

Triagem antimicrobiana de extratos metanólicos obtidos de plantas frutíferas selecionadas da flora catarinense, Brasil

Antimicrobial screening of methanolic extracts obtained from fruit plants selected from the flora of Santa Catarina, Brazil

Recebido em: 04/08/2017

Aceito em: 16/08/2017

Luciane Angela Nottar NESELLO¹; Adriana CAMPOS¹; Gabriel Reis SCHINKEL¹; Alexandre BELLA CRUZ²; Valdir CECHINEL FILHO²

¹Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Rua Uruguai, 458, CEP 88302-202. Itajaí, SC, Brasil. ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR), Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI. Rua Uruguai, 458, CEP 88302-202. Itajaí, SC, Brasil.

E-mail: lucianenesello@yahoo.com.br

ABSTRACT

Due to the increasing difficulty in combating current antimicrobial resistant microorganisms, the antimicrobial potential of some plants has aroused researchers interest for being a natural alternative and for the consecrated possibilities. The present study aimed to evaluate the antimicrobial potential of wild fruit plants extracts by determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The plants were selected for the indication of widespread use, and domestication in the region of “Vale do Itajaí, ” and their methanolic extracts were submitted to phytochemical analysis by thin layer chromatography using specific developers. The extract of the mature *Marlierea tomentosa* pulp presented excellent antimicrobial activity against *S. aureus* bacteria, and the extract of *Plinia edulis* seeds showed good activity. The extracts of *Eugenia brasiliensis* seeds, *M. tomentosa* branches and *Myrcianthes pungens* seeds were considered moderately active. It is possible to conclude that there is an antimicrobial potential in some studied extracts, but complementary tests are necessary with different bacterial, to ensure and complement the presented results, and also isolate and identify the respective active principles.

Keywords: antimicrobial action; medicinal plants; chemical compounds.

RESUMO

Devido à crescente dificuldade de combater microrganismos resistentes a antimicrobianos, o potencial antimicrobiano de algumas plantas tem despertado o interesse de pesquisadores por serem uma alternativa natural, e pelas potencialidades consagradas. O presente estudo teve por objetivo realizar triagem do potencial antimicrobiano, contra microrganismos patogênicos aos seres humanos, de extratos de plantas frutíferas silvestres por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As plantas foram selecionadas pela indicação de uso popular e domesticação na região do Vale do Itajaí e seus extratos metanólicos foram submetidos à análise fitoquímica por cromatografia em camada delgada usando reveladores específicos. O extrato da polpa madura de *Marlierea tomentosa* apresentou excelente atividade antimicrobiana contra a bactéria *Staphylococcus aureus* e o extrato das sementes de *Plinia edulis* mostrou boa atividade. Os extratos das sementes de *Eugenia brasiliensis*, galhos de *M. tomentosa* e sementes de *Myrcianthes pungens* foram considerados moderadamente ativos. Pode ser concluído que há potencial antimicrobiano em alguns extratos estudados, porém ensaios complementares se fazem necessários com diferentes linhagens bacterianas, com o intuito de assegurar e complementar os resultados apresentados, além de isolar e identificar os respectivos princípios ativos.

Palavras-chave: ação antimicrobiana; plantas medicinais; compostos químicos.

INTRODUÇÃO

A resistência desenvolvida pelos microrganismos, frente aos antimicrobianos usados na prática terapêutica tem se tornado um problema de saúde mundial, e o uso indiscriminado de antibióticos pela população agrava esse quadro (1). A frequência de contato com um mesmo antibiótico permite que o microrganismo desenvolva um mecanismo de adaptação por aquisição e transferências de genes de resistência, diminuindo a eficácia do medicamento (2).

A resistência a agentes antimicrobianos é preocupante e requer não somente o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, mas também novas abordagens para o tratamento de doenças infecciosas (3). Na era contemporânea, o fenômeno da multirresistência dos microrganismos e da iminente ineficácia dos medicamentos utilizados na terapêutica convencional, tem remetido pesquisadores a buscar novas alternativas de terapias mais eficientes e com menos efeitos colaterais (4).

O avanço da ciência farmacêutica levou ao surgimento de diversos antimicrobianos, com espectro de ação cada vez mais amplo (4). Pesquisas com plantas têm comprovado seu potencial antimicrobiano no tratamento de várias doenças infecciosas, estas, quando tratadas com plantas medicinais, apresentam diminuição de efeitos colaterais, quando comparados com antimicrobianos sintéticos (5,6).

A atividade antimicrobiana apresentada por ativos vegetais pode ser, geralmente, em função da presença de taninos (7), flavonoides (8), terpenos (9), saponinas (10) e/ou alcaloides (11). Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias, fazem-se necessárias pesquisas de triagem sobre a atividade antimicrobiana, mecanismo de ação e potenciais de usos, a

fim de identificar compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos. Diante do exposto, o presente artigo teve como objetivo realizar triagem do potencial antimicrobiano de extratos de plantas frutíferas silvestres através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

MÉTODOS

Obtenção das plantas frutíferas. As plantas frutíferas foram selecionadas para o trabalho devido ao uso popular na região do Vale do Itajaí em Santa Catarina, e por algumas já serem domesticadas e cultivadas para o consumo *in natura*. As espécies foram identificadas/autenticadas pelo Prof. Oscar B. Iza (Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI), e as exsicatas encontram-se depositadas no Herbário Barbosa Rodrigues no município de Itajaí, SC.

No presente trabalho foi realizado um estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana de partes constituintes de 13 plantas frutíferas selecionadas: *Abuta selloana* (Benth.) Eichler (polpa, cascas, sementes, galhos e folhas), *Campomanesia reitziana* D. Legrand (fruto inteiro), *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. (fruto inteiro, polpa e cascas), *Eugenia brasiliensis* Lam. (polpa, sementes e cascas), *Eugenia mattsosii* D. Legrand (fruto inteiro), *Inga vera* Willd (polpa, cascas e sementes), *Marlierea tomentosa* Camb. (polpa madura e verde, cascas maduras e verdes, sementes maduras e verdes, galhos e folhas), *Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand (polpa, cascas, sementes, folhas e galhos), *Monstera deliciosa* Liebm. (polpa e cascas), *Morus nigra* L. (fruto inteiro), *Opuntia ficus-indica* Mill (polpa e cascas), *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (polpa, cascas e sementes), *Rubus niveus* Thunb. (fruto inteiro) (Quadro 1).

Quadro 1. Identificação das plantas frutíferas silvestres selecionadas para o estudo.

Nome científico	Nome popular	Exsicata	Local e data da coleta
<i>Abuta selloana</i> (Benth.) Eichler	Abuta	V.C. Filho 92	Major Gercino, SC 09/09/12
<i>Campomanesia reitziana</i> D. Legrand	Gabiroba	V.C. Filho 95	Itajaí, SC, 16/10/12
<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendtn.	Tomate de árvore	V.C. Filho 107	Itajaí, SC, 13/11/12
<i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.	Grumixama	V.C. Filho 110	Camboriú, SC 12/12/12
<i>Eugenia mattsosii</i> D. Legrand	Cerejinha	V.C. Filho 94	Itajaí, SC, 11/09/12
<i>Inga vera</i> Willd	Ingá-banana	V.C. Filho 114	Itajaí, SC, 05/02/13
<i>Marlierea tomentosa</i> Camb.	Guarapuruna	V.C. Filho 98	Camboriú, SC, 29/10/12
<i>Myrcianthes pungens</i> (O. Berg) D. Legrand	Guabiju	V.C. Filho 152	Urussanga, SC, 05/12/13
<i>Monstera deliciosa</i> Liebm.	Abacaxi-do-mato	V.C. Filho 119	Itajaí, SC, 19/02/13
<i>Morus nigra</i> L.	Amora Preta	V.C. Filho 96	Itajaí, SC, 02/10/12
<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	Figo da Índia	V.C. Filho 123	Itajaí, SC, 26/03/13
<i>Plinia edulis</i> (Vell.) Sobral	Cambucá	V.C. Filho 121	Camboriú, SC, 23/03/13
<i>Rubus niveus</i> Thunb.	Framboesa negra	V.C. Filho 101	Itajaí, SC, 30/10/12

Preparação dos Extratos. Os extratos das espécies descritas acima foram preparados no Laboratório de Fitoquímica da UNIVALI. As diferentes partes das plantas frutíferas frescas foram separadas levando em consideração suas características e quantidades, picadas manualmente e submetidas separadamente a um processo de maceração com metanol, a temperatura ambiente, por um período de uma semana, em vidraria vedada e ao abrigo da luz. Após filtração, o solvente foi removido por destilação em rotaevaporador sob pressão reduzida com temperaturas entre 45° e 50° C. Este processo foi realizado para cada parte das plantas frutíferas selecionadas. As folhas e os galhos de *A. selloana*, *M. tomentosa* e *M. pungens*, foram secados, triturados manualmente e posteriormente submetidos separadamente ao processo de maceração com metanol conforme descrito acima. Os extratos obtidos foram denominados de extrato metanólico bruto (EMB) (12).

Análise fitoquímica. Aliquotas dos extratos metanólicos foram analisadas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), na tentativa de estabelecer o perfil fitoquímico das diferentes partes das plantas frutíferas. As amostras foram eluídas com diferentes sistemas de solventes, utilizando mesmo volume e concentração, com aumento gradual de polaridade, para melhor resolução e perfil cromatográfico. Foram utilizados os seguintes solventes: hexano, acetato de etila e/ou acetona, clorofórmio, diclorometano e metanol. Para a realização da triagem fitoquímica, as diferentes classes de compostos foram reveladas com reagentes específicos como: anisaldeído sulfúrico para identificar terpenos e esteroides; cloreto férrico para compostos fenólicos; hidróxido de potássio para cumarinas; Dragendorff para alcaloides; entre outros (13).

Atividade antimicrobiana. Para os ensaios microbiológicos foram utilizadas como cepas padrão as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 11775), e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

Para o preparo do inóculo, cada bactéria foi transferida do meio de manutenção para o meio ágar Mueller-Hinton (Merck) e incubada a 35 °C por 18-24 horas, para a ativação da respectiva cultura. Após ativação, foram selecionadas de 4 a 5 colônias da bactéria e essas foram transferidas para tubo de ensaio com 5 mL de solução NaCl 0,86% estéril, seguido de homogeneização em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada, por espectrofotometria a 525 nm, em comparação com a escala 0,5 de MacFarland para atingir a concentração desejada de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL,

O inóculo do fungo leveduriforme foi preparado por meio do seu cultivo em ágar Sabouraud dextrosado, pelo menos duas vezes, para assegurar viabilidade das culturas jovens de 24 e 48 horas a 30 °C. Posteriormente foram selecionadas de 4 a 5 colônias da levedura com aproximadamente 1 mm de diâmetro, que foram suspensas em 5 mL de NaCl 0,85% estéril e homogeneizadas em agitador de tubos por 15 segundos. A densidade do inóculo foi ajustada, por espectrofotometria a 525 nm para a obtenção de transmitância de 95%, equivalente à concentração entre 1 e 5×10^9 células/mL,

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O método consistiu no preparo de diluições de cada amostra em meios de cultivo sólido, semeadura do microrganismo e, após incubação, a verificação da menor concentração da amostra que inibiu o crescimento.

Os valores da CIM foram determinados empregando a metodologia descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (14) para as bactérias e por Espinel-Ingroff e Pfaller (1995) para a levedura (15), com adaptações. Os extratos foram dissolvidos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada (4:6) e distribuídos em séries de 10 frascos com capacidade para 5 mL por diluição dupla, abrangendo concentrações de 1000 a 2 µg/mL. Posteriormente, a cada frasco foi adicionado 1 mL de meio ágar Mueller-Hinton para as bactérias e 1 mL de ágar Sabouraud dextrosado para a levedura, seguido de imediata homogeneização da mistura.

Após a solidificação dos meios de cultura, cada frasco foi semeado com o inóculo microbiano com auxílio de uma alça calibrada (1 µL) resultando em concentração final de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células para as bactérias e entre 1 e 5×10^6 células para a levedura. As séries foram incubadas a 35 °C por 18 a 24 horas para as bactérias e 30 °C por 24 a 48 horas para o fungo leveduriforme. Posteriormente, foram realizadas as leituras para a determinação da CIM por meio da verificação visual do crescimento microbiano em cada frasco das respectivas séries. Para a interpretação dos resultados foi considerado CIM como a inibição total do crescimento microbiano.

Durante os testes foram incluídos controles dos meios de cultura e do solvente utilizado na solubilização dos extratos a fim de verificar seu efeito sobre o microrganismo. A concentração final de DMSO nos ensaios não excedeu 2%. A leitura dos resultados foi considerada válida somente quando houve crescimento microbiano nestes controles. Foram utilizados como controles positivos, antibióticos empregados na clínica, sendo para as bactérias, a amoxicilina, e para fungos o cetoconazol. Os ensaios foram repetidos três vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise fitoquímica. A investigação preliminar de constituintes químicos de uma planta possibilita o conhecimento prévio do extrato e indica a natureza das substâncias presentes (16).

O resultado da triagem fitoquímica por meio da análise por CCD encontra-se apresentado na Tabela 1, indicando a presença ou ausência de diferentes classes de compostos bioativos presentes nas plantas frutíferas silvestres selecionadas para o estudo.

Tabela 1. Avaliação por CCD utilizando reveladores seletivos para as classes de esteroides/terpenos, compostos fenólicos, cumarinas e alcaloides nos extratos metanólicos brutos (EMB) das plantas frutíferas silvestres selecionadas para o estudo.

Plantas frutíferas	EMB	Esteroides / Terpenos	Compostos fenólicos	Cumarinas	Alcaloides
<i>Abuta selloana</i> (Benth.) Eichler	Sementes	+	+	-	-
	Cascas	-	+	-	-
	Polpa	+	+	-	-
	Galhos	+++	+++	+	+
	Folhas	+++	+++	+	++
<i>Campomanesia reitziana</i> D. Legrand	Fruto inteiro	+++	+++	+	-
<i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendtn.	Fruto inteiro	-	-	-	-
	Polpa	-	-	-	-
	Cascas	-	-	-	-
<i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.	Polpa e cascas	+	++	-	-
	Sementes	++	+++	-	-
<i>Eugenia mattosii</i> D. Legrand	Fruto inteiro	++	++	-	-
<i>Inga vera</i> Willd	Polpa	-	+	-	-
	Sementes	+++	-	-	-
	Cascas	+	+	-	-
<i>Martierea tomentosa</i> Camb.	Polpa (madura)	++	-	-	-
	Sementes (madura)	+++	-	-	-
	Cascas (madura)	+++	-	-	-
	Polpa e casca (verdes)	+++	-	-	-
	Sementes (verdes)	+++	-	-	-
	Galhos	+++	++	+	++
	Folhas	+++	+++	+++	+++
<i>Myrcianthes pungens</i> (O. Berg) D. Legrand	Polpa	-	+	-	-
	Sementes	+++	+++	-	+
	Cascas	++	++	-	-
	Folhas	+++	+++	-	+
	Galhos	+++	-	-	-
<i>Monstera deliciosa</i> Liebm.	Polpa	-	-	-	-
	Cascas	-	-	-	-
<i>Morus nigra</i> L.	Fruto inteiro	+	-	-	-
<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill	Polpa	-	+	-	-
	Cascas	-	-	-	-
<i>Plinia edulis edulis</i> (Vell.) Sobral	Polpa	++	+	-	-
	Cascas	+++	+	+	-
	Sementes	++	+	-	-
<i>Rubus niveus</i> Thunb.	Fruto inteiro	++	-	-	-

(-) ausência de substância, (+) fraco (1 substância), (++) médio (2 a 3 substâncias), (+++) forte (acima de 3 substâncias).

Com base nos resultados obtidos da análise fitoquímica preliminar, o EMB dos galhos e folhas de *A. selloana* e *M. tomentosa*, dos frutos inteiros de *C. reitziana*, das folhas e sementes de *M. pungens* e das cascas de *P. edulis* mostraram melhor perfil fitoquímico considerando a quantidade de compostos e suas classes presentes.

Também foi possível evidenciar os triterpenos alfa- e beta-amirina e os flavonoides quercetina, quercitrina e rutina nas folhas de *M. pungens* (17). No extrato metanólico dos frutos de *C. reitziana* a chalcona dimetilcardamonina foi identificada como o composto majoritário (18).

Em trabalho prévio, os triterpenos ácido maslínico e ácido ursólico foram isolados das cascas dos frutos de *P. edulis* (19).

Atividade antimicrobiana. Essa análise foi baseada na classificação indicada por Holetz e cols (2002) que

estabeleceram os seguintes critérios: excelente atividade antimicrobiana – 10 a 100 µg/mL; boa - > 100 a 250 µg/mL; moderadamente ativos - >250 a 500 µg/mL e pouco ativos - >500 a 1000 µg/mL (20).

Como pode ser observado na Tabela 2, o extrato da polpa madura de *M. tomentosa* pode ser classificado com excelente atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus* (CIM de 62,5 µg/mL); e o extrato das sementes de *P. edulis* com boa atividade (CIM de 125 µg/mL). O extrato dos galhos de *M. tomentosa* e as sementes de *E. brasiliensis*, e de *M. pungens* foram classificados com moderada atividade contra a bactéria *S. aureus* (CIM de 500 µg/mL). O extrato das cascas de *A. selloana* apresentou fraca atividade contra *S. aureus* (CIM de 1000 µg/mL). Os demais extratos das plantas frutíferas silvestres apresentam-se como inativos por exibirem valores superiores a 1000 µg/mL.

Tabela 2. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos metanólicos das plantas frutíferas silvestres frente aos microrganismos testados.

Plantas frutíferas	Partes utilizadas	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
		<i>S. aur</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. alb</i>
<i>Abuta selloana</i> (Benth.) Eichler	Cascas	1000	>1000	>1000
<i>Eugenia brasiliensis</i> Lam.	Sementes	500	>1000	>1000
<i>Martierea tomentosa</i> Camb.	Polpa (madura)	62,5	>1000	>1000
	Galhos	500	>1000	>1000
<i>Myrcianthes pungens</i> (O. Berg) D. Legrand	Sementes	500	>1000	>1000
<i>Plinia edulis</i> (Vell.) Sobral	Semente	125	1000	>1000

S. aur (Staphylococcus aureus), *E. coli* (Escherichia coli), *C. alb* (Candida albicans).

Como mostrado na Tabela 2, a maior resposta frente aos microrganismos utilizados, foi do EMB da polpa madura da planta *M. tomentosa*, que obteve CIM de 62,5 µg/mL, classificada como excelente atividade. Esse resultado pode ser justificado pela presença de terpenos, identificados na triagem fitoquímica da planta. Conforme demonstrado por Cowan (1999), alguns terpenos têm a capacidade de romper compostos lipofílicos das membranas bacterianas, e isso explica também porque somente *S. aureus*, uma bactéria gram-positiva, foi afetada (21).

O extrato dos galhos de *M. tomentosa* mostrou moderada atividade antimicrobiana, apesar de vários compostos presentes mostrados pela análise fitoquímica. Esse resultado pode sugerir sinergismo entre os compostos ou baixa concentração da substância responsável pela ação antibacteriana nos galhos da planta.

Outro extrato que apresentou uma boa atividade contra *S. aureus* foi das sementes de *P. edulis*, que tam-

bém se mostrou ativo, porém fracamente, contra a bactéria *E. coli*. O estudo de Ishikawa e cols. (2008) com o extrato hidroetanólico liofilizado das folhas de *P. edulis* não revelou atividade, confirmando que as sementes possuem um potencial antimicrobiano interessante (22).

O extrato das sementes de *E. brasiliensis* mostrou moderada atividade contra *S. aureus*, destacando a importância de mais trabalhos explorando o potencial antimicrobiano de extratos de sementes desta espécie.

A única parte da *M. pungens* tendo moderada atividade contra a bactéria *S. aureus* foi a semente (CIM de 500 µg/mL). No entanto, o estudo de Desoti e cols (2011), sobre a atividade antimicrobiana, antifúngica e citotóxica das folhas de *M. pungens*, evidenciou que os extratos de acetato de etila e hexano apresentaram CIM ≤ 62,5 µg/mL contra bactérias Gram-positivas (23), o que pode estar relacionado aos taninos encontrados nas folhas dessas plantas. O extrato hexânico mostrou a

mais forte inibição, apresentando CIM com mesma concentração, e o extrato metanólico apresentou boa atividade antifúngica.

Em relação à espécie *R. niveus*, investigações realizadas pelo NIQFAR, mostraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* para o extrato metanólico e a fração acetato de etila, apresentando CIM de 250 µg/mL e 500 µg/mL, respectivamente (24). Estudos revelaram que o extrato de *R. niveus*, além de apresentar elevado teor de vitamina C e betacaroteno, é rico em compostos fenólicos além de ácido elágico o que justifica a ação antibacteriana (25).

Entre os extratos utilizados, somente as sementes de *P. edulis* mostraram resultados contra a bactéria gram-negativa utilizada nos testes. Isso pode ser explicado pelas características desse grupo de bactérias. A presença de uma membrana externa nestes microrganismos dificulta a entrada de agentes antimicrobianos e, quando

é possível a entrada, por vezes não é em quantidade suficiente para sua ação (26). As demais partes das plantas testadas não apresentaram atividade até a concentração de 1000 µg/mL de extrato.

CONCLUSÃO

A partir da triagem para atividade antimicrobiana, o presente estudo mostrou resultados expressivos para as diferentes plantas frutíferas silvestres selecionadas, com destaque para: *Eugenia brasiliensis*, *Marlierea tomentosa*, *Myrcianthes pungens* e *Plinia edulis*. Outros ensaios se fazem necessários para o isolamento de compostos antimicrobianos, eliminando assim possíveis interferências entre compostos; e testes com outras linhagens bacterianas, confirmando e assegurando os resultados expostos.

REFERÊNCIAS

1. Novaretti MCZ, Aquino S, Piscopo MR. Controle de vendas de antibióticos no Brasil: análise dos efeitos dos atos regulatórios no uso abusivo pelos consumidores. RASM. 2014; 4(2):25-39.
2. Castanheira BAMG. Mecanismos de resistência a antibióticos. [Dissertação]. Lisboa: Mestrado em Farmácia, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias de Lisboa. 2013.
3. Garbin VP. Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius 1824). [Dissertação]. Curitiba: Mestrado em Microbiologia, Patologia e Parasitologia, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2011.
4. Pavanelli MF, Garcia R. Avaliação antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de quatro espécies vegetais. Rev Saúde e Biol. 2013; 8(3):26-31.
5. Lima MRF, Luna JS, Dantos AF, Andrade MCC, Sant'Ana AEG, Genet JP, Marquez B, Neuville L, Moreau N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. J Ethnopharmacol; 2006. 105(1-2):137-47. DOI: 10.1016/j.jep.2005.10.026.
6. Bella Cruz AB, Eger I, Bueno EC, Freitas RA. Métodos *in vitro* na avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: Bresolin TMB, Chechinel-Filho V. Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos. 2010. p.175-205.
7. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry. 1991. 130(12):3875-3883. DOI: 10.1016/0031-9422(91)83426-L.
8. Cushnie TTP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2006; 27(2):181.
9. Popova MP, Chinou IB, Marekov IN, Bankova VS. Terpenes with antimicrobial activity from *Cretan propolis*. Phytochemistry. 2009; 70(10):1262-1271. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.07.025.
10. Thanigaiarassu RR, Kannabiran K, Khanna VG. Antibacterial activity of saponin isolated from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. J Pharm Res. 2009; 2(2):272-274.
11. Deng Y, Yu Y, Luo H, Zhang M, Qin X, Li L. Antimicrobial activity of extract and two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Stephania dielsiana*. Food Chem. 2011; 124(4):1556-1560. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.08.011.
12. Cechinel-Filho V, Yunes RA. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova. 21:99-105. DOI: 10.1590/S0100-40421998000100015.
13. Ugaz OL. Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. 2. ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú, 1994, p.300.
14. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard M07-A8. CLSI, Wayne, PA, 2009.
15. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA. Antifungal agents and susceptibility testing. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology, 6. ed. Washington: ASM, 1995.

16. Gomes RVRS, Vilela VLR, Gomes EN, Maia AJ, Athayde ACR. Análise fitoquímica de extratos botânicos utilizados no tratamento de helmintoses gastrintestinais de pequenos ruminantes. *Rev Caatinga*. 2011; 24(4):172-177.
17. Nesello LAN, Campos A, Capistrano K, Buzzi FC, Cechinel Filho V. Chemical composition and antinociceptive activity of *Myrcianthes pungens* leaves. *Int J Appl Res Nat Prod*. 2016; 9:14-19.
18. Nesello LAN, Campos A, Wagner T, San Feliciano A, Buzzi FC, Cechinel Filho V. Chemical composition and antinociceptive potential of *Campomanesia reitziana* fruits. *J Med Food*. 2016; 19(5):518-520. DOI: 10.1089/jmf.2015.0092.
19. Nesello LAN. Avaliação fitoquímica e farmacológica de plantas frutíferas silvestres selecionadas da flora catarinense. [Tese]. Itajaí: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do vale do Itajaí; 2015.
20. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of some plants use in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(7):1027-1031. DOI: 10.1590/S0074-02762002000700017.
21. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4):564-582.
22. Ishikawa T, Kato ETM, Yoshida M, Kaneko TM. Morphoanatomic aspects and phytochemical screening of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral Myrtaceae. *Rev Bras Cien Farm*. 2008; 44(3):515-520. DOI: 10.1590/S1516-93322008000300023.
23. Desoti VC, Maldaner CL, Carletto MS, Heinz AA, Coelho MS, Piatí D, Tiunan TS. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. *Arq Ciênc Saúde*. 2011; 15(1):3-13.
24. Melim C, Alves AD, Martins DTO, Bella Cruz A, Quintal ZRM, Guimarães K, Cechinel Filho V, Niero R. Antimicrobial activity of extracts and fractions from aerial parts of selected plants (*Garcinia achachairu*, *Macrosiphonia velame*, *Rubus niveus* and *Pilea microphylla*) against some pathogenic microorganisms. *Nat Prod Commun*. 2013;8(11):1567-1569.
25. Schaker PDC, Antonioli LR. Aspectos econômicos e tecnológicos em pós colheita de amoras-pretas (*Rubus* spp). *R Bras Agrociência*. 2009; 15(1-4):11-15.
26. Schaechter M, Engleberg NC, Eisentein BI, Medoff G. *Microbiologia Mecanismos das Doenças Infeciosas*, 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.