



Universidade Estadual da Paraíba – UEPB
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
Curso de Farmácia

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *EUGENIA UNIFLORA* L. (PITANGA) SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *ESCHERICHIA COLI*.

André Luiz Dias Ribeiro Nascimento

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rossana Miranda Cruz Camello Pessoa

CAMPINA GRANDE – PB

2013

ANDRÉ LUIZ DIAS RIBEIRO NASCIMENTO

AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *EUGENIA UNIFLORA* L. (PITANGA) SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *ESCHERICHIA COLI*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito necessário para obtenção de grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rossana Miranda Cruz Camello Pessoa

**CAMPINA GRANDE – PB
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

H722a Nascimento, André Luiz Dias Ribeiro.
Ação antimicrobiana do extrato de *Eugenia Uniflora* L. (pitanga) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* [manuscrito] / André Luiz Dias Ribeiro Nascimento. – 2013.
27 f. : il. color.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia Generalista) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Rossana Miranda Cruz Camello Pessoa, Departamento de Farmácia.”

1. Atividade antimicrobiana. 2. Fitoterapia. 3. Plantas medicinais. I. Título.

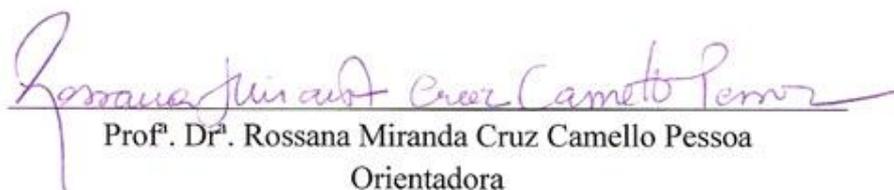
21. ed. CDD 615.321

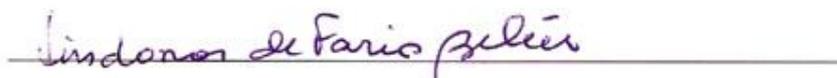
ANDRÉ LUIZ DIAS RIBEIRO NASCIMENTO

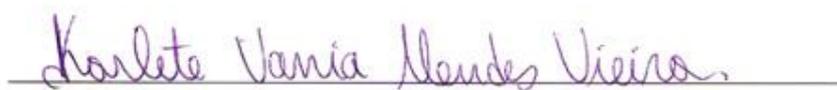
AÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *EUGENIA UNIFLORA* L. (PITANGA) SOBRE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *ESCHERICHIA COLI*.

APROVADO EM 15 / 07 / 13

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Rossana Miranda Cruz Camello Pessoa
Orientadora


Prof.^a. Dr.^a. Lindomar Farias Belém
Examinadora


Prof.^a. Dr.^a. Karlete Vania Mendes Vieira
Examinadora

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais Gilton e Maria José, aos meus irmãos Emmanuel e Maria Carolina, pela força, incentivo, confiança e amor, DEDICO.

“Eu gostaria de lhe agradecer pelas inúmeras vezes que você me enxergou melhor do que eu sou. Pela sua capacidade de me olhar devagar, já que nessa vida muita gente já me olhou depressa demais.” (Padre Fábio de Melo)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por renovar meus sonhos e objetivos à cada manhã, me guiando sempre pelos caminhos puros e honestos, fazendo prevalecer a cada dia, as vontades Dele em minha vida. Sou grato a Ti, de todo meu coração.

A minha orientadora, Professora Doutora Rossana Miranda, que desde o início me apoiou, orientou e me ensinou valores que ultrapassam as fronteiras acadêmicas.

Aos meus pais Gilton e Maria José, por todo o amor, carinho, cuidado e ensinamentos, me orientando a seguir sempre com humildade e honestidade em todos os momentos da minha vida. Agradeço a Deus poder desfrutar do amor de vocês.

Aos meus amados irmãos Emmanuel e Maria Carolina, por me ensinarem a lutar pelos meus objetivos, me ensinarem a nunca desistir e acreditar no meu potencial. Ao carinho e amor de vocês, sou grato de todo o meu coração.

Aos meus avós Alcides, Heleno e Geni, hoje presentes ao lado de Deus, agradeço pelo amor cedido a mim, mesmo ainda quando criança, pelos ensinamentos deixados que carregarei por toda minha vida, pelos verdadeiros valores da vida mostrado por vocês, sou eternamente grato.

A minha avó Francisca, que acompanhou minha caminhada, sempre acreditando na minha vitória.

Aos meus amigos Filipe Raposo, Marcelo Holanda, Pedro Medeiros, Camila Fernandes e Monique Albuquerque, que sempre estiveram presentes nesta caminhada, dedicando a mim ensinamentos únicos e decisivos no meu amadurecimento.

Ao meu amigo e Professor Doutor Walclécio Lira, o qual tive a oportunidade de realizar pesquisas acadêmicas e aprender muitos ensinamentos úteis para minha vida dentro e fora das salas de aula.

A todos os meus professores, grandes responsáveis por este momento de conclusão de mais uma etapa da minha vida, compartilhando diariamente seus conhecimentos conosco.

Aos meus colegas de turma de Farmácia 2009.1-2013.2, minha tão amada e forte “Elite Farmacêutica”, que me ensinaram a conviver com as diversidades de pensamentos e opiniões, presentes em meus momentos de tristeza e alegria.

Aqueles que me criticaram, pois através destas foi possível me tornar uma pessoa mais exigente a respeito de mim mesmo, amadurecendo e buscando melhorar cada vez mais.

Obrigado a todos vocês, por participarem desta etapa direta ou indiretamente, contribuindo para o meu crescimento humano e profissional.

RESUMO

NASCIMENTO, André L. D. R. Ação antimicrobiana do extrato de *Eugenia Uniflora* L. (Pitanga) sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. – Artigo Científico (Trabalho de Conclusão de Curso), Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Campina Grande, 2013. E-mail: andreluiz.aldrn@gmail.com. Orientadora: Dr^a. Rossana Miranda Cruz Camello Pessoa (E-mail: rossana.mpa@gmail.com)

As infecções bacterianas tem sido responsáveis pelas doenças endêmicas e epidêmicas, portanto, exercem um papel histórico no que se refere aos problemas de saúde. Com o surgimento dos antibióticos produzidos pela indústria farmacêutica em meados do século XX, acreditava-se no controle das infecções, possivelmente o uso irracional dos agentes antimicrobianos foi responsável por gerar mudanças na estrutura genética destas, tornando-as resistentes apesar da disponibilidade de antibióticos eficazes. Uma estratégia atual no tratamento de doenças causadas por bactérias vem sendo buscar possibilidades que visem minimizar danos à saúde e maior ação contra processos infecciosos, tendo em vista que alguns antibióticos convencionais têm perdido a eficácia. Nesse contexto, trabalhos desenvolvidos com extratos brutos, obtidos a partir de plantas medicinais têm indicado potencial antimicrobiano. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos das folhas, frutos e talos da *Eugenia uniflora* L. sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection - ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os testes de sensibilidade microbiana aos extratos vegetais foram determinados pela técnica de difusão em disco, observando-se o tamanho dos halos de inibição (mm) obtidos, bem como a determinação da concentração inibitória mínima (CIM); os resultados obtidos apontaram que o o extrato oriundo da folha desempenhou atividade quando aplicado em concentração de 100% e 50% e o extrato do fruto desempenhou atividade quando aplicado em concentração de 100%, ambos frente as cepas de *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, *Eugenia uniflora* L., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

NASCIMENTO, André L. D. R. Antimicrobial Action of *Eugenia Uniflora* L. (Pitanga) extract's in *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. – Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, Campina Grande, 2013.

Bacterial infections have been responsible for the endemic and epidemic diseases, therefore, played a historic role in relation to health problems. With the advent of the antibiotics produced by the pharmaceutical industry in the mid-twentieth century, it was believed in the control of infections, however, the irrational use of antimicrobial agents was responsible for generating changes in the genetic structure of these, making them resistant despite the availability of antibiotics effective. A current strategy in the treatment of diseases caused by bacteria has been seeking opportunities aimed at minimizing damage to health and greater action against infectious processes, considering that some conventional antibiotics have lost their effectiveness in their activity. In this context, the work developed in the crude extracts obtained from medicinal plants have shown antimicrobial potential. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from leaves, fruits and stems of *Eugenia uniflora* L. against strains of *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection - ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922). Sensitivity tests to microbial plant extracts were determined by the disk diffusion, observing the size of inhibition zones (mm) obtained as well as the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and the results showed that extract oo deriving leaf played activity when applied at a concentration of 100% and 50% fruit extract and played activity when applied in a concentration of 100%, both front strains of *Staphylococcus aureus*.

Key-words: antimicrobial activity, *Eugenia uniflora* L., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivo Específico	11
3. REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
3.3 <i>Escherichia coli</i>	14
3.4 <i>Eugenia uniflora</i> L.	15
3.5 Descrição botânica; Princípios ativos; Atividades biológicas	16
4. METODOLOGIA	18
4.1 Material Vegetal	18
4.2 Microorganismos Testados	18
4.3 Local de Realização dos Experimentos	18
4.3.1 Preparação dos Extratos	18
4.3.2 Cepas Microbianas	18
4.4 Meios de Cultura	19
4.5 Preparação dos extratos de <i>E. uniflora</i> L.	19
4.6 Diluição dos extratos e aplicação em discos	19
4.7 Procedimentos Microbiológicos	20
4.7.1 Suspensão microbiana e inóculo	20
4.7.2 Método de difusão em disco	20
4.7.3 Ensaio de atividade antimicrobiana	21
4.7.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima .	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas tem sido responsáveis pelas doenças endêmicas e epidêmicas, portanto, desempenhando um papel histórico quando se trata de problemas de saúde. Com o surgimento dos antibióticos produzidos pela indústria farmacêutica em meados do século XX, acreditava-se no controle e combate das infecções. Porém, o uso irracional dos agentes antimicrobianos acabou se tornando o principal responsável por gerar mudanças na estrutura genética das bactérias atenuando a patogenicidade, ou seja, tornando-as resistentes apesar da disponibilidade de antibióticos eficazes (TRABULSI, 2005).

Diante deste fato, uma estratégia válida atual no tratamento de doenças causadas por bactérias vem sendo a busca por possibilidades que visem minimizar danos à saúde e proporcionem maior ação contra processos infecciosos, tendo em vista que alguns antibióticos convencionais têm perdido a eficácia na sua atividade.

De acordo com OBI et al.(2009), NWANEBU et al.(2009), NDUBUISI et al.(2009), ORJI (2009), a alternativa resulta, na busca de novos antibióticos de moléculas orgânicas provenientes de plantas com propriedades antimicrobianas.

Algumas espécies de vegetais tem sido responsáveis por apresentarem em sua constituição propriedades biológicas ativas responsáveis pelo fornecimento de substâncias que atuam na prevenção, tratamento e cura de várias doenças. Conforme MONTANARI & BOLZANI (2001), as plantas constituem-se num enorme laboratório de síntese orgânica, frutos de milhares de anos de evolução e adaptação sobre a terra. Logo, a busca do conhecimento a respeito dos efeitos benéficos dos fitoconstituintes se torna de grande utilidade.

A pitanga, *Eugenia uniflora* L, é o fruto da pitangueira, dicotiledônea da família *Myrtaceae*. Tem a forma de drupa globosa e carnosa, com as cores vermelha.

A pitangueira é uma árvore nativa da Mata Atlântica brasileira, encontrada na floresta semidecidual do planalto e nas restingas, desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul em regiões de clima subtropical. Na Paraíba-NE apresenta um crescimento ideal devido ao clima da região e aos solos que proporcionam um desenvolvimento sem empecilhos, visto que tem uma boa adaptação ao clima quente, desde que possua uma umidade satisfatória. (SCALON, 2001)

O fruto é utilizado popularmente para diminuir a pressão arterial, combater azia, bronquite e cólicas. A presença de agente antimicrobiano de origem vegetal, poderá progressivamente provocar resistência microbiana, no entanto, o medicamento a base de extratos de origem natural tem demonstrado vantagens em relação aos antibióticos sintéticos por desencadear de maneira mais lenta tal resistência além de atuar especificamente e não agredir o ambiente tornando os fitoterápicos alvos de pesquisa (SOUSA et al, 2008., ATHAYDE, 2008).

Neste contexto, o trabalho realizado teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato das folhas, frutos e talos da pitangueira frente à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, bactérias de grande importância epidemiológica, visto que podem ser encontradas em condições de normalidade no corpo humano, ambientes hospitalares, possuir potencial de mutação e capacidade de adquirir resistência consideravelmente alta, bem como capacidade de desenvolverem doenças facilmente encontradas no cotidiano a exemplo de infecções urinárias, hospitalares e intoxicações alimentares.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos das folhas, frutos e talos da *Eugenia uniflora* L. sobre cepas de *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection - ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922).

2.2. ESPECÍFICOS

- Obter o extrato hidroalcoólico utilizando as seguintes partes vegetais: folhas, frutos e talos da *Eugenia uniflora* L.;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente às cepas mencionadas nos objetivos gerais;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos ativos sobre as respectivas cepas;
- Comparar as cepas quanto o grau de sensibilidade aos extratos testados.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

Um dos maiores desafios no que se refere ao desenvolvimento da sociedade é realizar a promoção e proteção à saúde, pois estas ações são essenciais para a melhoria da qualidade de vida da população. Dessa maneira é importante destacar que o conhecimento tradicional aliado a pesquisas científicas fitoterápicas podem seguramente contribuir para a descoberta de novas possibilidades de tratamentos para diversos agentes etiológicos (ELDIN et al., DUNFORD, 2001).

Em meados do século XX foi desenvolvida a quimioterapia antimicrobiana pela indústria farmacêutica, contudo, o uso indiscriminado de antibióticos devido à disponibilidade e a publicidade geraram o uso irracional desses medicamentos, desenvolvendo resistência a diversas cepas bacterianas mesmo com o uso de antibióticos considerados convencionais, fator preponderante no incentivo a busca por antibióticos de ocorrência natural. (ELDIN et al., DUNFORD, 2001). A exemplo daqueles encontrados nas plantas, ou seja, os fitoterápicos.

A fitoterapia é uma ciência milenar que atravessou diversas fases da medicina desde os tempos mais antigos até a atualidade. Vale ressaltar que historicamente o termo antimicrobiano foi descrito primariamente com referência as plantas que tinham capacidade de degradar agentes causadores de doenças ou que possuíam capacidade de estimular o sistema imune (ELDIN et al., DUNFORD, 2001).

Dentre a grande quantidade de bactérias já estudadas na atualidade, muitas delas são consideradas comuns no que diz respeito a sua epidemiologia, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Essas bactérias se destacam devido à grande facilidade de serem encontradas no cotidiano, podendo estar presente em condições normais no corpo humano bem como em ambientes hospitalares, podendo ser causadoras de infecções urinárias, hospitalares, intoxicações alimentares, entre outras patologias.

Ainda a respeito destas, são agentes patogênicos de importância epidemiológica responsáveis por diferentes processos infecciosos, cuja contaminação pode ser direta ou indireta em indivíduos saudáveis ou imunodeprimidos. Estas espécies bacterianas foram estudadas neste manuscrito.

3.1 *Staphylococcus aureus*.

A espécie *Staphylococcus aureus* pertencente à família Micrococaceae e gênero *Staphylococcus*, são bactérias cocos Gram positivos agrupadas em cachos de uva; não-fastidiosas; aeróbios ou anaeróbios facultativos; as suas colônias possuem pigmentos que variam de branco a amarelo e são catalase positivo. Os fatores de virulência estão presentes na superfície celular que é composta de peptidoglicano, ácido teóico, proteína A, toxinas e a presença de enzima onde se destaca a enzima coagulase positiva que confere sua característica marcante, pela qual a diferencia das demais espécies de estafilococos.

Esta bactéria é encontrada na microbiota normal do corpo humano, no entanto, quando transferida para outra região ou órgão sensível pode causar infecções. As infecções estafilocócicas graves estão presentes nos hospitais sendo reconhecidos pela sua grande capacidade de sofrer mutações em seus genes e também adquirir resistência de outras bactérias da mesma espécie, dessa maneira, tornando-se resistente a vários antibióticos de escolha.

O *S. aureus* é um patógeno causador de abscesso; intoxicação alimentar; síndrome de choque tóxico; gastroenterite estafilocócica; síndrome de pele escaldada; impetigo bolhoso, foliculite que por sua vez pode progredir para o furúnculo e depois para carbúnculo; endocardite; bacteremia; osteomielite (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

3.2 *Pseudomonas aeruginosa*.

As bactérias que pertencem ao gênero *Pseudomonas* são bacilos gram negativos, não fermentadores e considerados oportunistas causando infecções em pessoas imunodeprimidas (JAWETZ *et al.*, 1998). *P. aeruginosa* é encontrada em diversos ambientes principalmente em hospitais, sendo considerado um patógeno de grande relevância no que diz respeito a infecções hospitalares. Esta bactéria cresce em meios de culturas simples devido a sua versatilidade nos requerimentos energéticos e nutricionais. Sua patogenicidade deve-se principalmente à resistência adquirida em relação aos antibióticos tornando difícil sua erradicação. Inicialmente, a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* requer alteração no sistema de primeira linha, sendo resultado de: interrupção nas barreiras cutâneas ou das mucosas, por exemplo: traumas, queimaduras,

o uso de cateteres; imunodepressão de ordem terapêutica, clínica ou fisiológica (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

De modo geral, conforme pode ser visto os antimicrobianos tem se tornado progressivamente incapazes de atuar no sítio de ação das bactérias, ou seja, os microrganismos têm desenvolvido mecanismos cada vez mais complexos adquirindo e transmitindo aos demais descendentes mutações e com isso conferindo resistência aos quimioterápicos antimicrobianos. Salientando-se que a automedicação, gera aumento da resistência bacteriana, gerando um problema de Saúde Pública (VIOLANTE, 2008).

3.3 *Escherichia coli*.

A *Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* é uma bactéria gram negativa com formato de bacilo, faz parte da microbiota normal do trato gastrointestinal, no entanto, existem determinadas cepas causadoras de doenças, tais como, ITU, septicemia, meningite em neonatal e mais frequentemente associado com a "diarréia dos viajantes", uma diarréia aquosa.

Os subtipos mais conhecidos são: *Escherichia coli* *Enteropatogênica* (EPEC), causando distúrbios gastrointestinal provocando diarréia não sanguinolenta, em determinadas épocas, associadas a “diarréia de verão”, estudos evidenciam que a EPEC tem como reservatório principal o homem; *Escherichia coli* *Produtora e toxina Shiga* (STEC), pode causar uma variedade de doenças no homem desde casos de diarréias assintomáticos a casos graves de colite hemorrágica podendo evoluir para síndrome hemolítica urêmica; *Escherichia coli* *Enteroagregativa* (EAEC), a maior característica desta é que as bactérias se dispõem como tijolos empilhados, sua infecção é típica com manifestações de diarréia secretora aquosa e com muco, podendo ocasionar febre e vômito; *Escherichia coli* *Enterotoxigênica* (ETEC), apresenta capacidade de produzir enterotoxina termolábil e termoestável, responsável por causar diarréias brandas a graves principalmente em crianças menores de cinco anos; *Escherichia coli* *Enteroinvasora* (EIEC), importante causador de diarréias em crianças menores de dois anos e adultos e responsáveis por invadir células provocando infecções semelhantes ao de outra espécie chamada *Shigella*; *Escherichia coli* *que Causa Infecções extra-intestinais* (ExPEC- *Extraintestinal Pathogenic Esherichia coli*), neste grupo estão incluídas as bactérias comensais da flora intestinal e também as cepas enteropagênicas extra-intestinais capazes de provocar uma diversidade de doenças em vários locais do

corpo humano, como, meningite, infecções do trato urinário, infecções intra-abdominais, pneumonias, septicemias, dentre outras (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

3.4 Plantas Medicinais - *Eugenia Uniflora* L.

A pitangueira (*Eugenia uniflora* - Myrtaceae) é uma árvore frutífera, podendo ser utilizada no paisagismo ou cultivada em pomares domésticos. A madeira é empregada na confecção de cabos de ferramentas e outros instrumentos agrícolas. Floresce entre agosto e novembro e os frutos amadurecem entre outubro e janeiro. (LORENZI, 1998).

A pitanga é o fruto da pitangueira, ou *Eugenia uniflora* L., dicotiledônea da família Myrtaceae. Tem a forma de drupa globosa e carnosa, com as cores vermelha (a mais comum), amarela ou vermelha escuro. Na mesma árvore, o fruto poderá ter desde cores verde, amarelo e alaranjado até a cor vermelho intenso de acordo com o grau de maturação. Existe outra espécie homônima, a *Eugenia uniflora* O. Berg, descrita em 1857, e renomeada *Eugenia lineatifolia* (O. Berg) Mattos em 1993. Este fruto não é produzido comercialmente, pois quando maduro, fica muito tenro e danifica-se facilmente com o transporte. Apesar disto, é apreciado no Brasil pelo seu sabor e riqueza em cálcio. (LORENZI, 1998).

A pitangueira é uma árvore nativa da Mata Atlântica. Apesar de ser tipicamente brasileira, esta espécie atualmente pode ser encontrada na ilha da Madeira (Portugal), América do Sul (Argentina, Bolívia, Guianas, Paraguai, Uruguai e Venezuela), América Central (incluindo Caribe), América do Norte (exceto Canadá) e África (Gabão, África do Sul e Madagascar). É uma árvore medianamente rústica, de porte pequeno a médio. A copa globosa é dotada de folhagem perene. As folhas pequenas e verde-escuras, quando amassadas, exalam um forte aroma característico. As flores são brancas e pequenas, tendo utilidade melífera (apreciada por abelhas na fabricação do mel). (SCALON, 2001)

A planta é cultivada tradicionalmente em quintais domésticos. O seu plantio é feito simplesmente pela colocação de uma semente de pitanga no solo ou pelo transplante de uma muda até o local adequado. Dá-se bem em quase todo tipo de solo, incluindo os terrenos arenosos junto às praias. É também usada como árvore ornamental

em áreas urbanas de cidades brasileiras, na recuperação de áreas degradadas de sistemas agroflorestais multiestrato e em reflorestamentos heterogêneos. As pitangueiras com frutos são um ótimo atrativo para pássaros e animais silvestres em geral.

3.5. Descrição botânica; Princípio ativo; Atividades biológicas de *E. uniflora* L.

As figuras 01, 02 e 03 retratam as partes do vegetal *E. uniflora* L., utilizadas neste trabalho.



Figura 01: Folha de *E. uniflora* L.
Fonte: André Ribeiro



Figura 02: Frutos de *E. uniflora* L.
Fonte: André Ribeiro



Figura 03: Talos de *E. uniflora* L.
Fonte: André Ribeiro

Espécie: *Eugenia uniflora* L.

Nomes populares: Pitanga, Cereja Brasileira, Pitangueira.

Família: *Myrtaceae*

Parte utilizada: Folhas e sementes.

Constituintes: Folhas e frutos: éster, flavonóides, óleos voláteis e, principalmente, polifenóis.

Efeitos: Estudos utilizando testes in vitro e in vivo, comprovam alguns efeitos de extratos das folhas de pitangueira, como:

- Antidiarreico (Atinparasitário - Giardia lamblia)
- Diurético
- Antiinflamatório, antifúngico e antimicrobiano.
- Inibição a xantino oxidase
- Antimalárico e tripanossomicida
- Hipoglicemiante
- Hipotensor (diminui a pressão arterial)

- Inibição da replicação do vírus Epstein- Barr (causador do carcinoma nasofaríngeo), ação dos elagitaninos, eugeniflorina D1 e D2.

Indicações da pitangueira: Contra diarreias, hipertensão e febre.

Contraindicações: Pacientes com problemas cardíacos.

Interações: Aumenta o tempo de sono induzido por fenobarbital

Toxicidade: Estudos demonstram que não há toxicidade aguda, mas não há dados sobre o uso prolongado. (CRIASAÚDE, 2012).

4. METODOLOGIA

4.1 Material Vegetal

Nesta pesquisa foram obtidos extratos preparados a partir da *Eugenia uniflora* L. A planta foi selecionada após realizar levantamento bibliográfico de pesquisas. A coleta realizou-se na cidade de Campina Grande, a fim de ser estudada quanto ao seu comportamento antimicrobiano frente à micro-organismos ATCC responsáveis por afecções humanas.

4.2 Microorganismos testados

Foram utilizadas cepas microbianas provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

4.3 Local de realização dos experimentos

4.2.1 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados no laboratório de Fitoterapia da Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB.

4.2.2 Cepas microbianas

As cepas utilizadas foram obtidas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba.

4.4 Meios de cultura

Foi utilizado o Caldo de enriquecimento BHI (Brain Heart Infusion), a fim de se obter a viabilidade dos microrganismos; Para o cultivo bacteriano utilizou-se o meio Ágar Müller-Hinton. Os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções e recomendações do fabricante DIFICO®, seguindo a distribuição de 20mL do mesmo, em placas de Petri estéreis.

4.5 Preparação dos extratos de *Eugenia uniflora* L.

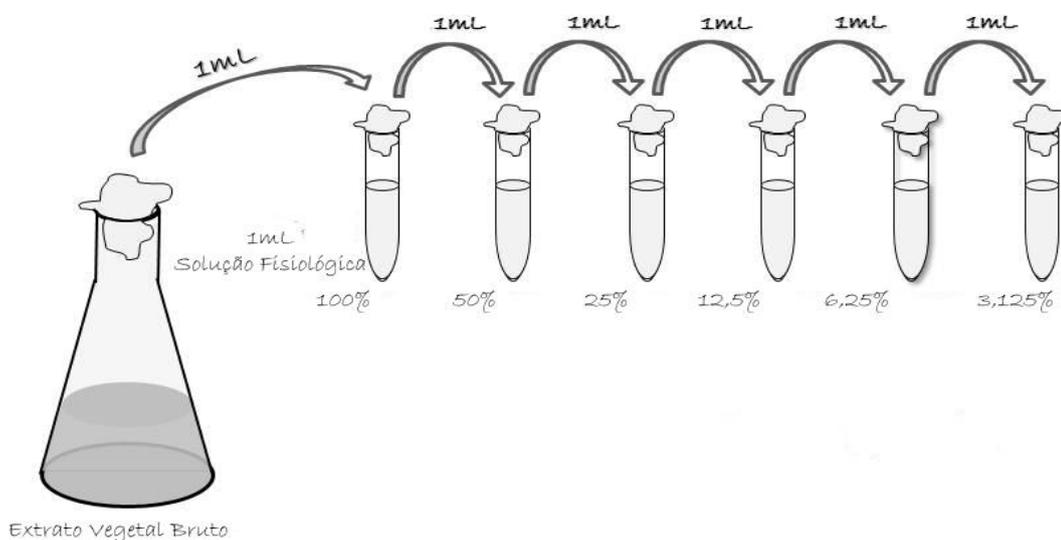
Os extratos foram obtidos segundo a Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959), utilizando-se o processo de maceração. O álcool etílico hidratado (30 % de água) foi utilizado como solvente, devido a sua baixa toxicidade, não inibindo o bioensaio, seu ótimo desempenho no processo extrativo e sua viabilidade econômica (ANTUNES, 2001 apud ELOFF, 1998)

Após a coleta do material vegetal, este passou pelas etapas de lavagem e separação de folhas, frutos e talos. Posteriormente, as folhas, frutos e talos foram pesados separadamente, fracionados e colocados em recipientes adequados, vertendo-se sobre cada uma das partes vegetais volume correspondente às suas massas (volume correspondente a proporção 1:1 de álcool hidratado), dando-se início ao processo de maceração. Os extratos foram colocados em recipientes de vidro estéreis, vedados com tampa e durante os oito dias seguintes, em temperatura ambiente, sob abrigo de luz e umidade, foram realizadas leves agitações periódicas. Logo após, realizou-se o processo de expressão, correção do volume final, filtração e acondicionamento em vidros de cor âmbar, à temperatura ambiente, sem interferência de luz e umidade (FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 1959).

4.6 Diluição dos extratos e aplicação em discos

Para o preparo das diluições, foram utilizados seis tubos de ensaio estéreis, identificados com suas respectivas concentrações. Com auxílio de pipetador e ponteiros estéreis, foi colocado 2mL de extrato puro no primeiro tubo (Concentração de 100%), retirando-se deste o volume de 1mL e aplicando tal volume no tubo seguinte (Tubo 2 – Concentração de 50%), que continha 1mL de solução fisiológica. De forma semelhante,

o procedimento foi feito até o tubo de numeração 6 (Concentração de 3,125%), sempre obtendo 1mL do tubo anterior e aplicando este volume no tubo seguinte que continha sempre 1mL de solução fisiológica.



Esquema de diluição dos extratos para obtenção das concentrações reduzidas.

4.7 Procedimentos Microbiológicos

4.7.1 Suspensão microbiana e inóculo

Para a realização dos testes, as cepas utilizadas foram mantidas primeiramente em Caldo de enriquecimento BHI (Brain Heart Infusion), a fim de se obter a viabilidade dos microrganismos, sendo cultivadas após 24 horas em meio Ágar Müller-Hinton.

Para o inóculo, as cepas escolhidas foram mantidas em meios de cultura apropriados, durante 24h/37°C. Os inóculos foram preparados e padronizados em solução fisiológica esterilizada, comparando-se a turbidez com o tubo nº 0,5 da escala Mc Farland a fim de se obter cerca de 10^6 UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI, 2005).

4.7.2 Método de difusão em disco

Os testes para verificação da sensibilidade microbiana aos extratos em estudo foram realizados através da técnica de difusão em disco.

As placas de Petri foram inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície com o auxílio de “swabs” estéreis mergulhados na suspensão contendo os inóculos, buscando-se obter crescimento uniforme dos microorganismos.

Posteriormente, em cada placa foi feita a identificação dos locais que os discos com diferentes concentrações deveriam ser aplicados, obedecendo-se a diferença de aproximadamente 20mm entre os discos e 15mm a partir da borda da placa, e com auxílio de pinças estéreis, os discos previamente impregnados com extrato em diferentes concentrações foram distribuídos sobre as placas.

As placas foram então incubadas a 28-35°C por 24 horas e após este período, foram medidas as zonas de inibição, em milímetros com auxílio de um halômetro. Cada ensaio foi realizado em duplicata para cada cepa selecionada. O resultado final foi determinado pelo cálculo da média aritmética do tamanho dos halos de inibição (mm) encontrados. (BAUER *et al.*, 1966).

4.7.3 Ensaio de atividade antimicrobiana

Realizou-se triagem da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos pela técnica de difusão em disco, semeando o microrganismo, com auxílio de *swabs* estéreis mergulhados na suspensão contendo o inóculo, por toda superfície do ágar, de modo a se obter um crescimento uniforme. Cada placa continha sete discos, sendo seis deles embebidos com extratos com concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125% e um deles (disco central) contendo álcool 70% correspondente ao controle do solvente utilizado na elaboração dos extratos.

As placas ficaram incubadas em estufa por 24 horas, obedecendo-se ao controle de temperatura (28-35°C). As leituras das placas foram realizadas após este período, através da medição dos halos de inibição de crescimento (mm) (BAUER *et al.*, 1966).

4.7.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

Entende-se por CIM, a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento microbiano (presença de halo de inibição do crescimento), após incubação por 24h/37°C (CONSENTINO *et al.*, 1999; FABRY *et al.*, 1998).

Cada ensaio foi realizado em duplicata, e o resultado obtido foi expresso pela determinação da média aritmética dos halos de inibição obtidos nos ensaios.

A atividade biológica do produto será considerada positiva quando a média dos halos de inibição for igual ou superior a 8 mm de diâmetro (SAKAR *et al.*, 1988; WONG-LEUNG, 1988; NAQUI *et al.*, 1991; CATÃO, 2007; CATÃO *et al.*, 2010; PALMEIRA *et al.*, 2010).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios de difusão em disco realizados com os extratos hidroalcoólicos das folhas, frutos e talos da *Eugenia uniflora L.*, demonstraram atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, no que diz respeito aos dois primeiros extratos, visto que após leitura das placas, foi possível observar a formação de halos de inibição com diâmetros superiores a 8mm. O extrato do talo da *Eugenia uniflora L.* não demonstrou atividade antimicrobiana, visto que não houve formação de halo, conforme mostra a tabela 1.

TABELA 1: DIÂMETRO DOS HALOS NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS TESTADOS DE ACORDO COM A PARTE DA PLANTA UTILIZADA

PLANTA/FASE	CONCENTRAÇÃO	DIÂMETRO DO HALO (mm)		
FOLHA (A)	100%	13/13	0/0	0/0
	50%	9/8	0/0	0/0
	25%	0/0	0/0	0/0
FRUTO (B)	100%	9/8	0/0	0/0
	50%	0/0	0/0	0/0
	25%	0/0	0/0	0/0
TALO (C)	100%	0/0	0/0	0/0
	50%	0/0	0/0	0/0
	25%	0/0	0/0	0/0
		S.A	E.C	P.A

Tabela 1: Diâmetro do halo obtido para os extratos nas suas respectivas concentrações. S.A = *Staphylococcus aureus*; E.C = *Escherichia coli*; P.A = *Pseudomonas aeruginosa*.

Para as demais cepas utilizadas (*E. coli*, *P. aeruginosa*), não foi observada atividade antimicrobiana em nenhum dos extratos, pelo motivo de não ter ocorrido formação de halos de inibição em nenhuma das concentrações trabalhadas.

Em se tratando dos extratos que demonstraram atividade antimicrobiana, ou seja, os extratos da folha e do fruto, observou-se formação de halos de inibição para as concentrações de 100% e 50% em se tratando do extrato da folha, e halos de inibição para a concentração de 100% em se tratando do extrato do fruto.

Nas cepas de *S. aureus*, o diâmetro dos halos obtidos para o extrato da folha à 100% foram de 13mm na primeira placa e 13mm na segunda placa, obtendo assim média aritmética de 13mm, confirmando atividade antimicrobiana justificada pelo tamanho do halo ser superior a 8mm. À 50% de concentração, os halos apresentaram diâmetros de 9mm e 8mm, obtendo assim média aritmética de 8,5mm, o que também confirmou atividade antimicrobiana quando comparado com o diâmetro de 8mm que preconiza a literatura consultada.

No que diz respeito ao comportamento do extrato bruto do fruto, diante das cepas de *S. aureus*, os diâmetros obtidos foram de 9mm na primeira placa e 8mm na segunda placa, o que proporcionou uma média aritmética de 8,5mm, também confirmando atividade antimicrobiana desse extrato diante de tal concentração.

Com referência aos discos do controle (Álcool 70%), não houve formação de halos de inibição nas cepas, confirmando desta forma que o solvente utilizado para o preparo dos extratos utilizados na pesquisa não interferiu no crescimento das cepas ATCC testadas.

As concentrações abaixo de 50% não demonstraram formação de halos de inibição em nenhum dos extratos testados, podendo-se então concluir que o extrato do talo não apresenta atividade antimicrobiana. O extrato do fruto apresentou atividade antimicrobiana desde que seja aplicado em concentrações de 100% (extrato bruto) e o extrato da folha apresenta atividade antimicrobiana em concentrações de 100% (extrato bruto) e 50% frente as cepas de *S. aureus*.

Vale ressaltar que a composição química das plantas pode sofrer influencia no que se refere à idade da planta, localização geográfica, variações climáticas, entre outros interferentes. Além disso, é importante ressaltar que todos esses possíveis interferentes foram observados antes da coleta do material utilizado, buscando-se selecionar um vegetal ausente de tais interferências, de modo a não comprometer o verdadeiro potencial desta planta no bioensaio.

As figuras 03 e 04 mostram os testes de atividade antimicrobiana dos extratos de folha e fruto e suas respectivas diluições, bem como o controle do solvente utilizado no bioensaio.

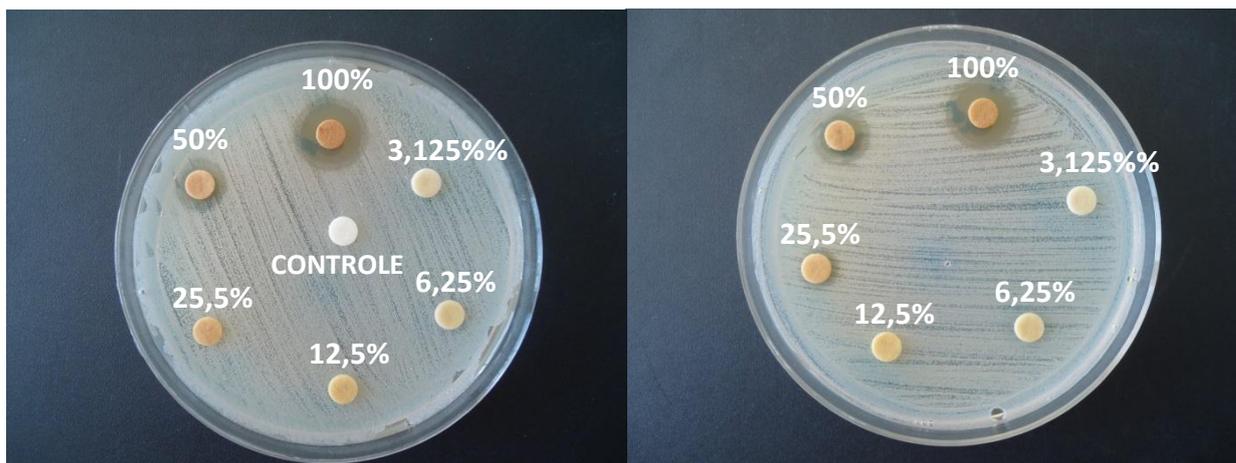


Figura 03: Halos de inibição em cepas de *S. aureus* referentes ao extrato obtido das folhas de *E. uniflora* L. Inibição em discos com extratos em concentração de 100 e 50%.

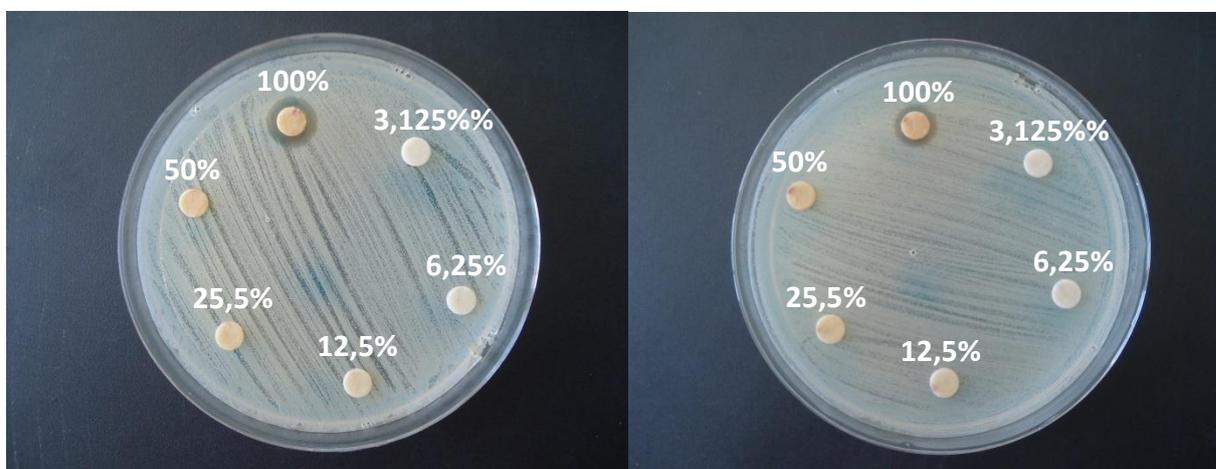


Figura 04: Halos de inibição em cepas de *S. aureus* referentes ao extrato obtido dos frutos de *E. uniflora* L. Inibição em discos com extrato bruto (100%).

6. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos do estudo, pode-se concluir que:

- Extratos hidroalcólicos das folhas e frutos da Pitanga após os testes de difusão em disco demonstraram atividade antimicrobiana nas concentrações de 100 e 50% (folhas) e 100% (frutos) frente às cepas de *S. aureus* ATCC 25923;
- Extratos hidroalcólicos das folhas e frutos da Pitanga após testes de difusão em disco não demonstraram atividade antimicrobiana nas concentrações de 25% e concentrações mais baixas (folhas) e 50% e concentrações mais baixas (frutos);
- Extratos hidroalcólicos de folhas, frutos e talos não demonstraram atividade antimicrobiana para as cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 nas concentrações trabalhadas;
- Extratos hidroalcólicos dos talos da Pitanga não apresentaram atividade antimicrobiana nas cepas testadas;
- O solvente utilizado no preparo dos extratos não interferiu nos resultados obtidos, mediante a ausência de formação de halos nos discos embebidos com o mesmo;

Diante dos resultados obtidos na pesquisa desenvolvida, sugere-se o desenvolvimento de outras pesquisas com os extratos de *E. uniflora* L., como por exemplo, alternativas que proporcionem sua potencialização na atividade antimicrobiana. Um dos métodos possíveis para este objetivo, seria a associação dos extratos de *E. uniflora* L. à antibióticos de modo a se obter possíveis aumentos de potencial da atividade destes.

A utilização de extratos vegetais é uma alternativa válida no que diz respeito no controle ou combate de patógenos, sendo então de grande interesse pesquisas que explorem o potencial deste vegetal bem como outros vegetais. É viável estimular esta atividade visto que apresenta baixo custo, fácil acesso a materiais e devido a grande variedade vegetal encontrada que ainda hoje não foi explorada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, R.M.P. et al (2006). *Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16(4): 517-524

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Triagem das atividades antimicrobiana e citotóxica de algumas plantas medicinais brasileiras usadas na cidade de Governador Valadares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n.2, p. 195-202, 2006.

BAUER, A.W.M.M.; KIRKY, J.C.; TURCK, M (1966). *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. **American Journal Of Clinical Pathology**, 45(3) 493-496

CATÃO, R. M. R. (2007). *Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas I, II e III sobre bactérias e fungos leveduriformes*. 126p. Tese de Doutorado – UFPB, João Pessoa - PB

CATÃO, R. M. R. et al (2010). Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 42(1): 9-14

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINCAS, L. E. M. **Plantas Medicinais do cultivo á terapêutica**. 7 ed. Vozes. Petrópolis: RJ, 2008. p.20.

CRIASAÚDE, Portal Online de saúde e medicina natural. 2012. Disponível em: <http://www.criasaude.com.br/eugeniauniflora>. Acesso em: 15/03/2013.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. 1 ed. Manole. São Paulo: SP, 2001. FERREIRA, A. B. H. *Novo Dicionário da Língua Portuguesa*. Segunda edição. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. p.1 341

HARRY LORENZI. **Potenciais fitoterápicos de vegetais da Flora Brasileira**. *Árvores brasileiras* vol. 1, Instituto Plantarum. Rio de Janeiro. 2001.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. 20 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998. LIMA, A.; LOPES, A. H. N. **Índice terapêutico fitoterápico**. 1 ed. EPUD. Petrópolis: RJ, 2008.

LIMA, J. L. S.; FURTADO, D. A.; PEREIRA, J. P. G.; BARACUHY, J. G. V.; XAVIER, H. S. **Plantas medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil**. 1 ed. Mapa. Campina Grande: PB, 2006.

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

MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.4, p.316-320, 2005.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Quim. Nova**. v. 24, n. 1, p. 105-11, 2001.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 1, p. 77-82, 2006.

PACKER, J. F.; LUZM, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 102-107, 2007.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia Racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4 ed. Manole. Barueri: SP, 2001.

SADER, H. S.; MENDES S. E.; GALES, A. C.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A.; ZOCCOLI, C.; SAMPAIO, J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros. **Journal Pneumol**, v. 27, n. 2, p. 59-67, 2001.

SCALON, S. P. Q, et al. **Germinação e crescimento de mudas de pitangueira. (eugenia uniflora l.) Sob condições de sombreamento**, Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 23, n. 3, p. 652-655, dezembro 2001.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. Atheneu. São Paulo: SP, 2005.

VIOLANTE, I. M. P. **Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste**. 2008. 72p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.