utilizando cavidades, frente à *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Provavelmente, as diferentes condições de obtenção dos extratos utilizados por Pereira (método da percolação e evaporação em manta aquecida) podem ter influenciado nos resultados finais, já que esta é a única diferença aparente entre os trabalhos, pois foi testado o mesmo extrato (etanólico/casca) diante das mesmas cepas.

Quanto aos extratos metanólicos (Tabela 1), em geral, observa-se que apresentaram os melhores resultados em termos de inibição do crescimento bacteriano, exceto na fração casca/disco diante da *E. coli*. Este resultado sugere que a maioria dos componentes ativos da *S. brasiliensis* são polares e por isso houve inibição significativa dos microrganismos testados. Resultados semelhantes foram obtidos em um estudo realizado com extratos e partições de *Bromelia antiacantha*, popularmente conhecida como gravatá (FABRI e COSTA, 2012). Tais extratos, principalmente o extrato metanólico/folha, foram ativos contra as linhagens de *P. aeruginosa* e *E. coli*; porém, este extrato não apresentou atividade contra *S. aureus*.

Segundo Fabri e Costa (2012), tal resultado tem elevada importância clínica, pois *P. aeruginosa* e *E. coli* são responsáveis por elevada incidência de infecções.

Analisando-se os resultados, observa-se que as zonas de inibição formadas pelos extratos, ao utilizar a metodologia das cavidades foram maiores que os halos formados ao redor dos discos de papel, exceto na fração etanólica/folha frente à *K. pneumoniae*. As diferenças de respostas antimicrobianas, provavelmente, devem-se ao fato de que no método das cavidades emprega-se uma maior quantidade de extrato (50µL) que no método do disco (20µL). Outra explicação é dada por Alves et al. (2008), os quais sugerem que o método das cavidades em placa favorece uma maior dispersão dos extratos pelo meio de cultura, tornando-o, por vezes, mais potencialmente inibitório que o método do disco.

Araújo et al. (2011) acrescentam que a técnica de difusão em cavidades apresenta maior garantia da concentração de extrato utilizada, por possibilitar que a quantidade de amostra que interage com o microrganismo durante o teste de sensibilidade seja igual ao volume pipetado em cada cavidade inicialmente nas condições metodológicas testadas; o mesmo não ocorre com a técnica de difusão em disco, uma vez que é impossível garantir a quantidade exata que cada disco de papel consegue absorver quando embebido no extrato, possibilitando ainda o extravasamento de amostra em função da saturação da capacidade de absorção do disco, dificultando a obtenção de resultados mais precisos quando comparado com a técnica das cavidades.

5. CONCLUSÃO

Nas condições de estudo, constata-se que o extrato da *S. brasiliensis* é composto por fitoconstituintes capazes de inibir o crescimento visível de microrganismos, reforçando o potencial antimicrobiano da casca e revelando a mesma capacidade por parte da folha, a qual ainda não foi devidamente explorada cientificamente, merecendo uma investigação mais detalhada.

Evidencia-se a importância de se trabalhar com solventes de polaridades diferentes, pois os resultados sugerem que a maioria dos compostos ativos presentes na casca são apolares, e polares na folha, e que o método da cavidade em placa apresenta-se mais eficiente.

Portanto, sugere-se uma futura investigação dos resultados, devendo-se identificar, extrair, isolar, purificar, fracionar e quantificar, avaliando a atividade antimicrobiana dos fitoquímicos, isoladamente, das casca e folha, e testar frente a outros microrganismos.

6. AGRADECIMENTOS

A FIOCRUZ-RJ, por disponibilizar as cepas necessárias à realização deste trabalho.

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE FRACTIONATED EXTRACTS FROM BARK AND LEAF OF *Schinopsisbrasiliensis* ENGLER. BY COMPARATIVE ANALYSIS BETWEEN THE METHODS OF DISK DIFFUSION AND CAVITY IN PLATE

Suellen Emilliany Machado¹ Feitosa; Delcio Castro Felismino²

Because of the limited spectrum of antimicrobial action and its undesirable effects, we need to find new therapies. Studies are searching new drugs and investigations with vegetable substances are good prospects. *Schinopsisbrasiliensis*Engler.(Brauna) is popularly used as a phytomedicine and is effective against microorganisms. This study aimed to determine the antimicrobial activity of fractionated extracts of hexane, dichloromethane, ethyl acetate, ethanol and methanol from bark and leaf of *S. brasiliensis* against standardized strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiellapneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, by comparative analysis between the methods of disk diffusion and cavity in plate. The fractionated extracts from bark and leaves were obtained by successive extractions using cold maceration. The evaluation of the antimicrobial potential of the extracts was performed by the methods of disk diffusion and cavities in plaque, each assay performed in triplicate. It was found that all fractions of extracts of bark and leaves, using the two methods, were effective against *S. aureus* and *K. pneumoniae*. Against the strains of *P. aeruginosa*, the methanolic fraction/bark had antimicrobial effect in both methods, whereas the fractions of leaf extracts, ethyl acetate/cavities and ethanolic and methanolic, in both methods, were effective. On the other hand, the fractions methanolic/bark/cavities and ethanolic and methanolic/leaf, in both methods, exhibited inhibitory effect against *E. coli*. The results suggest that the most active compounds are nonpolar in the bark and polar in the leaves, and the cavities's in plate method is more efficient, and encourage further research to better investigate the antimicrobial potential of the specie studied.

Keywords: Ethnobotany, Maceration, Brauna, Polarity.

-
1. Student of Pharmacy/Pharmacy Department/CCBS/Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: suellen_feitosa_@hotmail.com
 2. Doc Professor/Biology Department/CCBS/Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: dcfelismino@ccbs.uepb.edu.br

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ANDRADE, C.A. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímicas das flores de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 13-15, 2005.
- ANDREO, D.; JORGE, N. **Antioxidantes naturais**: técnicas de extração. **BCEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ARAÚJO, Y.L.F.M. et al. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n. 4, p. 1-4, 2011.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **AJCP**, v. 45, p. 493-96, 1966.
- BAZYKINA, N.I. et al. Optimization of conditions for the extraction of natural antioxidants from raw plant materials. **Pharm Chem J**, v. 36, n. 2, p. 100-103, 2002.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.
- CHAVES, T.P. **Perfil antimicrobiano das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engler**. Campina Grande, 2010. 43p. Monografia (Especialização em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Fundação Regional do Nordeste/Centro Universitário de João Pessoa.
- CLAUS, E.P.; TYLER, V.E. **Farmacognosia**. Buenos Aires: El Ateneo. 1986.
- COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, v. 257, n. 11, p. 1050-1055, 1992.
- DANTAS, I.C. **O raizeiro e suas raízes**: um novo olhar sobre o saber Popular. Campina Grande, 2002. 134p. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade Estadual da Paraíba.
- DI STASI, L.C. **Plantas medicinais**: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Unesp. 1996.
- DUKE, J.A. **Handbook of phytochemical constituents of grass herbs and other economic plants**. Boca Raton: FL. CRC Press. 1992.
- FABRI, R.L.; COSTA, J.A.B.M. Perfil farmacognóstico e avaliação das atividades citotóxica e antibacteriana de *Bromelia antiacantha* BERTOL. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 2, p. 37-48, 2012.

FRANÇA, H.S. et al. Atividade antibacteriana de floroglucínóis e do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choisy. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1103-1106, 2009.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem. Anal.** v. 11, p. 137-147, 2000.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica & clínica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

LIMA, D.A. **Plantas das Caatingas**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 1989. 243p.

LIMA, E.O. et al. *Schinuste rebenthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiano de seu extrato aquoso. **Infarma**. v. 16, n. 1, p. 7-8, 2004.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; FARIAS, N.M.P.; SOUZA, E.L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LOGUERCIO, A.P. et al. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygiumcumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum. Ltda, p. 191, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, J.V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 430-431, 2002.

McCUTCHEON, A.R. et al. Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, n. 3, p. 213–223, 1992.

MELLO JÚNIOR, D.C. **Produção de acetato de etila em biorrefinaria, uma análise de viabilidade**. 2010. 59p. Dissertação (Mestrado). Escola de Economia de São Paulo. 2010.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 5, p. 316-320, 2005.

MOTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1-2 , p. 177–181, 2005.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Jornal Brasileiro de Microbiologia**, v. 31, n. 2, p.247-256, 2000.

NASCIMENTO, G.G.F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M.S.P. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. **Revista de Nutrição**, v. 14, n. 2, p.119-124, 2001.

NASCIMENTO, P.F.C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NCCLS/CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Disponível em: <<http://www.contractlaboratory.com>>. Acesso em: 10 mai 2010.

PEITZ, C. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p.61-65, 2003.

PEREIRA, J.F.S. **Avaliação do potencial antimicrobiano do extrato da casca de *Schinopsis brasiliensis* Engler**: um estudo baseado na indicação etnofarmacológica. Campina Grande, 2007. 60f. Trabalho Orientado Acadêmico - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Universidade Estadual da Paraíba.

PESSINI, G.L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 21-24, 2003.

RABE, T.; VAN STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 1, p. 81-87, 1997.

ROEL, A.R. et al. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichillia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **An. Soc. Entomol. Bras.**, v. 29, n. 4, p. 799-808, 2000.

SANTANA, C.P. de; FELISMINO, D.C. **Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato da *Schinopsis brasiliensis* Engler (Braúna) sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida***. Relatório final de pesquisa inserido no Programa de Iniciação Científica/PIBIC/UEPB/CNPq. 2010. 16f.

SANTOS, B.R. et al. Aspectos fitoquímicos de tecidos foliares de *Salix humboldtiana*. **Magistra**, v. 20, n. 1, p. 01-05, 2008.

SANTOS, S.C.; FERREIRA, F.S.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.215-219, 2007.

SILVA, C.R. et al. Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 594-599, 2008.

SILVA, R.Z. et al. Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana da *Mikania lanuginosa* DC (ASTERACEAE). **Visão Acadêmica**, v.3, n.2, p.59-64, 2002.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. p. 300-315. 2003.

TESKE, M; TRENTINI, A.M. **Herbarium**: compêndio de fitoterapia. 2.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995.

TOMAZIM JÚNIOR, C. **Extração de óleo de soja com etanol e transesterificação etílica na miscela**. Piracicapa, 2008. 64p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo.

VALE, N.B.D. A Farmacobotânica ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368-380, 2002.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.