

ESTUDO FITOQUÍMICO E ANTIBACTERIANO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)

Luciana de Souza Lorenzoni¹, Simony Marques da Silva Gandini¹, Tércio da Silva de Souza², Alexandre Cristiano Santos Junior², Alessandra de Fátima Ulisses³

¹ Graduandas em Ciências Biológicas pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus de Alegre, Rua Principal, s/n, Distrito de Rive –29500-000, Alegre – ES. (lucianaloren27@gmail.com)

² Professor do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus de Alegre, Rua Principal, s/n, Distrito de Rive –29500-000, Alegre – ES

³ Funcionária do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, Campus de Alegre, Rua Principal, s/n, Distrito de Rive –29500-000, Alegre – ES

Recebido em: 30/09/2013 – Aprovado em: 08/11/2013 – Publicado em: 01/12/2013

RESUMO

Este trabalho buscou analisar o teor de compostos fenólicos presentes no extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L., bem como, determinar a CIM e CBM frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* sp. e *Salmonella* sp.. O extrato bruto foi obtido a partir das folhas trituradas por percolação a frio, utilizando como solvente etanol 96 °GL e concentrado em evaporador rotatório. A análise do teor de compostos fenólicos: fenólicos totais, antocianinas e flavonoides foram realizadas através de espectrofotometria de UV-VIS. Para a determinação da CIM utilizou-se a técnica de difusão em discos de papel-filtro, com 6 mm de diâmetro, impregnados com 0,7µL de extratos etanólicos de *Eugenia uniflora* L. em diferentes concentrações e colocados em placas de Petri, antes inoculadas com as respectivas bactérias. Utilizou-se, como controle positivo, tetraciclina, vancomicina, penicilina e cefalexina e o controle negativo etanol 96 °GL. Para a realização da análise da CBM utilizou-se o extrato em diferentes concentrações e acrescido de 1 mL do inóculo com as respectivas bactérias. Através da análise dos resultados verificou-se que o extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L. apresentou em sua composição $3,54 \pm 0,52 \mu\text{g}/100\text{g}$ de antocianinas, $195,61 \pm 4,89 \mu\text{g}/100\text{g}$ de flavonoides, $412,2 \pm 23,8 \mu\text{g}/100\text{g}$ de taninos condensados e $17,59 \pm 1,09 \text{mg}/100\text{g}$ de fenólicos totais. Para a CIM a menor concentração que demonstrou inibição foi de 12,5% para as três bactérias testadas, quanto a CBM, 12,5% foi tida como antibacteriano para *S. Aureus* ATCC 25923 e *E. coli* sp., para *Salmonella* sp. a menor concentração foi de 25%.

PALAVRAS-CHAVE: Extrato vegetal, pitangueira, antimicrobiano, compostos fenólicos.

STUDY AND ANTIBACTERIAL PHYTOCHEMICAL EXTRACT OF ETHANOLIC *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)

ABSTRACT

This study aimed to analyze the content of phenolic compounds present in the ethanol extract of *Eugenia uniflora* L., as well as determine the MIC and MBC front *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* sp. and *Salmonella* sp. The crude extract was obtained from crushed leaves percolation cold, using as solvent ethanol 96 ° GL and concentrated on a rotary evaporator. The analysis of the phenolic content: Total phenolic, flavonoids and anthocyanins were performed using UV-VIS spectrophotometry. For MIC determination we used the technique of disc diffusion filter paper with 6mm diameter, impregnated with 0,7 µL of ethanol extracts of *Eugenia uniflora* L. at various concentrations and placed in a Petri dish, inoculated before the respective bacteria. It was used as a positive control, tetracycline, vancomycin, penicillin and cephalixin and negative control ethanol 96 ° GL. The analysis used the CBM extract at different concentrations and added with 1 mL of the inoculum with the respective bacteria. Through the analysis of the results showed that the ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. presented in its composition of anthocyanins 0.52µg/100g ± 3.54, 195.61 ± 4.89 µg/100g flavonoids, 412.2 ± 23.8 µg/100g condensed tannin and 17.59 ± 1.09 mg/100 g phenolics. CIM for the lowest concentration that showed inhibition was 12.5% for the three bacteria tested, as CBM, 12.5% was taken as an antibacterial to *S. Aureus* ATCC 25923 and *E. coli* sp. for *Salmonella* sp. the lower concentration was 25%.

KEYWORDS: plant extract, pitangueira, antimicrobial, phenolic compounds

INTRODUÇÃO

A vida útil de muitos antibióticos vem sendo reduzida, devido à resistência que algumas cepas estão desenvolvendo, sendo de grande importância quando uma cepa adquirir resistência a mais de um antibiótico (ALTERTHUM, 2005). Uma das grandes preocupações da medicina é o desenvolvimento de superbactérias (CARVALHO, 2001). Dentre as bactérias encontram-se a *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella*, que se ingeridas através de alimentos contaminados podem acarretar sérios prejuízos a saúde (SILVA et al., 2010).

A *S. aureus* são cocos Gram positivos, encontradas principalmente nos seres humanos e em animais de sangue quente, cuja doença transmitida é a intoxicação (TIITTO-JULKUNEM, 1985). A *E. coli* é uma bactéria Gram negativa, sendo que no Brasil a incidência não é conhecida, mas segundo os dados da Organização Nacional de Saúde, há vários anos tem sido a causa mais comum de insuficiência renal em crianças na Argentina e a taxa de mortalidade encontra-se na faixa de 7% (WHO, 2005). A *Salmonella* é definida como bastonetes Gram negativos não esporogênicos é responsável, de acordo com EDUARDO et al., (2004), entre 1999 e 2003 por 1.024 notificações de diarreia ao centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE). Nos Estados Unidos, a cada ano são reportados aproximadamente 40.000 casos de salmonelose (CONSOLINI & SARUBBIO, 2002).

Os fitoterápicos podem ser uma alternativa na produção de antimicrobianos, uma vez que a maioria dos antibióticos usados na clínica são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* e por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium* (ALTERTHUM, 2005). Além disso, o desenvolvimento de pesquisas no sentido de descobrir novos princípios ativos (PA) é essencial na batalha contra a resistência bacteriana.

Atualmente pesquisadores têm direcionado suas atenções à flora brasileira (BURT, 2004), onde inserido nesta encontra-se a *Eugenia uniflora*, conhecida popularmente como pitangueira. Esta planta vem sendo utilizada na medicina popular há muito tempo, através dos índios e encontra-se em posição de destaque pelo seu uso em fármaco anti-hipertensivo, diurético (BURT, 2004), adstringente (GARCIA et al., 2010), antipirético e para o tratamento de desordens digestivas (ALICE, 1991). Na Ilha da Madeira, esta planta é utilizada no combate de bronquites, gripes e problemas intestinais e na Nigéria como um febrífugo (CONSOLINI & SARUBBIO, 2002).

Tais potencialidades ocorrem a partir de substâncias produzidas pela planta conhecidas por metabólicos secundários, onde esses são afetados pelo meio externo e interno do vegetal como, por exemplo, espécie, variedade, estresse ambiental a que foi submetida à planta, estágios de crescimento e maturação, além da metodologia analítica empregada na determinação dos mesmos. Graças à atividade desses metabólicos secundários, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por micro-organismos, insetos e herbívoros (GOTHIEB, 1981).

Outras funções também provem desses, como atrativo para polinização, por contribuírem para a pigmentação do vegetal, como antioxidantes e, similarmente ao sistema imunológico humano, protegendo a planta de raios ultravioleta e de patógenos e várias outras finalidades. Nos alimentos são os principais compostos responsáveis pelas características sensoriais tais como adstringência, amargor e aroma, além da estabilidade oxidativa dos produtos derivados de vegetais.

Dentre os metabólicos secundários encontram-se os compostos fenólicos, responsáveis por algumas destas atividades biológicas. Alguns pesquisadores preferem dar a essas substâncias inibidoras, de origem vegetal, a denominação de fintocidas ou de substâncias semelhantes a antibióticos "*Antibiotic Like-Substances*" (GARCIA et al., 2010). PANIZZA (1998) registrou nas folhas de *E. uniflora*, além de taninos e flavonoides, a presença de saponinas, sais minerais e um pouco de vitamina C. As saponinas são componentes importantes para ação de muitas drogas vegetais, os flavonoides por sua vez, são utilizadas para o tratamento de anti-inflamatórios e antimicrobianos (FIUZA et al., 2008). Os compostos fenólicos correspondem a um grupo formado por moléculas muito distintas entre si que estão divididas, em função da estrutura química, em duas classes, flavonoides e não flavonoides, e estas duas classes dividem-se em várias subclasses em função do padrão de substituição e das estruturas químicas.

A classe dos não flavonoides não apresenta uma estrutura básica em comum e, portanto, é uma classe muito heterogênea (CHEYNIER, 2005). Já os flavonoides caracterizam-se por apresentar uma estrutura comum composta por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos e um átomo de oxigênio formando um heterociclo oxigenado denominado núcleo flavano. O grau de oxidação e o padrão de substituição do anel C, heterociclo, definem as classes de flavonoides e dentro destas o padrão de substituição nos anéis A e B determinam os compostos específicos (RHODES, 1996). Vários estudos, recentes têm demonstrado seus efeitos plurifarmacológicos (bactericida, antiviral, antialérgico, antitrombótico, antiinflamatório, anticarcinogênico, hepatoprotetor, vasodilatador), despertando grande interesse principalmente por sua alta prevalência nas dietas já que são compostos onipresentes nos vegetais (CHEYNIER, 2005; SOOBRATTEE et al., 2005).

Diante disso, este trabalho buscou analisar a composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), bem como a determinação da CIM e CBM frente às cepas de *Staphilococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* sp. e *Salmonella* sp.

MATERIAIS E MÉTODOS

COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta das folhas de *Eugenia uniflora* L. foi realizada durante o mês de agosto do ano de 2012, na área do IFES – Campus de Alegre, cidade de Alegre, ES. O material botânico foi seco a temperatura ambiente durante por sete dias. Foram coletados também, três espécimes, como material testemunha para a identificação botânica (FALKENBERG et al., 2003). A identificação botânica foi feita tomando-se como referência a descrição da literatura botânica (ARANHA et al., 1972; LORENZI & MATOS, 2002). O material herborizado foi depositado em acervo do Herbário Central da UFES - Subcuradoria Alegre/Jerônimo Monteiro, ES, sob a seguinte numeração: *Eugenia uniflora* registro nº 21907.

PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Os extratos brutos foram obtidos a partir dos materiais triturados por percolação a frio, utilizando como solvente etanol (96°GL), onde permaneceram em repouso, sob o abrigo da luz, por quatro dias. As amostras foram filtradas em papel-filtro e concentradas em evaporador rotatório (CAMPOS et al., 2011; CARVALHO, 2001) a 60° C e 40 rpm até a redução de 1/4 do volume do solvente. Paralelamente à extração, foi determinado o peso seco das amostras de planta seca, resultando em 3g/mL de solvente. Em seguida, o extrato foi diluído com etanol nas seguintes concentrações: 12,5% (v/v); 25%(v/v); 50%(v/v); 50%(v/v) e 100% de extrato.

DETERMINAÇÃO DO TEOR DE METABÓLICOS SECUNDÁRIOS

Para determinar o teor de antocianinas totais e flavonóis totais utilizou-se o procedimento proposto por LEES & FRANCIS (1972). Para o teor das proantocianidinas foi adotado o procedimento proposto por TIITTO-JULKUNEM (1985). E o teor de compostos fenólicos totais foi feito segundo WETTASINGHE & SHAHIDI (1999).

MICRORGANISMOS UTILIZADOS

Foram utilizadas cepa padronizada *Staphilococcus aureus* ATCC 25923 e as cepas *E. coli* sp. e *Salmonella* sp., onde estas foram isoladas segundo os métodos de SILVA et al., (2010) a partir de amostras de água coletadas em uma lagoa de estabilização contaminada com dejetos de suínos.

PREPARAÇÃO DOS INÓCULOS DE MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS

As bactérias foram reativadas em meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) e cultivada até atingir à concentração de 10^8 UFC/mL. Esse número de células por mL foi quantificado utilizando-se uma curva padrão, sendo o crescimento monitorado por espectrofotometria de UV/VIS a 600nm e feita contagem em placas.

TESTES DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A metodologia empregada para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos etanólicos e da concentração mínima inibitória (CIM) foi a de difusão em disco (NCCLS, 2000; CLSI, 2008), na qual meio Ágar Padrão de Contagem (PCA) foi inoculado com 10^8 UFC/mL, e depositado em placas de Petri estéreis com diâmetro de 140mm. Após a inoculação, discos de papel filtro estéreis, com 6mm de diâmetro, foram posicionados sobre o meio. Com o auxílio de uma micropipeta 7µl do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L. nas concentrações (100; 50; 25; 12,5% v/v) foram depositados sobre os discos de papel. Após o período de incubação de 24 horas, a uma temperatura de 37°C, com o auxílio de paquímetro mediu-se o halo de inibição ao redor dos discos (MAZUMDER *et al.*, 2006; , NAKAMURA *et al.*, 1999). A menor concentração em que se formou esse halo de inibição foi definida como a CIM. O teste de controle negativo foi realizado com disco contendo 7µL etanol hidratado 96°GL e o teste controle positivo utilizou-se tetraciclina, vancomicina, penicilina e cefalexina. Os testes foram realizados em triplicatas por bactéria. A CIM consistiu na menor concentração do extrato que inibiu o crescimento bacteriano ao redor dos discos.

TESTES DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA MÍNIMA (CBM)

A Determinação das concentrações bactericidas mínimas é definida como as menores concentrações do antimicrobiano estudado capaz de causar a morte do inóculo (SANTURIO *et al.*, 2011). Tal teste prosseguiu da seguinte forma: em seis tubos de ensaios esterilizados foram preparados volumetricamente com 1 mL nas seguintes diluições: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12% de extrato em Água Peptonada Tamponada (SOUZA *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2010). Acrescentou-se 1 mL do inóculo bacteriano, ajustado a 10^8 Unidades Formadora de Colônia (UFC), a cada tubo contendo 9 mL das referentes concentrações de extrato. Foram utilizados dois grupos controles, positivo e negativo, respectivamente, formado pelo meio de cultura (caldo TSB) acrescido de 2 µl do inóculo bacteriano, e desse meio de cultura sem a adição do inóculo (NAKAMURA *et al.*, 1999; NCCLS, 2000). A CBM é a redução de 99,9% do crescimento bacteriano. No nosso estudo, valores menores ou iguais a três colônias, representam 99,9% de morte bacteriana (GARCIA *et al.*, 2010). Todos os tubos, após 24 horas de incubação, foi retirada uma alíquota de 100 µL plaqueados em ágar Padrão de Contagem (PCA), pelo método de espalhamento em superfície, e permaneceram por 24 horas em estufa a 37°C para a determinação da CBM. Os tubos controles também foram plaqueados desta forma. Foi realizada a contagem das UFC nas placas e o menor plaqueamento que demonstrou um valor igual ou inferior a 3 colônias representa 99,9% de redução e, portanto, é a CBM do agente testado.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

As análises de variância foram realizadas segundo normas da ANOVA. As diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey em nível de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a determinação dos teores de compostos fenólicos presentes no extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L. são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1 - Quantificação dos compostos fenólicos nos extratos etanólicos das folhas de *Eugenia uniflora* L.

Espécie	Antocianinas µg/100g	Flavonóis µg/100g	Taninos condensados mg/100g	Fenólicos totais Mg/100g
<i>E. uniflora</i>	2.8±0.5	31.9±0.8	412.2±23.8	1934±7.2

Esses resultados corroboraram com a literatura recente indicando variação no teor do fito-constituintes conforme o local e/ou época em que é colhido o material botânico para análise. As variações dos parâmetros climáticos e geográficos, como temperatura, altitude, pluviosidade, tipo de solo entre outros influenciam diretamente no teor dos metabólicos secundários. FIUZA et al., (2008) evidenciaram a presença dos mesmos fito-constituintes, do presente trabalho, a partir da triagem fitoquímica do pó das folhas de *E. uniflora*. Valores semelhantes ao presente estudo foram descritos pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV (2003). O autor PANIZZA (1998) registrou nas folhas de *E. uniflora*, além de taninos e flavonoides, presença de saponinas, um pouco de vitamina C e sais minerais.

LEE et al. (1997), analisando os constituintes fenólicos de folhas de *E. uniflora*, evidenciaram a ocorrência de eugeniflorina D2 (C₆₈H₄₈O₄₅) e eugeniflorina D1 (C₇₅H₅₂O₄₈), além de dois taninos macrocíclicos hidrolisáveis, obtidos do extrato etanólico. De acordo com SIMÕES et al., (2004) as saponinas são componentes importantes para ação de muitas drogas vegetais, destacando-se aquelas tradicionalmente utilizadas como expectorantes e diuréticas.

Plantas que contém grande quantidade de taninos são utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas moléstias, tais como diarreia, reumatismo, hipertensão arterial, queimaduras, hemorragias, feridas, problemas estomacais (gastrite, azia, náusea e úlcera gástrica), problemas do sistema urinário e renais, processos inflamatórios em geral (SANTOS & MELO, 2004). Plantas que contém grande quantidade de flavonoides são utilizadas para o tratamento de doenças como antivirais, anti-hemorrágicos, circulatórias, hipertensão, anti-inflamatórios e antimicrobianos (ZUANASE & MONTANA, 2004; CUNHA, 2005).

COSTA et al., (2005) descreveram em seu trabalho que os compostos fenólicos, resultantes do metabolismo secundário das plantas, tem uma função de atração de agentes polinizadores, para o vegetal, ou de defesa contra predadores, além dessas, podem ostentar outras atividades biológicas. Corroborando com tal observação, pode-se citar COWAN (1999); NAVARRO & DELGADO (1999); DJIPA et al., (2000); TALEB-CONTINI et al., (2003); MONTEIRO et al., (2005); MANDAL et al., (2005); COSTA et al., (2005); AVATO et al., (2006); SOETAN et al., (2006); SOUZA et al., (2007); MIN et al., (2008) que, ao avaliarem a atividade biológica de espécies vegetais, verificaram que os referidos constituintes fitoquímicos estariam relacionados a eficiência da atividade antimicrobiana, pois foram ativos contra

diversos microrganismos, incluindo os estudados no presente trabalho. Tais fatores explicam a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L. frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* sp. e *Salmonella* sp., para as concentrações testadas. A menor concentração que demonstrou resistência frente aos microrganismos testados foi de 12,5%, tanto para a CIM (Tabela 2) quanto CBM (Tabela 3). A análise dos resultados foi verificada em tabela abaixo. Assim como os extratos vegetais, os óleos essenciais são produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas, variando a intensidade e a composição de acordo com a espécie (GUIMARÃES et al., 2008). A composição final dos óleos essenciais é influenciada pelas condições climáticas do local de origem das plantas, além da temperatura de secagem do material vegetal, a qual pode levar a grandes perdas, por volatilização dos princípios ativos presentes nesses óleos (DORMAN & DEANS, 2000).

TABELA 2 - Média do diâmetro dos halos de inibição em mm para CIM de acordo com as respectivas diluições do extrato de *Eugenia uniflora* L. frente às bactérias testadas.

Microrganismos	Extratos de <i>Eugenia uniflora</i> (%v/v)				Antibióticos Comerciais			
	12,50	25,00	50,00	100,0	CFX	PEN	TET	VAN
<i>Escherichia coli</i>	10,66a*	08,00b	13,33a	11,66a	18,00c	08,00b	08,00b	13,00a
<i>Salmonella spp.</i>	10,83a	13,33a	11,00a	12,33a	31,00d	23,00c	25,00c	35,00d
<i>S. aureus</i>	12,33a	11,17a	13,00a	12,00a	40,00d	16,00c	20,00c	10,00a

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quanto às concentrações para a determinação da CBM, a menor concentração que inibiu o crescimento em placas contidas com *S. aureus* ATCC 25923 é de 25% correspondente à diluição de 1/4. Para *E. coli* sp. 12,5% que corresponde a diluição de 1/8. Para *Salmonella* sp. a menor concentração que demonstrou inibição do desenvolvimento de colônias em placas foi de 25% correspondente a diluição de 1/4, as placas contidas com a concentração de 12,5% apresentou inibição de apenas 2,17% da bactéria (placa com 138 UFC). O controle negativo apresentou grande crescimento bacteriano para as três bactérias testadas.

TABELA 3 - Média do número de colônias em placas para CBM de acordo com as respectivas diluições do extrato de *Eugenia uniflora* L. frente às bactérias testadas.

Microrganismos	Extratos de <i>Eugenia uniflora</i> (%v/v)					Controle	
	6,25	12,50	25,00	50,00	100,0	Positivo	Negativo
<i>Escherichia coli</i>	14a*	0	0	0	0	**	0
<i>Salmonella spp.</i>	**	138b	0	0	0	**	0
<i>S. aureus</i>	**	0	0	0	0	**	0

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

** Número incontável de colônias.

A resistência de bactérias frente aos antimicrobianos é tida como um problema pertinente à terapia antimicrobiana, por esta razão é necessário recorrer a novas fontes terapêuticas, os quais sejam mais eficientes para o tratamento de infecções

bacterianas. Uma alternativa extremamente viável são os produtos naturais, uma vez que, a partir desses foram descobertas novas drogas, pelo fato de que, além de ser uma alternativa econômica, são ricas em princípio ativo podendo trazer resultados satisfatórios no controle de doenças para países em desenvolvimento, onde a maioria das drogas é importada (XU & LEE, 2001 apud SILVA et al., 2007). Atualmente a maioria dos fármacos comercializados possuem as plantas como matéria prima de sua composição, mas esses medicamentos não são utilizados como antimicrobianos, são utilizados como suplementos vitamínicos e dietéticos (SILVA et al., 2007).

Resultados semelhantes ao presente estudo foram obtidos por AURICCHIO (2003); HOLETZ et al., (2002); AURICCHIO & BACCHI (2003); SOUZA et al., (2004); GONÇALVES et al., (2005); AURICCHIO et al., (2006); LOPES et al., (2006); FIUZA (2009), trabalhando com a *Eugenia uniflora* L. diferindo apenas em termos de concentrações e, em alguns casos, diluente dos extratos e diâmetros dos halos de inibição. A partir de uma avaliação realizada com 13 plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas (PESSINI et al., 2003), a *Eugenia uniflora* L. destacou-se pela sua ação antimicrobiana contra algumas cepas de bactérias.

Em um estudo preliminar foi avaliado o extrato de pitanga e verificou-se que esse possui a mesma eficácia que um dentífrico comercial nos índices de saúde bucal (JOVITO, et al, 2009). É relevante ressaltar que o extrato da *Eugenia uniflora* apresenta ação antibacteriana frente às bactérias Gram-negativa (*E. coli* e *Salmonella*) e Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) as quais apresentam diferenças entre si na estrutura de sua membrana (SILVA et al., 2010).

De acordo com MOREIRA & FREIRE, 2011, Comumente bactérias Gram-negativas são resistentes frente aos antibióticos, esse pode ser explicado por causa da diminuição da permeabilidade que ocorre em sua membrana externa. Diante da literatura pode se constatar que a ação dos flavonoides, alcaloides e saponinas estão diretamente ligados à ação antibacteriana observada contra as bactérias Gram-positivas e, principalmente, as Gram-negativas. Os autores COWAN (1999); FELIZARDO (2005) e VIEIRA et al., (2005) confirmam através dos resultados em seus trabalhos onde concluíram que tais substâncias propiciaram a atividade antimicrobiana frente as cepas Gram-negativas e as Gram-positivas.

Os extratos das folhas de pitanga atuam nos microrganismos como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas seja agindo no núcleo do micro-organismo ou no ribossomo, ou mesmo alterando estruturas presentes na membrana, sendo difícil determinar o mecanismo exato de ação, para a obtenção do efeito antibacteriano, de cada composto fenólico sobre as várias bactérias (BURT, 2004).

A mesma ação pode ser encontrada substâncias derivadas dos óleos essenciais, que são produtos voláteis, formados em células especiais da planta e são encontrados em folhas, flores, sementes, caules e raízes. De forma geral, são misturas complexas de substâncias lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES & SPITZER, 2004), capazes de agir na superfície celular bacteriana causando, principalmente, comprometimento da parede celular e membrana citoplasmática (BAKKALI et al., 2008).

Foram encontrados, na literatura, poucos trabalhos pertinentes a atividade antibacteriana do extrato etanólico da *Eugenia uniflora* frente às bactérias testadas, motivo pelo qual torna-se relevante este estudo. Encontrou-se, entretanto, uma

maior quantidade de trabalhos nessa linha de pesquisa com a utilização do óleo da respectiva planta (RISSATO et al., 2004; PAROUL et al., 2006; BRUN & MOSSI, 2007; LOPES, 2008; OLIVEIRA et al., 2009; CIOLFI, 2010).

CONCLUSÃO

O extrato etanólico de *Eugenia uniflora* L. apresentou em sua composição, $54 \pm 0,52 \mu\text{g}/100\text{g}$ de antocianinas, $195,61 \pm 4,89 \mu\text{g}/100\text{g}$ de flavonoides, $412,2 \pm 23,8 \mu\text{g}/100\text{g}$ de taninos condensados e $17,59 \pm 1,09 \text{mg}/100\text{g}$ de fenólicos totais. Para a CIM a menor concentração que demonstrou inibição foi de 12,5% para as três bactérias testadas, quanto a CBM, 12,5% foi tida como antibacteriano para *S. Aureus* ATCC 25923 e *E. coli* sp. e, para *Salmonella* sp., a menor concentração foi de 25%.

AGRADECIMENTOS

Ao PIBIC/IFES, pela concessão de bolsa a primeira autora.

REFERÊNCIAS

- ALICE, C. B.; VARGAS, V. M. F.; SILVA, G. A. A. B.; SIQUEIRA, N. C. S.; SCHAPOVAL, E. E. S.; GLEYE, J.; HENRIQUES, J. A. P.; HENRIQUES, A. T. Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v.35, p.165–171, 1991.
- ALTERTHUM F. Mecanismos de resistencia bacteriana in Trabulsi LR, Alterthum F (Editores). **Microbiologia** – 4a ed. Ed. Atheneu, 2005.
- ARANHA, C.; BACCHI, O.; LEITAO-FILHO, H. D. E. F. Plantas Invasoras de Culturas. **HCITEC: Min Agr Agiplan**; (2), p. 299-335, 1972.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades fármaco botânicas, químicas e farmacológicas. **Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 1, p. 55-61, 2003.
- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A; VARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 1, n. 26, p. 78-81, 2006.
- AVATO, P.; BUCCI, R.; TAVA, A.; VITALI, C.; ROSATO, A.; BIALY, Z.; JURZYSTA, M. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure activity relationship. **Phytotherapy research**, v. 20, n. 6, p. 454-457, 2006.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Apr. 2008.
- BANDONI, A. L.; BANDONI, A. L.; MENDIONDO, M. E.; RONDINA, R. V.; COUSSIO, J. D. **Survey of Argentine medicinal plants**. I. Folklore and phytochemical screening. **Lloydia**. v.35, p. 69–80, 1972.

BRUN, G. R.; MOSSI, A. J. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Perspectiva**, v. 34, n. 127, p. 135-142, 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, May 2004.

CAMPOS, M. S.; OLIVEIRA, L. G. A.; PIRES, F. R.; REBELLO, L. C.; BELINELO, V. J. Estudo fitoquímico e biológico do extrato etanólico de *Solanum cernuum* Vell (Solanaceae). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.7, N.13; 2011.

CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2001.

CHEYNIER, V. **Polyphenols in foods are more complex than often thought**. Am. J. Clin. Nutr., v. 81, 0. 223S-229S, 2005.

CIOLFI, F. **Potencial antimicrobiano de extratos e óleos essenciais de vegetais não tradicionais sobre patógenos de origem alimentar**. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade federal de viçosa, Viçosa, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved Standard – 3.ed.** Wayne,PA, 2008. (CLSI document M31-A3 Clinical and Laboratory Standards Institute).

CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat' heart. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 81, p. 57-63, 2002.

COSTA, J. G. M.; COSTA, G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente a larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

COWAN, M. Plant products as Antimicrobial Agents. **Rev. Clin. Microbiol**, v. 12, p. 564-582, 1999.

CUNHA, A.P.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 701p., 2003.

DJIPA, C.D.; DELMÉE, M.; QUETIN- LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 307-313, 2000.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, Apr. 2000.

EDUARDO, M. B. P., KATSUYA, E. M., BASSIT, N. P. & MELLO, M. L. R., **Salmonella Enteritidis-uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação sanitária para os alimentos implicados**, São Paulo, Brasil, 1999-2003. In: Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA), agosto 2004.

FALKENBERG M DE B, SANTOS RI DOS, SIMOES CMO. Introdução a Análise Fitoquímica. In: Simoes CMO et al. (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRG/UFSC, p. 228, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª ed. Parte II. Fasc. 5. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

FELIZARDO, A. **Agentes antibacterianos de origem vegetal e animal: seu efeito sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas**. 2005. Disponível em: <http://www.csv.unesp.br/P_coloquio_2005/resumo_alex.html>. Acesso em: 18 nov. 2012.

FIUZA T. S., REZENDE M. H., SABÓIA-MORAIS S M. T., BARA M. T. F., TRESVENZOL L. M. F., PAULA J. R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (myrtaceae). in: **Pharmacognostic characterization of the leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae)**, 2008.

FIUZA, T.S. **Bioatividade de extratos e frações das folhas da *Eugenia uniflora* L. e da *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley em microrganismos (bactérias e fungo) e em *Oreochromis niloticus* L.** 2009. 39 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2009.

GARCIA, C. S.; MÍMICA, L. M. J.; UEDA, S. M. I.; **Ação antibacteriana *in vitro* de extratos hidroetanólicos de plantas sobre *Stafilococcus aureus* MRSA E MSSA**. in: Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo, 2010.

GONÇALVES, A.L., ALVES FILHO A., MENEZES H.; Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. in: **arq. inst. biol.**, são paulo, v.72, n.3, p.353-358, jul./set., 2005.

GOTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v.6, n.1, p.22-29, 1981.

GUIMARÃES, L. G. de L. et al. Influence of light and temperature on the oxidation of the essential oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, nov./dez. 2008.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-31, 2002.

JOVITO, V.C.; ALMEIDA, L.F.D; FERREIRA, D.A.H.; MOURA, D.; PAULO, M.Q.; PADILHA, W.W.N. Avaliação *in vivo* de Dentifrício contendo extrato da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) sobre indicadores da saúde bucal. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr**, João Pessoa, 9(1): 81-86, jan/abr 2009.

LEES, D. H.; FRANCIS, F. J. Standardization of pigment analyses in cranberries. **HortScience**, v.7, p. 83-84, 1972.

LEE, M. I. **LEE, M. H.**; NISHIMOTO, S.; YANG, L. L.; YEN, K. Y.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Two macrocyclic hydrolysable tannin dimers from *Eugenia uniflora*. **Phytochemistry**. v.44, p.1343-1349, 1997.

LOPES, D. C. D. X. P.; FREITAS, Z. M. F.; SANTOS, E. P.; TOMASSINI, T. C. B. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L.. **Rev. bras. farmacogn**, v. 16, n. 2, p. 206-210, 2006.

LOPES, M. M. **Composição química, atividade antibacteriana e alelopática dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* L. e *Myrciaria glazioviana* (Kiaersk) G.M. Barroso e Sobral (Myrtaceae).** 2008. 48f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Viçosa.Viçosa, Minas Gerais, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** In: Inst Plantarum, 2002.

MANDAL P.; BABU, S.; MANDAL N. C. *Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis**, **Fitoterapia**. v. 76, n.5, p.462-465, 2005.

MAZUMDER, A.; MAHATO, A.; MAZUMDER, R. Antimicrobial potentiality of *Phyllanthus amarus* against drug resistant pathogens. **Natural Products Research**, 20(4):323-6, 2006.

MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; MERKEL, R.; WALKER, S.; TOMITA, G. Comparative antimicrobial activity of tannins extracts from perennial plants on mastitis pathogens. **Scientific Research and Essay**, v. 3, n. 2, p. 6673, 2008.

MONTEIRO, J. M.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quím. Nova**, vol. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOREIRA, V.C; FREIRE, D. ***Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos.**In: **Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Latu-Sensu da Puc** De Goiás, 6., 2011, Goiás. *Anais eletrônicos...* Goiás: PUC, 2011. Disponível em:<<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/Artigos4.html>>. Acesso em: 18 nov. 2012.

NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T; BANDO, E. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 94(5):675-678, 1999.

NAVARRO, V. DELGADO, G. **Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 223-226, 1999.

NCCLS-**National Committee for Clinical Laboratory Standards** 2000. Methods for Dilution antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Wayne, 2000.

OLIVEIRA, C.B.; SOARES, D. G. S.; BOMFIM, I. P. R.; DRUMOND, M. R. S.; PAULO, M. Q.; PADILHA, W. W. N. Avaliação da eficácia da descontaminação de escovas dentárias pelo uso do spray de óleo essencial da *Eugenia uniflora* L. (Pitanga). **Cienc. Odontol. Bras.**, v. 2, n. 12, p. 29-34, 2009.

PANIZZA, S. **Plantas que curam** (Cheiro de Mato). 3ª edição. São Paulo: IBRASA, 1998.

PAROUL N., MOSSI A., CANSIAN R. L., Emmerich D., MALVESTI A. L., Boschetto A. L., RIGO J. Avaliação química e antimicrobiana do óleo essencial de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). in: **Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

PESSINI, G.L.; HOLETEZ, F.B., SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G; DIAS-FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev Bras Farmacogn** 13(Supl. 1): 21-24, 2003.

RHODES, M. J. C. **Physiologically-active compounds in plant foods: an overview.** *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 55, p. 371-397, 1996.

RISSATO, S. R.; ALMEIDA, M. V; SILVA, L. C. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para a aplicação como fitofármaco. **Solusvita**, v. 23, n. 2, p. 209-222, 2004.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS,UFSC, p.616-56, 2004.

SANTURIO, D. F.; MABON, M. M. C. G.; CAVALHEIRO, C. P.; SÁ, M.F.; POZZO, M. D.; ALVES, S. H.; FRIESI, L. L. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n.6, p.1051-1056, 2011.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista. Botucatu, São paulo, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Varela, 4^o edição, p.256, 2010.

SILVA, J. G.; Souza, I. A.; Higino, J. S.; Siqueira-Junior, J. P.; Pereira, J. V.; Pereira, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.** 17(4): 2007

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5^a edição. Porto Alegre, RS: Editora UFSC, 2004.

SOETAN, O.; OYEKUNLE M. A.; AIYELAAGBE O. O.; FAFUNSO M. A. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. **AfricanJournal of Biotechnology**, v. 5, n. 23, p. 2405-2407, 2006.

SIMÕES, C. M.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. p. 467-495.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A. e ARUOMA, O. I., BAHORUN, T. Phenolics as potencial antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUZA, G.C. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p 135-143, 2004.

SOUZA, T. M.; SEVERI, J. A.; SILVA, V. Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R. C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 221-226, 2007

SOUZA, C. A. S.; AVANCINI, C. A. M.; WUEST, J. M. **Atividade antimicrobiana de *Tagetes minuta* L. - Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas**.in: Scielo, 2010.

TALEB-CONTINI, S. H.; SALVADOR, M. J.; WATANABE, E.; ITO, I. Y.; OLIVEIRA, D. C. R. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. **Rev. Bras. Cienc. Farm**, v. 39, n. 4, p. 403-408, 2003.

TIITTO-JULKUNEM, R. **Phenolic constituents in the leaves of Northern Willows: methods for the analysis of certain phenolics**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.33, p.213-217, 1985.

VIEIRA, O. M. C.; SANTOS, M. H.; SILVA, G. A.; SIQUEIRA, A. M. Atividade antimicrobiana de *Struthanthus vulgaris* (erva-de-passarinho). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 149-154, 2005.

WETTASINGHE, M., SHAHIDI, F. Evening Primrose Meal: **A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals**. J. Agric. Food Chem, v. 47, p. 1801-1812, 1999.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2005. Drug-resistant Salmonella. Fact Sheet Nº 139, Revised April 2005.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS,UFSC, p.577-614, 2004.