

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
BIOTECNOLOGIA

THAIANE FERREIRA DE LIMA

**PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS
FOLHAS DE *Smilax campestris* Grisebach**

Dourados, 2016.

THAIANE FERREIRA DE LIMA

PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE
Smilax campestris Grisebach

Trabalho de conclusão de curso submetido à
Universidade Federal da Grande Dourados
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do Grau de Bacharela em
Biotecnologia. Sob a orientação da Profa.
Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.

Dourados, 2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

L732p	<p>Lima, Thaiane Ferreira de. Propriedade antimicrobiana e atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de <i>Smilax campestris</i> Grisebach. / Thaiane Ferreira de Lima. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 59f.</p> <p>Orientador: Kelly Mari Pires de Oliveira. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Plantas medicinais. 2. Japecanga. 3. Antimicrobiano. 4. Antioxidante. 5. Fitoquímica. I. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

Thaiane Ferreira de Lima

**PROPRIEDADE ANTIMICROBIANA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Smilax campestris* Grisebach**

Trabalho de conclusão de curso submetido à Universidade Federal da Grande Dourados como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Bacharela em Biotecnologia. Sob a orientação da Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

Banca Examinadora:

Allan Belarmino Rodrigues - FACET/UFGD
Examinador

Msc. Fabiana Gomes da Silva Dantas - FCBA/UFGD
Examinadora

Msc. Renata Pires de Araújo - FCBA/UFGD
Examinadora

Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira - FCBA/UFGD
Orientadora

Dedico este trabalho a todos aqueles que fazem
ou fizeram a diferença em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado força para concluir essa etapa da minha jornada.

Aos familiares, em especial meus pais, Rosângela e Adenilson, que sempre me apoiaram, incentivaram, motivaram e proporcionaram condições favoráveis em todas as horas e sem os quais, não teria conseguido chegar onde estou hoje, desde antes da escolha da minha profissão, até minha formação atual.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelly Mari de Oliveira, pela oportunidade de realização deste trabalho, pela ajuda, atenção, paciência e contribuição à minha formação.

À minha co-orientadora Msc. Fabiana Gomes da Silva Dantas, pelas dicas e sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia Aplicada, Andressa, Bianca, Fernanda, Melina, Pamela, Vagner, Wellinton, que me proporcionaram horas de trabalho mais agradáveis, em especial à Fabiana, Adriana, Danny, Stephanie e Allan que me ajudaram desde o primeiro momento, auxiliando no decorrer da pesquisa, sempre com paciência, dedicação e bom humor.

As técnicas Renata e Suellen, por além de sempre se disponibilizarem para retirar as dúvidas frequentes sobre os equipamentos utilizados se tornarem valorosas amigas.

Ao curso de Biotecnologia, por além de ter me fornecido o conhecimento necessário, me proporcionou a companhia das melhores pessoas que tive o privilégio de chamar de amigos (irmãos), a Gleyce e Robson agradeço a vocês por terem aceitado a dividir essa jornada comigo.

À todos os meus amigos, em especial a Camilla, Cíntia, Daianny, Gleyce, Flávia, Marciel, Maury, Robson e Wellinton pelo apoio, paciência e por se manterem ao meu lado nos momentos bons e ruins durante todos esses anos. Suas companhias sempre me renovaram nos momentos difíceis.

E, por fim, a quem esteve sempre ao meu lado me aturando e acompanhando a cada passo dessa caminhada, ao meu namorado Luis Henrique, por toda a força e positivismo dados em todos os momentos, por todo o seu amor, carinho e capacidade de me acalmar. És também parte da minha base e dos nomes mais importantes a citar!

A todos vocês deixo a minha gratidão e o mais sincero pedido de desculpas pela minha ausência e falta de atenção!

Eu aprendi...
...que ignorar os fatos não os altera;

Eu aprendi...
...que quando você planeja se nivelar com alguém, apenas está permitindo que essa
pessoa continue a magoar você;

Eu aprendi...
...que o AMOR, e não o TEMPO, é que cura todas as feridas;

Eu aprendi...
...que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa pessoa;

Eu aprendi...
...que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;

Eu aprendi...
...que as oportunidades nunca são perdidas; alguém vai aproveitar as que você perdeu.

Eu aprendi...
...que quando o ancoradouro se torna amargo a felicidade vai aportar em outro lugar;

Eu aprendi...
...que não posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a respeito;

Eu aprendi...
...que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento
ocorre quando você está escalando-a;

Eu aprendi...
...que quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer.

William Shakespeare

RESUMO

As plantas medicinais representam uma alternativa econômica, acessível e aplicável a diversas patologias, especialmente nos países em desenvolvimento. Dentre elas, a *Smilax campestris* Grisebach utilizada comumente pela população no tratamento de gripes, febres e resfriados e em doenças causadas por microrganismos. Tendo em vista a crescente busca por novos agentes antimicrobianos, o aumento da resistência dos microrganismos patogênicos frente ao uso intensivo de produtos sintéticos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para 18 microrganismos de interesse clínico por meio da técnica de microdiluição em caldo e teste antioxidante foi realizado com o radical livre DPPH. Também foi realizada a quantificação de flavonoides, fenóis e taninos. O extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach apresentou atividade para *Staphylococcus epidermidis* (CIM= 1000 µg/mL) e também demonstrou uma boa atividade antioxidante com uma IC₅₀ de 13,1±0,1 µg/mL⁻¹. Obteve a concentração de flavonoides de 70,3±1,6 mg EQ/g, fenóis 123,9±1,0 mg EAG/g e taninos condensados 11,8±0,1 mg ECA/g. Os resultados mostraram que a utilização do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach pode ser uma alternativa promissora para o controle desse microrganismo patogênico e como uma ótima fonte de antioxidante natural.

Palavras Chaves: plantas medicinais, japecanga, antimicrobiano, antioxidante, fitoquímica.

ABSTRACT

Medicinal plants represent an economical alternative, accessible and applicable to several diseases, especially in developing countries. Among them, people to treat flu, fevers, colds and diseases caused by microorganism commonly use the *Smilax campestris* Grisebach. In view of the growing search for new antimicrobial agents, increasing resistance of pathogenic microorganisms against the intensive use of synthetic products, this study aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the ethanol extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for 18 microorganisms of clinical interest through the broth microdilution technique and antioxidant test was carried out with free radical DPPH. Also quantitation of flavonoids, phenols and tannins been performed. The ethanolic extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach showed activity for *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 1000 ug/mL), and has shown good antioxidant activity with an IC₅₀ of 13.1±0.1 ug/ml⁻¹. Obtained the concentration of flavonoids of 70.3±1.6 mg EQ/g, phenols 123.9±1.0 mg GAE/g and condensed tannins 11.8±0.1 mg ACE/g. The results showed that the use of ethanol extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach may be a promising alternative for the control of this pathogenic organism and as a great source of natural antioxidant.

Key words: medicinal plants, japecanga, antimicrobial, antioxidant, phytochemical.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Japacanga ou salsaparrilha, *Smilax campestris* Grisebach..... 14
- Figura 2.** Fatores relacionados à ação dos antimicrobianos..... 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos desenvolvidos com *Smilax campestris* Grisebach..... 15

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *Smilax campestris* Grisebach..... 35

Tabela 3. Quantificação de flavonoides, fenóis, taninos condensados e atividade antioxidante do extrato de *Smilax campestris* Grisebach..... 37

ABREVIACÕES

AlCl₃: Cloreto de Alumínio

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: American Type Culture Collection

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CH₃COOK: Acetato de Potássio

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DPPH: 1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila

EAG: Equivalente de ácido gálico

EAT: Equivalente de ácido tânico

ECA: Equivalente de catequina

EQ: Equivalente de quercetina

EROs: Espécies reativas ao oxigênio

h: Hora

IC₅₀: Concentração capaz de reduzir em 50% da concentração inicial de DPPH

M: Molar

Na₂CO₃: Carbonato de sódio

nm: Nanômetros

OMS: Organização Mundial da Saúde

***Smilax campestris* Griseb.**: *Smilax campestris* Grisebach

RPMI 1640: Meio sintético complexo criado pelo Roswell Park Memorial Institute

µg: Microgramas

µL: Microlitros

°C: Graus Celsius

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral.....	13
2.2. Objetivos Específicos.....	13
3. Revisão de Literatura	13
3.1. Plantas Medicinais.....	13
3.2. <i>Smilax campestris</i> Grisebach.....	14
3.3. Antimicrobianos Naturais.....	16
3.4. Antioxidantes.....	18
4. Referências Bibliográficas	20
5. Artigo Científico	27
1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	30
2.1. Material Vegetal.....	30
2.2. Obtenção do Extrato Etanólico.....	30
2.3. Atividade Antimicrobiana.....	30
2.3.1. Microrganismos.....	30
2.3.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	31
2.3.3 Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	32
2.4. Ensaio Antioxidante com o Radical Livre DPPH.....	32
2.5. Análise Quantitativa de Compostos Fitoquímicos.....	33
3. Resultados e Discussão.....	34
4. Conclusão.....	38
5. Referências Bibliográficas.....	39
6. Anexos	45

1. Introdução

A procura por novas drogas com atividade antimicrobiana tem sido uma constante preocupação devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, o ressurgimento de várias infecções que pareciam ter sido controladas e o preocupante aumento da resistência de microrganismos. Sendo assim, a busca por fitoterápicos no tratamento de muitas doenças é uma das alternativas mais utilizadas nos últimos anos, devido aos bons resultados que estes proporcionam (HÖFLING et al., 2011).

Pesquisas com plantas medicinais e suas propriedades têm proporcionado a produção de medicamentos com custos reduzidos e, conseqüentemente, mais acessíveis à população (LOPEZ, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população mundial faz o uso de plantas medicinais para tratamento de alguma enfermidade, desse total 30% foi por indicação médica. Desta forma, a OMS tem recomendado o uso de produtos naturais como uma terapia alternativa a fim de reduzir os custos dos programas de saúde pública (SILVA et al., 2012).

As plantas medicinais são muito utilizadas no Brasil. *Smilax campestris* Grisebach, popularmente conhecida como salsa-parrilha, é uma trepadeira frequentemente consumida na dieta e/ou fornecimento de matéria-prima para produção de material farmacêutico primário público (OZSOY et al., 2008).

Essa trepadeira é encontrada em regiões tropicais e subtropicais em diferentes locais do mundo. É comumente utilizada pela população na forma de infusões de suas folhas, raízes e rizomas no tratamento de doenças como a sífilis, gota, reumatismo, doenças da pele, asma, dores de dente, feridas, diuréticos, sudorífico, dor ocular, anti-inflamatórios, doenças vaginais causadas por fungos e como tônico refrescante para problemas digestivos (VANDERCOLME, 1947; MAGALHÃES, 1997; GARLET, 2000; MARTINS et al., 2012; RUGNA et al., 2013).

Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante frente ao ensaio com o radical livre 1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila (DPPH), do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Griseb.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a ação antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Griseb. frente a bactérias e leveduras;
2. Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Griseb.
3. Quantificar metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Griseb.

3. Revisão bibliográfica

3.1 Plantas Medicinais

O Brasil possui uma grande biodiversidade e conseqüentemente tradição no uso de plantas medicinais como uma terapia alternativa no tratamento de inúmeras enfermidades (PIZZIOLO et al., 2011; SOARES, 2013). Apesar de ainda não haver comprovação de algumas das propriedades terapêuticas conferidas às plantas medicinais, 80% da população mundial depende de tratamentos com essas plantas para seus primeiros cuidados com a saúde. Assim, utilizam-se dos seus extratos e componentes ativos se baseando apenas nos resultados empíricos (PIZZIOLO et al., 2011; SOARES, 2013).

O efeito farmacológico encontrado em plantas medicinais é devido a substâncias químicas, que em sua maioria, são oriundas do seu metabolismo secundário, que possui uma função de relacionar a planta com o ambiente que a envolve. Essas substâncias do metabolismo secundário auxiliam as plantas na defesa química contra insetos e microrganismos ou podem interferir em processos simbióticos, apresentando grande importância para a adaptação e a propagação das espécies vegetais. Também são responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas (DUARTE, 2006; OLIVEIRA et al., 2011; SOARES, 2013).

Muitos metabólitos secundários possuem grande valor comercial devido sua importância biológica (atividade antimicrobiana e antioxidante), exemplos de metabólitos secundários são o grupo dos compostos fenólicos, representado pelos alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos e cumarinas (AMORIM et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; LIMA NETO et al., 2015).

3.2 *Smilax campestris* Grisebach

O gênero *Smilax spp.* pertence à família Smilacaceae e possui aproximadamente 300 espécies (JUDD et al., 2009). No Brasil o gênero é representado aproximadamente por 30 espécies popularmente conhecidas como salsa-parrilha ou japecanga (SOUZA & LORENZI, 2005).

A espécie *Smilax campestris* Grisebach é uma trepadeira dióica, videira ou videira herbácea, que floresce no inverno e apresenta frutos na primavera e verão, as folhas são simples e alternas, possui pecíolos com gavinhas, venação acródroma primário; hastes mais espessas são rizóforos, caules aculeados e se encontra presente em vários países da América do Sul, distribuídas amplamente no Brasil (ANDREATA, 1997; RUGNA et al., 2013).

Ocorre em regiões temperadas e tropicais em bordas de florestas menos úmidas, particularmente em cerrados e florestas estacionais. No Brasil o uso de espécies da *Smilax spp.* para fins medicinais tem sido realizado desde o século 16, caracterizando como gênero mais importante da família (SOUZA & LORENZI, 2005; MEDEIROS et al., 2007; JUDD et al., 2009).

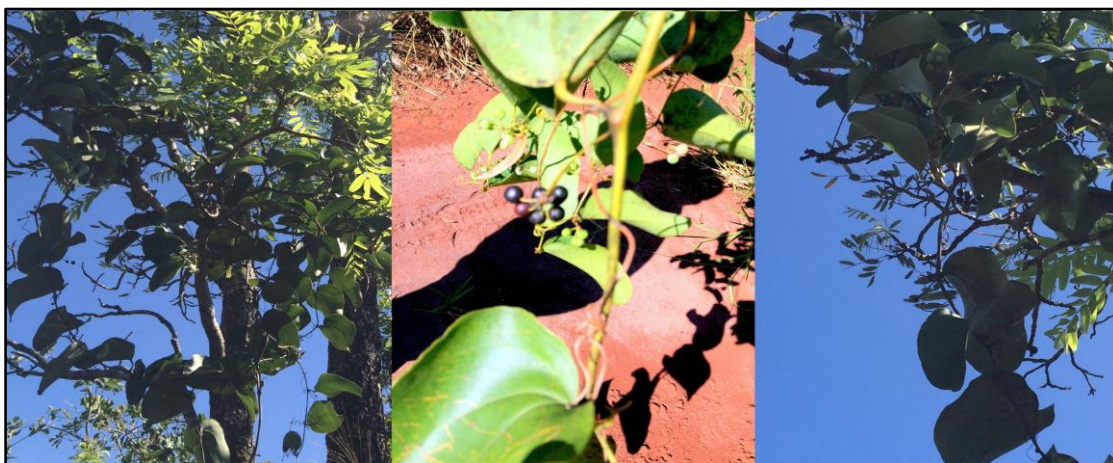


Figura 1. Japecanga ou salsaparrilha, *Smilax campestris* Grisebach (Fonte: Autor).

Popularmente é utilizada na forma de infusões de suas folhas, raízes para tratamento de doenças como a sífilis, gota, reumatismo, doenças da pele, asma, dores de dente, feridas, diuréticos, sudorífico, dor ocular e como tônico refrescante para problemas digestivos (VANDERCOLME, 1947; MARTINS et al., 2012; RUGNA et al., 2013).

Diversos estudos foram realizados para uma melhor descrição do seu potencial biológico, morfologia e taxonomia da espécie *Smilax campestris* Grisebach (Tabela 1.). A evolução nos estudos de metabólitos secundários da *Smilax campestris* demonstram a comprovação de efeitos farmacológicos presente em seus compostos de acordo com Rugna et al. (1999).

Outros estudos quantificaram a produção de flavonoides ou polifenóis de diversos órgãos observando se mantiveram constante ou não e se diferenciaram em perfil químico, sofrendo interferência da radiação solar, onde realizaram uma análise comparativa de extratos de plantas desenvolvidas em locais com alta radiação e outras com baixa e sempre distantes uma das outras para que não haja intervenções umas nas outras ocasionando erro experimental, outra fonte de variação considerada foi a herbivoria sofrida pelo ataque de predadores naturais da espécie vegetal (RUGNA et al., 2005; RUGNA et al., 2007; RUGNA et al., 2011).

Tabela 1. Estudos desenvolvidos com *Smilax campestris* Grisebach.

Partes Utilizadas	Estudo Desenvolvido	Referencia
Folhas, raízes e rizoforos	Diferenciar espécimes masculinos de femininos pela produção flavonoides.	Rugna et al., (2002)
Folhas	Capacidade antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> por meio de difusão em ágar.	Coelho de Souza et al., (2004)
Folhas e raízes	Determinar a taxonomia química e incidência de linhagens toxinogênicas de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Fusarium</i>	Rizzo et al., (2004)
Folhas	Observar oscilações na concentração de polifenóis.	Rugna et al., (2008)
Raízes e rizoforos	Descrição da morfoanatomia dos órgãos vegetativos subterrâneos e avaliação de interferência ambiental	MARTINS et al., (2010)

Toda a planta	Descrição sobre a morfologia e estudo sobre a germinação	MARTINS et al., (2012)
Partes aéreas	Descrição da morfoanatomia dos órgãos vegetativos aéreos	MARTINS et al., (2013)

3.4 Antimicrobianos Naturais

Agentes antimicrobianos são produtos do metabolismo secundário que inibem e/ou destroem o processo de crescimento de outros organismos, mesmo quando usados em baixas concentrações, correspondem a uma classe de fármacos que é consumida frequentemente em hospitais e na comunidade. Entretanto não afetam somente aos pacientes que os utilizam, mas também interferem de forma significativa na ecologia microbiana presente no local (ANVISA, 2007; MELO et al., 2012).

Atualmente muitos microrganismos patogênicos estão a desenvolver resistência aos antibióticos disponíveis, devido a grande pressão da seleção natural (CASTILLO & LING, 2014). Os microrganismos já selecionados naturalmente que possuem os genes de resistência, em especial as bactérias, são capazes de transmitir esses genes entre populações da mesma espécie ou espécies diferentes estritamente relacionadas, através da disseminação de genes de um organismo para o outro sendo mediados por plasmídeos ou por transposons (MELO & PERUSSI, 2012; TORTORA et al., 2012).

Diversos são os mecanismos que oferecem resistência a antibióticos apresentados pelos microrganismos, ressaltando entre eles a arquitetura da parede celular modificada, que diminuem a concentração intracelular do antimicrobiano por meio da impermeabilização da parede ou devido às bombas de efluxo que o bombeiam ativamente para fora da célula; inativação do antimicrobiano pela destruição ou modificação do mesmo; a alteração do local de ação do antimicrobiano, modificando a proteína de mutação alvo de antimicrobianos para reduzir a eficiência de ligação (MELO & PERUSSI, 2012; CASTILLO & LING, 2014).

A resistência microbiana pode causar infecções muito difíceis de serem tratadas, permanecendo no local e favorecendo a proliferação de microrganismos. Esse evento ocorre em maior proporção em ambientes hospitalares onde a incidência do uso dessas drogas, é proposta em grande quantidade (KADOSAKI et al., 2012).

O fato de que o processo de ganho de resistência microbiana é frequentemente mais rápido que o método de desenvolvimento de novas drogas, estabelecendo uma

grande consequência que é a falta de tratamentos disponíveis para serem administrados como opção em último caso (GRILLO et al., 2013), carecendo ainda mais de novos antimicrobianos.

O conhecimento dos princípios gerais que norteiam o uso de antimicrobianos, assim como das propriedades e características básicas dos antimicrobianos disponíveis, auxiliam a escolha terapêutica adequada, que permita o antimicrobiano exercer sua função de maneira adequada, para tal fim primeiramente deve-se atingir a concentração ideal, que seja capaz de atravessar a parede celular, manifestar afinidade pelo sítio de ligação no interior do microrganismo e por fim permanecer tempo suficiente para desempenhar seu efeito inibitório (Figura 2) (ANVISA, 2007; WOOLHOUSE & WARD, 2013).



Figura 2. Fatores relacionados à ação dos antimicrobianos (Adaptado de ANVISA, 2007).

A utilização dos mesmos antimicrobianos por longos períodos e indiscriminadamente proporciona um ambiente propício a resistência microbiana, tornando-se necessário a bioprospecção de propriedades antimicrobianas, impulsionando diferentes estudos de novas fontes naturais fornecedoras de antimicrobianos, uma alternativa eficaz e econômica aos fármacos industriais (VARGAS et al., 2004).

As plantas medicinais têm recebido grande importância na bioprospecção de antimicrobianos naturais, por isso tem aumentado os estudos que visam à utilização de produtos naturais com atividades biológicas. Como no estudo desenvolvido por Höfling et al. (2010) que avaliou extratos de diclorometano e metanol de algumas plantas (*Mentha piperita*, *Rosmarinus officinalis*, *Arrabidaea chica*, *Tabebuia avellanadae*, *Punica granatum* e *Syzygium cumini*) contra linhagens do gênero *Candida* através de testes de

concentração inibitória mínima, buscando uma alternativa para o tratamento das linhagens já resistentes aos medicamentos comerciais. A pesquisa realizada por Bastos et al. (2011) também analisou plantas utilizadas na medicina popular da cidade de Fortaleza-CE, preparadas de forma caseira no tratamento de doenças infecciosas, averiguando seu potencial antimicrobiano nos testes *in vitro*.

Rocha et al. (2013) efetuou um estudo com extratos etílicos de folhas e cascas de seis plantas do semiárido paraibano, sendo elas: folhas e cascas de quixabeira (*Syderoxylum obtusifolium* Roem e Schult), ipê rosa (*Tabebuia pentaphylla* Vell.) e João-mole (*Guapira graciliflora* Mart.), e somente folhas de mororó (*Bauhinia forficata* Linn), angico (*Anadenanthera colubrina* Brenan) e umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda), para verificar o potencial antimicrobiano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. A pesquisa desenvolvida por Rogatto et al. (2014) teve como foco caracterizar o potencial antimicrobiano da espécie vegetal *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer, onde o extrato etanólico foi avaliado por meio da técnica de difusão em ágar. Já no trabalho desenvolvido por Santos et al. (2015) foi realizado quatro frações do extrato etanólico de uma única planta (*Pouteria venosa*) para investigar o seu potencial antimicrobiano e citotóxico.

3.5 Antioxidantes

Substâncias capazes de impedir o estresse oxidativo, amenizando o acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e/ou quelando íons metálicos, evitando a peroxidação lipídica são denominadas de antioxidantes, estas encontram-se presentes em alimentos de origem vegetal que são consumidos diariamente evitando efeitos negativos nas funções fisiológicas humanas (PIENIZ et al., 2009; CORONADO et al., 2015).

EROs ou radicais livres são subprodutos do metabolismo celular aeróbico (ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio), liberados durante a transição de elétrons pela rota de ação catalítica de enzimas, estando em quantidades adequadas atuam como moduladoras de processos biológicos internos, incluindo a sinalização da transdução, transcrição ou morte programada (CUI et al., 2004; PIENIZ et al., 2009; SOARES, 2013), porém quando estas se acumulam no organismo gera uma situação de estresse, onde o nosso organismo gera uma situação de desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes para se proteger, resultando no quadro de estresse oxidativo (DALLAQUA & DAMASCENO, 2011). Este quadro de estresse induzido por radicais livres está envolvido no envelhecimento acelerado, na patogênese de várias doenças

(SOARES, 2013) e diversas formas de dano celular, tais como peroxidação de lipídios de membrana, agressão as proteínas dos tecidos e membranas, as enzimas e DNA, desencadeando inúmeras doenças (BERNAUD & FUNCHAL, 2011), esse envolvimento é sugeridos por muitas evidências bioquímicas, biológicas e clínicas (SOARES, 2013).

Para combater ou prevenir estes prejuízos, o organismo conta com defesas antioxidantes produzidos endogenamente ou fornecidas através da dieta, porém os componentes da dieta podem alterar o balanço antioxidante do organismo (BERNAUD & FUNCHAL, 2011). As células possuem muitas maneiras de controlar a produção de espécies reativas ao oxigênio que estão acumuladas no organismo (SOARES, 2013). Os antioxidantes agem nas três linhas de defesa orgânica contra as espécies reativas de oxigênio (SAMPAIO & ALMEIDA, 2009).

A primeira linha é a de prevenção, se caracteriza pela proteção contra a formação das substâncias agressoras (SAMPAIO & ALMEIDA, 2009), ingestão de antioxidantes endógenos enzimáticos, como o superóxido dismutase, a catalase e o sistema de glutathionas, dentre elas, glutathiona redutase e glutathiona peroxidase. Existe também os antioxidantes não enzimáticos que são lipossolúveis e hidrossolúveis (DALLAQUA & DAMASCENO, 2011). A segunda linha é a interceptação, nessa fase é necessário a captura dos radicais livres já formados pelos antioxidantes antes que iniciem suas atividades prejudiciais (ROCK et al., 2000). A última linha é o reparo, realiza-se somente quando as linhas de defesas anteriores não são efetivas (ROCK et al., 2000).

Mais atenção tem se dado aos antioxidantes naturais que podem servir como uma medicina preventiva para proteger o organismo humano contra os radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas (SOARES, 2013). Diversos pesquisadores têm investigado plantas que possam possuir substâncias com efeito antioxidante devido aos conhecimentos adquiridos sobre a formação de EROs e os antioxidantes presentes em nosso organismo para se defender contra o estresse oxidativo exacerbado (DALLAQUA & DAMASCENO, 2011).

No estudo desenvolvido por Emerenciano et al. (2013) teve como objetivo desenvolver pesquisas com a espécie vegetal *Azadirachta indica*, onde realizaram-se análises para avaliarem a propriedade antioxidante, teores de umidade, cinzas, minerais, contribuindo com novos dados sobre essa planta utilizada na medicina e comercializada em vários países. Já no trabalho realizado por Assumpção et al. (2014) foi analisado a atividade antioxidante, composição química, compostos voláteis e estudos fitoquímicos

preliminar de compostos fenólicos e o potencial citotóxico da *Hancornia speciosa*, que se resalta pela excelente capacidade comercial.

Nascimento et al. (2015) efetuou pesquisas em busca de novos flavonoides com potencial antioxidante do extrato etanólico de folhas e talos *Margaritopsis carrascoana*, que não possuía até então perfil fitoquímico contribuindo com conhecimento para melhor descrição do gênero *Margaritopsis*. E Viana et al. (2015) desenvolveu estudos em busca da atividade antioxidante e determinação da composição fitoquímica de hortaliças não convencionais, como beldroega (*Portulaca oleracea*), bertalha (*Basella rubra*), caruru (*Amaranthus viridis*) peixinho (*Stachis lanata*) e azedinha (*Rumex acetosa*).

4. Referências Bibliográficas

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa de Educação para a Prevenção e Controle da Resistência Microbiana e o uso Racional de Antimicrobianos, RMcontrole. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/conceitos.htm>. Acesso em 4 de agosto de 2016.

AMORIM, E.L.C.; et al., simple and accurate procedure for determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Func. Eco.**, v.2, p. 88-94, 2008.

ANDREATA, R.H.P. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Smilax Linnaeus* (Smilacaceae). **Pesqui. Bot.** 47: 7-244, 1997.

ASSUMPCÃO, C.F.; BACHIEGA, P.; MORZELLE, M.C.; NELSON, D.L.; NDIAYE, E.A.; RIOS, A.O.; SOUZA, E.C. Characterization, antioxidant potential and cytotoxic study of mangaba fruits. **Ciê. Ru.**, Santa Maria, v.44, n.7, p.1297-1303, 2014.

BASTOS, G.M.; NOGUEIRA, N.A.P.; SOARES, C.L.; MARTINS, M.R.; ROCHA, L.Q.; TEIXERA, A.B. In vitro determination of the antimicrobial potential of homemade preparations based on medicinal plants used to treat infectious diseases. **J. B. and App. Phar. Sci.**, 32(1):113-120, ISSN 1808-4532, 2011.

BERNAUD, F.S.R.; FUNCHAL, C. Atividade antioxidante do açaí. **Nut. Bra.**-setembro/outubro 10(5), 2011.

CASTILLO, C.F.G.; LING, M.H.T. Resistant Traits in Digital Organisms Do Not Revert Preselection Status despite Extended Deselection: Implications to Microbial Antibiotics Resistance. **BioMed Res. Inter.**, 2014.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELIASABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J. Ethno.**, vol.90, p.135–143, 2004.

CORONADO, M.H.; VEGA Y LEÓN, S.; GUTIÉRREZ, R.T.; VÁZQUEZ, M.F.; RADILLA, C.V. Antioxidants: present perspective for the human health. **Rev Chil Nutr**, vol. 42, n.2, p.206-212, 2015.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; MURTHY, M.R.V. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Prog. Neu.-Psycho. & Bio. Psy.** 28, 771-799, 2004.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do *Diabetes mellitus* em animais: artigo de atualização. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.3, p.367-373, 2011.

DUARTE, M.C.T. Atividade Antimicrobiana De Plantas Medicinai s E Aromáticas Utilizadas No Brasil. **MultiCie.**: Construindo a História dos Produtos Naturais #7, Outubro 2006.

EMERENCIANO, D.P.; CRUZ, A.M.F.; PEREIRA, J.D.S.; MOURA, M.F.V.; MACIEL, M.A.M. Determination of Antioxidant Property and Minerals Contained in the leaves of *Azadirachta indica* A. Juss. **Rev. Fit.** Rio de Janeiro, vol. 8(2): 73-160, 2013.

GARLET, T.M.B. **Levantamento das plantas medicinais utilizadas no município de Cruz Alta, RS, Brazil.** M.Sc. tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 211 pp, 2000.

GRILLO, V.T.R.S.; GONÇALVES, T.G.; CAMPOS, J.J.; PANIÁGUA, N.C.; TELES, C.B.G. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Rev. Cie. Far. Bás. Ap.**, 34(1): p.117-123, 2013.

HÖFLING, J.F.; ANIBAL, P.C.; OBANDO-PEREDA, G.A.; PEIXOTO, I.A.T.; FURLETTI, V.F.; FOGGIO, M.A.; GONÇALVES, R.B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Braz. J. Biol.**, vol. 70, no. 4, p. 1065-1068, 2010.

HÖFLING, J.F.; MARDEGAN, R.C.; ANIBAL, P.C.; FURLETTI, V.F.; FOGGIO, M.A. Evaluation of Antifungal Activity of Medicinal Plant Extracts Against Oral *Candida albicans* and Proteinases. **Mycop.**, v. 172, n. 8, p. 117–124, 2011.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Pl. Syst.: phyl. app.**, 3rd ed., 87893-407-2, 2009.

KADOSAKI, L.L.; SOUSA, S.F.; BORGES, J.C.M. Analysis of use and bacterial resistance to antimicrobial in level hospital. **Bra. J. Pha.**, 93(2): 128-135, 2012.

LIMA NETO, G.A.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W.T.; FERREIRA, W.R.; DIAS DA SILVA, Y.S.A.; PAZIN, G.V.; VIOLANTE, I.M.P. Quantification of secondary metabolites and antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants from the Cerrado of the Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

MAGALHÃES, R.G. Plantas medicinais na região do Alto Uruguai, RS: conhecimentos de João Martins Fiúza, “Sarampião”. M.Sc. thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 172p, 1997.

MARTINS, A.R.; PÜTZ, N.; SOARES, A.N.; BOMBO, A.B.; APPEZZATO DA GLÓRIA, B. New approaches to underground systems in Brazilian *Smilax* species (Smilacaceae). **J. T. Bot. Soc.**, 137(2–3): p.220-235, 2010.

MARTINS, A.R.; BOMBO, A.B.; SOARES, A.N.; APPEZZATO DA GLÓRIA, B. Aerial stem and leaf morphoanatomy of some species of *Smilax*. **Bra. J. Pha.**, 23(4): 576-584, 2013.

MARTINS, A.R.; SOARES, A.N.; BOMBO, A.B.; FIDELIS, A.; NOVEMBRE, A.D.L.C.; APPEZZATO DA GLÓRIA, B. Germination and seedling morphology of four South American *Smilax* (Smilacaceae). **Int. J. Trop. Biol.** ISSN-0034-7744, vol.60 (1): 495-504, 2012.

MEDEIROS, M.F.T.; VALLE, L.S.; ANDREATA, R.H.P. Histórico e o uso da “salsa parrilha” (*Smilax* spp.) pelos boticários no Mosteiro de São Bento. **Rev. Bra. Bioc.**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 27-29, jul. 2007.

MELO, V.V.; DUARTE, I.P.; SOARES, A.Q. **G. Antim.** 1.ed. - Goiânia, 2012. 62 p.

MELO, W.C.M.A.; PERUSSI, J.R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Rev. Cie. Far. Bás. Ap.**, 2012. 33(3): 331-340 p.

NASCIMENTO, R.R.G.; MONTEIRO, J.A.; PIMENTA, A.T.A.; TREVISAN, M.T.S.; BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, E.B.; SILVEIRA, E.R.; LIMA, M.A.S. New flavonoids from *Margaritopsis carrascoana* with antioxidant activity. **Quim. Nova**, vol. 38, No. 1, 60-65, 2015.

OLIVEIRA, L.S.; MUZITANO, M.F.; COUTINHO, M.A.S.; MELO, G.O.; COSTA, S.S. Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Int. Sci. Pla.**, ano.4, n.17, ISSN 1679-9844, p.54-74, 2011.

OZSOY, N.; CAN, A.; YANARDAG, R.; AKEV, N. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. **Food Chemistry**, 110(3), 571e583, 2008.

PIENIZ, S.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V.R.; ESTEFANEL, V.; ANDREAZZA, R. In vitro assessment of the antioxidant potential of fruits and vegetables. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 33, n. 2, p. 552-559, 2009.

PIZZIOLO, V.R.; BRASILEIRO, B.G.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.1, p.98-109, 2011.

RIZZO, I.; VEDOYA, G.; MAURUTTO, S.; HAIDUKOWSKI, M.; VARSASKY, E. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs. **Micro. Res.**, vol.159, p.113–120, 2004.

ROCHA, E.A.L.S.S.; CARVALHO, A.V.O.R.; ANDRADE, S.R.A.; MEDEIROS, A.C.D.; TROVÃO, D.M.B.M.; COSTA, E.M.M.B. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **J. Bas. App. Phar. Sci.**, 34(3):351-355 ISSN 1808-4532, 2013.

ROCK, C.L.; MICHAEL, C.W.; REYNOLDS, R.K.; RUFFIN, M.T. Prevention of cervix cancer Crit. **Rev Oncol Hematol.** 33(3):169-85, 2000.

ROGATTO, J.M.; FERREIRA, M.C.C.; ONO, R.M.; CARVALHO, L.C.; SOARES, D.F.; VIEIRA, D.C.M.; CHAVASCO, J.K. Caracterização do potencial antimicrobiano de *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer. **Rev. Uni. V. Rio Verde**, Três Corações, v. 12, n. 1, p. 886-894, 2014.

RUGNA, A.Z.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Estudio Variacional de Flavonoles en Ejemplares Masculinos y Femeninos de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Acta Farm. Bom.**, vol. 21 (2): p.119-21, 2002.

RUGNA, A.Z.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Fitoquímica comparativa de flavonoides en los diferentes órganos de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Dom.**, vol.21: p.17–23, 2005.

RUGNA, A.Z.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Phenological variations of polyphenols in *Smilax campestris* (Smilacaceae). **Turk J Bot**, v.37: p.350-354 © TÜBİTAK doi:10.3906/bot-1112-15, 2013.

RUGNA, A.Z.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Progress in studies on flavonols from *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Acta Hort.**, vol.501: p.191–194, 1999.

RUGNA, A.Z.; RICCO, R.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Efectos de la radiación solar sobre la producción de polifenoles en ejemplares femeninos de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae). **Latin Ame. J. Pha.**, vol.26: p.420–423, 2007.

RUGNA, A.Z.; RICCO, R.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Variaciones cualicuantitativas en la producción de polifenoles en hojas de *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae) sanas y atacadas por la oruga de la mariposa *Agraulis vanillae* L. (Heliconidae). **Dom.**, vol.27: p.27–33, 2011.

RUGNA, A.Z.; RICCO, R.; GURNI, A.A.; WAGNER, M.L. Variaciones en el contenido de los polifenoles foliares en *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae) según su grado de desarrollo. **Latin Ame. J. Pha.**, vol.27: p.247–9, 2008.

SAMPAIO, L.C.; ALMEIDA, C. F. Vitaminas Antioxidantes na Prevenção do Câncer do Colo Uterino. **Rev. Bra. Canc.**; 55(3): 289-296, 2009.

SANTOS, R.F.E.P.; SILVA, I.S.M.; VERÍSSIMO, R.C.S.S.; LÚCIO, I.M.L.; CAMPESATTO, E.A.; CONSERVA, L.M.; BASTOS, M.L.A. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.3, p.367-373, 2015.

SILVA, S.M.F.Q. *et al.* Atividade in vitro de extratos brutos de duas espécies vegetais do cerrado sobre leveduras do gênero *Candida*. **Cie. S. Col.**, v. 17, n. 6, p. 1649-1656, 2012.

SOARES, J.J. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Fundação Universidade Federal do Pampa, Uruguiana, 2013.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, 05-6639, CDD-581.012. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Micro.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

VANDERCOLME, E. História botânica e terapêutica das salsaparrilhas. **Rev. Flora Med.** 7: 316-524, 1947

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M.S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Cie. R.**, v.34, n. 1, p. 159-163, 2004.

VIANA, M.M.S.; CARLOS, L.A.; SILVA, E.C.; PEREIRA, S.M.F.; OLIVEIRA, D.B.; ASSIS, M.L.V. Composição fitoquímica e potencial antioxidante em hortaliças não convencionais. **Hort. Bra.**, vol. 33: p.504-509, 2015.

WOOLHOUSE, M.E.J.; WARD, M.J. Sources of Antimicrobial Resistance. **Sci.** Vol. 341 no. 6153 pp. 1460-1461. DOI: 10.1126/science.1243444, 2013.

5. Artigo Científico

Propriedade antimicrobiana e atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach.

XXX¹, XXX, XXX

¹ Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal da Grande, Dourados, Brasil.

RESUMO

Dentre as plantas medicinais, a *Smilax campestris* Grisebach utilizada comumente pela população no tratamento de gripes, febres e resfriados e em doenças causadas por microrganismos por ser uma alternativa econômica e acessível. Tendo em vista a crescente busca por novos agentes antimicrobianos, o aumento da resistência dos microrganismos patogênicos frente ao uso intensivo de produtos sintéticos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para 18 microrganismos de interesse clínico por meio da técnica de microdiluição em caldo e teste antioxidante foi realizado com o radical livre cromóforo DPPH. Também foi realizada a quantificação de flavonoides, fenóis e taninos. O extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach apresentou atividade para *Staphylococcus epidermidis* (CIM= 1000 µg/mL) e também demonstrou uma boa atividade antioxidante com uma IC₅₀ de 13,1±0,1 µg/mL⁻¹. Obteve a concentração de flavonoides de 70,3±1,6 mg EQ/g, fenóis 123,9±1,0 mg EAG/g e taninos condensados 11,8±0,1 mg ECA/g. Os resultados demonstraram que a utilização do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach pode ser uma alternativa propícia para o controle desse microrganismo patogênico e como uma ótima fonte de antioxidante natural.

Palavras Chaves: plantas medicinais/ japecanga/ antimicrobiano/ antioxidante/ fitoquímica.

ABSTRACT

Among the medicinal plants, the *Smilax campestris* Grisebach used commonly by the population in the treatment of colds, fevers and colds and diseases caused by microorganisms to be an economical and affordable alternative. In view of the growing search for new antimicrobial agents, increasing resistance of pathogenic microorganisms against the intensive use of synthetic products, this study aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of the ethanol extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for 18 microorganisms of clinical interest through the broth microdilution technique and antioxidant test was carried out with free radical DPPH chromophore. Also quantitation of flavonoids, phenols and tannins been performed. The ethanolic extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach showed activity for *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 1000 ug/mL), and has shown good antioxidant activity with an IC₅₀ of 13.1±0.1 ug/ml⁻¹. Obtained the concentration of flavonoids of 70.3±1.6 mg EQ/g, phenols 123.9±1.0 mg GAE/g and condensed tannins 11.8±0.1 mg ACE/g. The results showed that the use of the ethanol extract of the leaves of *Smilax campestris* Grisebach might be a suitable alternative for the control of this pathogenic organism and as a great source of natural antioxidant.

Key words: medicinal plants/ japecanga/ antimicrobial/ antioxidant/ phytochemical.

1. Introdução

Muitos microrganismos possuem capacidade genética de conseguir ganhar resistência a antibióticos comumente usados em tratamentos terapêuticos convencionais [1], impulsionando o desenvolvimento de novos estudos na área da bioprospecção de antimicrobianos naturais.

A utilização de plantas medicinais como fitoterápicos tem ganhando destaque na busca de antimicrobianos naturais, pois estes possuem custos reduzidos podendo ser associados a tratamentos primários na saúde pública [2, 3, 4, 5]. Outro ponto que lhes agrega interesse é sua colaboração como fonte de matéria prima para fármacos, devido a presença de diversos constituintes químicos oriundos de seu metabolismo secundário, como sendo os taninos que são encontrados em maior quantidade e os alcaloides em concentrações menores [6, 7].

O gênero *Smilax* ssp. possui cerca de 300 espécies, normalmente encontradas em regiões com de clima subtropical e tropical ao longo do mundo. São usadas como alimento e para o tratamento de enfermidades como terapia alternativa primária, por meio de infusões de seus órgãos vegetativos [8].

As infusões feitas a partir de *Smilax campestris* Grisebach são comumente empregadas na medicina popular, as de suas partes aéreas são produzidas bebidas tônicas, refrescantes e digestivas, enquanto que suas partes subterrâneas são preparadas para tratamento de sífilis, reumatismo, diurético, sudorífico, antirreumático, em certas doenças da pele, tratamento da psoríase e antioxidante [9, 10, 11]. No entanto, ainda não temos relatos sobre a sua atividade antimicrobiana. Desta forma o nosso objetivo foi avaliar a atividade antimicrobiana e atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach.

2. Metodologia

2.1. Material Vegetal

As folhas de *Smilax campestris* Grisebach foram coletadas na Fazenda Santa Madalena (S 22°14'33.8'' W 054°48'56.1''), durante os meses de agosto a setembro de 2014. A exsiccata foi identificada no número de registro 5243, e depositada no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados.

2.2. Obtenção do Extrato Etanólico

As folhas de *Smilax campestris* Grisebach foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de 30°C por sete dias. Após a secagem o material foi pulverizado em moinho de facas, pesado e armazenado em local seco sem umidade. O material botânico seco e pulverizado foi misturado em 1000 mL de álcool etílico absoluto a 99,5% (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e deixado à temperatura de 25°C por 72h, com agitações ocasionais. A solução foi filtrada e após foi completamente evaporada à 35°C, em rota-evaporador (Rotaevapor R – 215) e liofilizada em liofilizador (E-C MicroModulyo) acoplado a bomba de vácuo (valuPump VLP80 Savant). Após liofilizada foi devidamente identificada e armazenada (Laboratório de Microbiologia Aplicada).

2.3. Atividade Antimicrobiana

2.3.1. Microrganismos

Foram testados microrganismos provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Candida*

albicans (ATCC 90028), *Candida dubliniensis* (ATCC MYA 646), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida krusei* (ATCC 6558), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Proteus mirabilis* (ATCC 35659), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).

2.3.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima do extrato foi determinada por meio de técnica de microdiluição em caldo, conforme as diretrizes do *Clinical Laboratory Standards Institute* [12, 13].

As bactérias foram cultivadas em ágar Triptona de Soja (Himedia) à 37°C por 24 h e a concentração do inóculo foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, já as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose (Himedia) e incubados à 35°C por 48 h e a concentração do inóculo foi ajustado para $2,5 \times 10^8$ UFC/mL. O extrato etanólico foi dissolvido em Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) e realizado diluições em série (1: 2) com o caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para leveduras e caldo Müller Hinton (Himedia) para bactérias obtendo as concentrações de 1,9 µg/mL à 1000µg/mL. As concentrações dos extratos e o inóculo dos microrganismos foram distribuídas em placas de microdiluição com 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) e incubadas a 35°C por 48 horas para leveduras e 37°C por 24 horas para bactérias. Para o controle do ensaio das bactérias foi utilizado o antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich) e para leveduras o antifúngico fluconazol (Sigma-Aldrich).

A CIM foi considerada como a menor concentração do extrato no qual os microrganismos não apresentaram crescimento visível após incubação [14]. Assim, foram considerados os seguintes parâmetros para avaliar o potencial antimicrobiano do extrato: concentração inferior a $100 \mu\text{g/mL}^{-1}$, a atividade antimicrobiana boa; 100 a $500 \mu\text{g/mL}^{-1}$ a atividade antimicrobiana moderada; 500 a $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ a atividade antimicrobiana fraca e superior a $1000 \mu\text{g/mL}^{-1}$ do extrato é considerada inativa [15].

O teste foi realizado em triplicata e em três momentos diferentes.

2.3.3 Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada de acordo com Bagiu et al., 2012 [16]. Alíquotas da placa de microdiluição do CIM foram transferidas para uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco), para avaliação da ação fungicida e para avaliação bactericida foram transferidas alíquotas para uma placa de Petri contendo ágar Müller Hinton (Himedia). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas para avaliação fungicida e a 37°C por 24 horas para avaliação bactericida. A CFM e a CBM foram definidas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de colônias.

2.4. Ensaio Antioxidante com o Radical Livre 1,1 – difenil–2 picril–hidrazila (DPPH)

O teste antioxidante com o radical livre DPPH (1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila) foi utilizado para determinar a atividade antioxidante empregando uma solução de $40 \mu\text{g/mL}$ de DPPH preparado em metanol. A amostra foi analisada empregando diferentes concentrações do extrato, sendo 10 a $200 \mu\text{g/mL}^{-1}$ (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, $200 \mu\text{g/mL}^{-1}$) [17]. Para cada 1 mL de solução DPPH foram adicionados 0,5 mL da

solução preparada. A mistura foi agitada imediatamente após a adição de DPPH e deixada em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, foi realizada leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm. Através das absorvâncias foi calculado o percentual de inibição (PI) conforme Kumaran e Karunakaran, 2006 [18], resultando na concentração de IC₅₀, concentração capaz de reduzir em 50% da concentração inicial de DPPH.

Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.5. Análise Quantitativa de Compostos Fitoquímicos

A quantificação de flavonoides foi realizada pelo método descrito por Lin e Tang, 2007 [19]. 0,1g de extrato foi dissolvida em 100 mL de água deionizada e uma alíquota (500 µL) desta solução foi acrescentada com 1,5 mL de álcool a 95%, 0,1 mL de hexa-hidrato de cloreto de alumínio 10% (AlCl₃), 0,1 mL de acetato de potássio 1 M (CH₃COOK), e 2,8 mL de água deionizada, incubados à temperatura ambiente por 40 minutos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 415 nm. Os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de quercetina (mg QE) por grama de extrato etanólico.

Fenóis foram ensaiados com as mesmas amostras utilizadas na quantificação dos flavonoides, conforme Djeridane et al., 2006 [20]. A cada 100 µL de amostra foi adicionado 500 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada, incubadas à temperatura ambiente durante 1 min. Após 1 min, foi adicionado a esta solução, 1,5 mL de carbonato de sódio a 20% (Na₂CO₃) e incubadas por 2 horas no escuro, à temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi realizada com comprimento de onda de 760 nm. Os resultados são expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por grama de extrato etanólico. Os taninos foram quantificados utilizando a reação de

vanilina, de acordo com Broadhurst e Jones, 1978 e adaptada por Agostini-Costa et al., 1999 [21, 22]. 5 mL de reagente recém-preparado de vanilina (vanilina-HCl-metanol 4:10:86) foi adicionado em cada tubo de ensaio e foi acrescentado 1 mL de extrato em cada tubo, agitando em vórtex por 30 segundos. A reação foi mantida em repouso por 15 minutos e fez-se a leitura da absorbância a 490 nm. Os resultados foram expressos em miligramas de catequina equivalente (mg CAE) por grama de extrato.

Todos os testes aplicados foram realizados em triplicata.

3. Resultados e Discussão

O extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach apresentou atividade antimicrobiana para a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis* com uma concentração inibitória mínima de 1000 µg/mL. Para os demais microrganismos testados, o extrato etanólico não apresentou atividade dentro das concentrações testadas (Tabela 2.). A espécie mais encontrada do gênero *Staphylococcus* em infecções hospitalares é o *Staphylococcus epidermidis*, presente na pele humana, normalmente inofensivo, porém é um patógeno oportunista. *Staphylococcus epidermidis* causa infecções severas em neonatos, indivíduos com imunidade baixa internados por longos períodos, além de ser causador de cerca de 50 a 70% das infecções relacionadas com cateteres [23, 24].

Coelho de Souza e colaboradores (2004) [25] avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico das partes aéreas, de *Smilax campestris* Grisebach pela técnica de difusão em disco e verificaram que os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* apresentaram perfil de resistência ao extrato.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM); Concentração Bactericida Mínima (CBM) em µg/mL do extrato de *Smilax campestris* Grisebach.

Microrganismos	<i>Smilax campestris</i> Griseb.			FLU**	AMP*	CLO
	CIM	CFM	CBM	CIM	CIM	CIM
Leveduras						
<i>Candida albicans</i>	-	-	o	2	o	o
<i>Candida dubliniensis</i>	-	-	o	0,25	o	o
<i>Candida glabrata</i>	-	-	o	8	o	o
<i>Candida krusei</i>	-	-	o	32	o	o
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	o	2	o	o
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	o	1	o	o
Gram positiva						
<i>Bacillus cereus</i>	-	o	-	o	32	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	o	-	o	32	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1000	o	-	o	64	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	o	-	o	0,25	0,25
Gram negativa						
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	o	-	o	-	2
<i>Escherichia coli</i>	-	o	-	o	32	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	o	-	o	0,25	0,25
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	o	-	o	64	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	o	-	o	32	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	o	-	o	-	64
<i>Proteus mirabilis</i>	-	o	-	o	32	8
<i>Salmonella Enteritidis</i>	-	o	-	o	32	2
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	o	-	o	32	2

CIM: Concentração Inibitória Mínima; CBM: Concentração Bactericida Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima; (-): Ausência de atividade antimicrobiana; (o): Não testado; AMP: Ampicilina; FLU: Fluconazol; CLO: Cloranfenicol.

Esses dados sugerem que variação na atividade antimicrobiana com extratos da mesma espécie pode estar relacionada a diferentes fatores como: tipo de solvente utilizado no processo de extração, condições de sazonalidade e características da matéria-prima [26].

Estudos realizados com outras espécies vegetais contra *Staphylococcus epidermidis* constataram valores de concentração inibitória mínima inferiores a evidenciada neste trabalho, como: 250 µg/mL [27] e 100 µg/mL⁻¹ [28].

A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio com radical cromóforo DPPH, que expressa o resultado obtido por meio da IC₅₀ que representa a quantidade necessária de amostra para redução de 50% da concentração inicial de DPPH, onde o menor valor simboliza a maior capacidade antioxidante do extrato [29]. O extrato etanólico de *Smilax campestris* Grisebach apresentou uma boa atividade IC₅₀ de 13,1±0,1 µg/mL⁻¹ (Tabela 3.), quando comparado com a vitamina C (IC₅₀ de 6,13 µg/mL⁻¹) e o flavonoide rutina (IC₅₀ de 6,71 µg/mL⁻¹), que são considerados potentes antioxidantes.

Ao e colaboradores (2011) [8] avaliaram a atividade antioxidante do extrato metanólico de rizomas e raízes de diferentes frações *Smilax sebeana* Miq., e obtiveram os seguintes resultados: fração hexano IC₅₀ 7,5 mg/mL; acetato de etila IC₅₀ 71,7 mg/mL; de, n-butanol IC₅₀ 50,8 mg/mL e extrato aquoso IC₅₀ 4,8 mg/mL.

Seo e colaboradores (2012) [30] também avaliaram o potencial antioxidante de diferentes frações do extratos da *Smilax china*, e obtiveram os seguintes dados: metanol IC₅₀ 97.40 ± 7.09 µg/mL; etanol IC₅₀ 49,93 ± 1,88 µg/mL; acetona IC₅₀ 85.74 ± 0.39 µg/mL; água IC₅₀ 1,006.63 ± 5.28 µg/mL. Já no trabalho desenvolvido com extrato de *Smilax macrophylla* em diferentes solventes, Zubair e colaboradores (2013) [31], obteve os seguintes resultados n-hexano IC₅₀ 72,3 ± 0,15 µg/mL; clorofórmio IC₅₀ 55,2 ± 0,09 µg/mL; acetato de etila IC₅₀ 42,4 ± 0,10 µg/mL; n-butanol IC₅₀ 48,3 ± 0,07 µg/mL;

metanol absoluto IC_{50} $33,4 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$; metanol a 95% IC_{50} $38,1 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$ e metanol a 90% IC_{50} $45,8 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$.

Com base nos resultados das três espécies de *Smilax* apresentados acima, podemos verificar que o IC_{50} do extrato etanólico de *Smilax campestris* obtido pelo teste de DPPH neste estudo apresentou uma boa atividade antioxidante quando comparado com as demais espécies do mesmo gênero.

Tabela 3. Quantificação de flavonoides, fenóis, taninos condensados e atividade antioxidante do extrato etanólico de *Smilax campestris* Grisebach.

Espécie Vegetal	Análise Fitoquímica			Atividade Antioxidante
	Flavonoides (mg EQ/g)	Fenóis (mg EAG/g)	Taninos Condensados (mg ECA/g)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}^{-1}$)
<i>Smilax campestris</i> Griseb.	$70,3 \pm 1,6$	$123,9 \pm 1,0$	$11,8 \pm 0,1$	$13,1 \pm 0,1$

EQ: Equivalente de quercetina; EAG: Equivalente de ácido gálico; ECA: Equivalente de catequina; IC_{50} : Concentração inibitória de 50% do DPPH.

Em relação a triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach, obteve-se a concentração de flavonoides de $70,3 \pm 1,6$ mg EQ/g, fenóis $123,9 \pm 1,0$ mg EAG/g e taninos condensados $11,8 \pm 0,1$ mg ECA/g (Tabela 3).

Rugna e colaboradores (2013) [11] avaliaram a variação fenotípica de polifenóis de *Smilax campestris* Grisebach coletadas em Puerto Gaboto e San Jerónimo na Argentina e obtiveram resultados diferentes (flavonoides $308.5 \pm 9.98 \mu\text{g EQ/g}$ e fenóis 16.76 ± 0.84 mg EAT/g) dos encontrados nesse estudo. Estes dados evidenciam que fatores como clima, solo e região podem interferir na produção desses metabólitos.

No trabalho desenvolvido por Seo e colaboradores (2012) [30] quantificaram fenóis totais do extrato da espécie vegetal *Smilax china* em diferentes solventes, obtiveram resultados de 105.81 ± 0.4 mg EAG/g em metanol, 105.74 ± 0.04 mg EAG/g em etanol, 96.23 ± 0.26 mg EAG/g em acetona e 16.64 ± 0.30 mg EAG/g em água.

Zubair e colaboradores (2013) [31], obtiveram os seguintes resultados na quantificação de flavonoides para extrato *Smilax macrophylla* extraído em n-hexano 1.2 ± 0.03 mg ECA/g, clorofórmio 4.9 ± 0.04 mg ECA/g, acetato de etila 4.0 ± 0.03 mg ECA/g, n-butanol 4.1 ± 0.04 mg ECA/g, metanol absoluto 5.4 ± 0.10 mg ECA/g, metanol a 95% 2.5 ± 0.05 mg ECA/g, metanol a 90% 3.4 ± 0.04 mg ECA/g; e para quantificação de fenóis obteve em n-hexano 2.2 ± 0.04 mg EAG/g, clorofórmio 4.1 ± 0.06 mg EAG/g, acetato de etila 5.2 ± 0.05 mg EAG/g, n-butanol 3.4 ± 0.05 mg EAG/g, metanol absoluto 6.2 ± 0.10 mg EAG/g, metanol a 95% 5.5 ± 0.05 mg EAG/g, metanol a 90% 2.4 ± 0.06 mg EAG/g.

Assim, observa-se que nos trabalhos realizados com plantas do mesmo gênero *Smilax* a concentração de flavonoides e fenóis é inferior à obtida no extrato em estudo, o que justifica seu maior potencial antioxidante em relação as demais espécies.

4. Conclusão

O estudo mostrou que o extrato etanólico das folhas de *Smilax campestris* Grisebach apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* e atividade antioxidante quando comparado com os controles testados.

Pode-se verificar que ação antimicrobiana e antioxidante está relacionada com a concentração dos compostos fenólicos e flavonoides quantificados pela triagem fitoquímica. Também pode-se observar que características, como, região, clima, solo podem influenciar nas atividades biológicas das plantas.

Por se tratar de uma espécie vegetal indicada pela medicina popular como terapia alternativa para o tratamento de sífilis, gota, reumatismo, doenças de pele, asma, dores de dente, feridas, diuréticos, sudorífico, dor ocular, anti-inflamatórios, doenças vaginais

causadas por fungos e como tônico refrescante para problemas digestivos, torna-se necessário a continuação de estudos para examinar novas propriedades biológicas da *Smilax campestris* Grisebach. Testes relacionados à ação citotóxica, genotóxica e mutagênica também devem ser realizados afim de assegurar a utilização segura do extrato como tratamento alternativo de enfermidades bem como ser utilizado como fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de novos fármacos.

5. Referências Bibliográficas

- [1] ROGATTO, J. M., FERREIRA, M. C. C., ONO, R. M., CARVALHO, L. C., et al., 2014. Caracterização do potencial antimicrobiano de *Ocotea odorifera* (Vellozo) Rohwer. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 12, n. 1, p. 886-894.
- [2] NASCIMENTO, G. G. F., LOCATELLI, J., FREITAS, P. C. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256.
- [3] AMOROSO, M. C. M. 2002. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasílica**, v.16, n. 2, p.189-203.
- [4] CANSIAN, R. L., MOSSI, A. J., PAROUL, N., TONIAZZO, G., et al., 2010. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (VELL.) ROWHER). **Perspectiva, Erechim**, v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010.

[5] SANTOS, R. L., GUIMARÃES, G. P., NOBRE, M. S. C., PORTELA, A. S. 2011. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.486-91.

[6] CARVALHO, A. A. T., SAMPAIO, M. C. C., SAMPAIO, F. C., MELO, A. F. M., et al., 2002. Atividade Antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 255-258, 2002.

[7] LIMA NETO, G. A., KAFFASHI, S., LUIZ, W. T., FERREIRA, W. R., et al., 2015. Quantification of secondary metabolites and antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants from the Cerrado of the Mato Grosso. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

[8] AO, C., HIGA, T., KHANH, T. D., UPADHYAY, A., et al., 2011. Antioxidant phenolic compounds from *Smilax sebeana* Miq. **Food Science and Technology**, vol.44, p.1681-1686.

[9] RUGNA, A. Z., RICCO, R., GURNI, A. A., WAGNER, M. L., 2008. Variaciones en el contenido de los polifenoles foliares en *Smilax campestris* Griseb. (Smilacaceae) según su grado de desarrollo. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol.27: p.247-9.

[10] RUGNA, A. Z., RICCO, R., GURNI, A. A., WAGNER, M. L., 2011. Variaciones cualicuantitativas en la producción de polifenoles en hojas de *Smilax campestris* Griseb.

(Smilacaceae) sanas y atacadas por la oruga de la mariposa *Agraulis vanillae* L. (Heliconidae). **Dominguezia**, vol.27: p.27–33.

[11] RUGNA, A. Z., GURNI, A. A., WAGNER, M. L., 2013. Phenological variations of polyphenols in *Smilax campestris* (Smilacaceae). **Turk Journal of Botanic**, v.37: p.350-354 © TÜBİTAK doi:10.3906/bot-1112-15.

[12] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), M27-A3, 2008. “Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard”, 3. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**.

[13] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard M27-S4. 4th ed.; Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**.

[14] PANGHAL, M., KAUSHAL, V., YADAV, J., 2011. In vitro antimicrobial activity of ten medical plants against clinical isolates of oral cancer cases. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, p. 21-31.

[15] ARAÚJO, M. G. F., HILÁRIO, F., NOGUEIRA, L. G., VILEGAS, W., et al., 2011. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leiothrix spiralis* Ruhland and their antimicrobial activity. **Molecules**, vol. 16, p.10479-10490.

[16] BAGIU, R. V., VLAICU, B., BUTNARIU, M., 2012. Chemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 1426-1436.

[17] CARDOSO, C. A. L., SALVADOR, M. J., CARVALHO, E., COELHO, R. G., 2013. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz** (Impresso), v. 72, p. 324-330.

[18] KUMARAN, A., KARUNAKARAN, R. J., 2006. Nitric Oxide Radical Scavenging Active Components From *Phyllanthus emblica* L. **Plant Foods for Human Nutrition**, 61: 1. doi:10.1007/s11130-006-0001-0.

[19] LIN, J. Y., TANG, C. Y., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chemistry** 101: 140-147. doi:10.1016/j.foodchem.2006.01.014.

[20] DJERIDANE, A., YOUSFI, M., NADJEMI, B., BOUTTASSOUNA, D., et al., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry** 97: 654-660. doi:10.1016/j.foodchem.2005.04.028.

- [21] BROADHURST, R. B., JONES, W. T., 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 29(9): 788-794. DOI: 10.1002/jsfa.2740290908.
- [22] AGOSTINI-COSTA, T. D. S., GARRITI, D. D. S., LIMA, L., FREIRE, S., et al., 1999. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, 17(2): 167-176. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v17i2.13789>.
- [23] PINHEIRO, L., BRITO, C. I., PEREIRA, V. C., DE OLIVEIRA, A., et al., 2014. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 871-878.
- [24] SCHAEFFER, C. R., WOODS, K. M., LONGO, G. M., KIEDROWSKI, M. R., et al., 2015. Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model. **Infect Immun**, vol.83, p.214 –226.
- [25] COELHO DE SOUZA, G., HAAS, A. P. S., VON POSER, G. L., SCHAPOVAL, E. E. S., et al., 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.90, p.135–143.
- [26] OSTROSKY, E. A., MIZUMOTO, M. K., LIMA, M. E. L., KANEKO, T. M., et al., 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da

concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.301-07.

[27] ALEIXO, A. A., HERRERA, K. M. S., RIBEIRO, R. I. M. A., LIMA, L. A. R. S., et al., 2013. Antibacterial activity of *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja) against bacteria of medical interest. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.5, p. 731-734.

[28] DUARTE, A. F. S., HIROTA, B. C. K., OLIVEIRA, V. B., CAMPOS, R., et al., 2014. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl. (Rubiaceae). **Revista Ciência Farmacêutica Básica Aplicada**, vol.35(4): p.607-614.

[29] TREVISAN, R. R., 2010. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (jacq.) Sargent Ulmaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

[30] SEO, H. K., LEE, J. H., KIM, H. S., LEE, C. K., et al., 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of *Smilax china* L. leaf extracts. **Food Science Biotechnology**. 21(6): 1723-1727.

[31] ZUBAIR, M., RIZWAN, K., RASHID, U., SAEED, R., et al., 2013. GC/MS profiling, in vitro antioxidant, antimicrobial and haemolytic activities of *Smilax macrophylla* leaves. **Arabian Journal of Chemistry**.



A pedido da autora o Anexo foi retirado do pdf.