

Determinação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Hidroalcoólico da Planta *Plectranthus ornatus* Codd (Boldo Chinês)

Determination of the antimicrobial activity in the hydroalcoholic extract of the plant Plectranthus ornatus Codd (Bilberry Chinese)

Lauana Aparecida Santos¹, Juliana da Silva Menezes², Luciana Rosa Alves Rufino³, Nelma de Mello Silva Oliveira³, João Evangelista Fiorini³

DOI: 10.5935/2238-3182.20140136

RESUMO

A planta *Plectranthus ornatus* Codd é originária dos países do Mediterrâneo e Oriente Próximo. Na medicina popular é indicada para males do fígado e problemas de digestão. É utilizada no tratamento para o controle da gastrite, na dispepsia, azia, mal-estar gástrico e ressaca. Este trabalho objetiva a avaliação antimicrobiana do extrato de *P. ornatus*, utilizando-se 15 microrganismos padronizados. Os testes antimicrobianos foram realizados em ágar Mueller Hinton pela técnica de poços. Foram utilizados os testes de microdiluição em caldo, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e semeadura, em placas contendo ágar Mueller Hinton para a concentração microbicida mínima (CMM). Os testes de microdiluição em caldo demonstraram que o extrato nas concentrações de 20,31; 325 e 650 mg/mL inibiu o crescimento bacteriano de *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente. Para o fungo *Saccharomyces cerevisiae* os testes de microdiluição demonstraram inibição do crescimento na concentração de 1.300 mg/mL. Para as demais cepas testadas, o extrato não demonstrou atividade. Em decorrência da crescente resistência múltipla microbiana aos antibióticos, pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos que sejam economicamente viáveis e com margem de segurança efetiva têm ganhado espaço na comunidade científica.

Palavras-chave: Medicina Tradicional; Fitoterapia; *Peumus*; *Plectranthus*; Produtos com Ação Antimicrobiana; Anti-Infeciosos; Testes de Sensibilidade Microbiana.

ABSTRACT

Plectranthus ornatus Codd is a plant from Mediterranean and Near East countries. It is indicated for liver illnesses and digestion problems in popular medicine. It is used in the treatment for the control of gastritis, dyspepsia, heartburn, gastric discomfort, and hang-over. This study aims to evaluate the antimicrobial activity in extracts of *P. ornatus* using 15 standardized micro-organisms. Antimicrobial tests were performed on Mueller Hinton agar through the technique of wells. Broth microdilution tests were used for the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC), and seeding on plates containing Mueller Hinton agar for the determination of the minimum microbicide concentration (MMC). The broth microdilution tests demonstrated that the extract inhibited the growth of *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Enterococcus faecalis* at the concentrations of 20.31, 325, and 650 mg/mL, respectively. The microdilution tests showed growth inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* at a concentration of 1,300 mg/mL. The extract did not show inhibitory activity on the other tested strains. As a result of increased multiple resistances to antibiotics, microbial research in the development of new drugs that are economically viable and offer an effective safety margin have won space in the scientific community.

¹ Acadêmica do Curso de Biomedicina da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS. Alfenas, MG – Brasil.

² Mestranda em Ciência Animal na UNIFENAS. Alfenas, MG – Brasil.

³ Farmacêutico. Pós-Doutorado em Ciências (Microbiologia). Pesquisador Sênior. Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da UNIFENAS. Alfenas, MG – Brasil.

Recebido em: 26/02/2013
Aprovado em: 26/09/2014

Instituição:
Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS
Alfenas, MG – Brasil

Autor correspondente:
João Evangelista Fiorini
E-mail: microrganismo@unifenas.br

Key words: Medicine, Traditional; Plectranthus; Peumus; Phytotherapy Products with Antimicrobial Action; Anti-Infective Agents; Microbial Sensitivity Tests.

INTRODUÇÃO

O surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado têm sido relatados há décadas, incentivando a busca por novas fontes de substâncias com atividades antimicrobianas que sejam eficientes, como as plantas utilizadas na medicina popular.¹

O tratamento de doenças utilizando-se extratos vegetais consiste em método dos mais antigos da medicina natural. A origem desse conhecimento ainda é remota e acredita-se que grande parte foi adquirida pela observação do instinto humano e animal. Dessa maneira, o homem passou a distinguir plantas comestíveis, ou que poderiam tratar doenças, de plantas tóxicas. Esse conhecimento foi transmitido de geração para geração pelas comunidades que conviviam com ervas e dependiam delas para tratar doenças.²

O Brasil apresenta grande potencial para o desenvolvimento de estudos e de descobertas de plantas medicinais e de fármacos à base delas, pois cerca de 20% das 250 mil espécies medicinais catalogadas pela *United Nations Educational Scientific and Cultural Organization* (UNESCO) são nativos no território brasileiro, o que facilita o aproveitamento do seu potencial curativo para o tratamento de doenças no país.³ O ecossistema amazônico possui a maior biodiversidade do planeta, com inúmeras espécies vegetais com propriedades medicinais relatadas e outras em que seus efeitos terapêuticos ainda são desconhecidos.⁴

Os boldos pertencem ao grupo de espécies de plantas com propriedades colagogas. O boldo do Chile (*Peumus boldus* Molina) é conhecido como verdadeiro boldo.⁵ Brandão *et al.* registram, na primeira Farmacopeia Brasileira, de 1929, que a planta popularmente conhecida como boldo era o Boldo do Chile. A diferenciação e correta identificação das espécies é importante, pois o mesmo e o falso boldo (*Plectranthus barbatus* Ard.) possuem compostos que causam efeitos colaterais.⁶

A família *Lamiaceae* é originária principalmente de países do Mediterrâneo e Oriente e consiste de cerca de 200 gêneros e 3.200 espécies, destacando-se o gênero *Plectranthus*, com diversos representantes de uso terapêutico.⁷ As espécies de *Plectranthus* são ricas em diterpenos e são usadas na medicina popular em várias partes do mundo.^{8,9}

A planta *Plectranthus ornatus* Codd é popularmente conhecida como boldo chinês, boldo gambá, boldo miúdo ou boldo rasteiro⁵. Na medicina popular é indicada para males do fígado e problemas da digestão. Pode ser usada no tratamento de gastrite, dispepsia, azia e do mal-estar gástrico e seu sabor amargo é estimulante da digestão e do apetite.^{5,10}

As folhas contêm substâncias com atividades analgésicas, não apresentando efeito colateral. Foram observadas leve atividade sedativa, que pode se associar à ação analgésica, bem como bactericida e fungicida, ainda não especificadas pela literatura.⁵

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos espécimes: as folhas de *Plectranthus ornatus* foram coletadas no município de Alfenas, estado de Minas Gerais, Brasil, à beira da Rodovia MG – 179, km 0, em setembro de 2011 e identificadas pela equipe do Laboratório de Botânica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL). A exsicata do vegetal está armazenada no Herbário da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, sob o n° 320.

Obtenção do extrato: o extrato das folhas frescas de *Plectranthus ornatus* foi obtido utilizando-se, como agente extrator, álcool etílico a 70%, conforme técnica já descrita.^{11,12} Foram pesados 400 g das folhas da planta e colocados em 1.600 mL de álcool a 70%. Essa mistura foi macerada em balão volumétrico (2.000 mL) e armazenada à temperatura ambiente por 15 dias, ao abrigo da luz, sendo a seguir filtrada e mantida a 4°C em frasco âmbar estéril. Posteriormente, foi concentrada em evaporador rotatório e liofilizada. Na hora do uso, a mesma foi ressuspensa em água destilada estéril e passada em filtro Millipore® (0,22 µm).

Ação antimicrobiana: os ensaios de ação antimicrobiana foram realizados com bactérias e fungos padronizados (ATCC e NEWPROV): 1. Bactérias: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619), *Shigella flexneri* (NEWPROV 0122), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (NEWPROV 25923), *Streptococcus pyogenes* (NEWPROV 19615); e, 2. Fungos: *Candida albicans* (ATCC 1023-1) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601). As amostras de bactérias foram

mantidas em ágar BHI e os fungos em ágar Sabouraud, à temperatura de 4°C, até o momento dos testes.

Avaliação do perfil de sensibilidade: a atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Plectranthus ornatus* foi avaliada por meio do teste de difusão em ágar, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM), de acordo com os padrões do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2002).¹³⁻¹⁵ Foram utilizadas as concentrações de 1.300; 650; 325; 162,5; 81,25; 40,62; 20,31; 10,15; 5,07; 2,53 mg/mL. As determinações do perfil de sensibilidade foram realizadas de acordo com a metodologia de microdiluição em meio RPMI 1640 para leveduras, conforme protocolo M27A3 (CLSI, 2008)¹³, e microdiluição em caldo Mueller Hinton para bactérias, conforme protocolo M7A6 (CLSI, 2003)¹⁴. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A CIM foi determinada nos extratos que apresentaram atividade inibitória no teste de difusão em ágar (NCCLS, 2002)¹⁵, em microplacas, nas quais foram colocados 150 µL do caldo Mueller Hinton concentrado (2x) em todos os poços. No primeiro poço foi adicionado o extrato com concentração de 1.300 mg/mL e, a partir deste, foram preparadas diluições seriadas decrescentes. Foram inoculados nos poços 10 µL da suspensão microbiana com turvação equivalente ao tubo de 0,5 da Escala de MacFarland.

A CMM foi realizada nas concentrações do extrato que apresentaram inibição para o crescimento bacteriano. A confirmação da ação bacteriostática/bactericida e/ou fungistática/fungicida das diluições foi feita a partir do plaqueamento da diluição específica e das concentrações imediatamente superior e inferior no meio de cultura ágar Mueller Hinton. Após, as placas foram analisadas com observação da presença ou ausência de crescimento microbiano.

Estatística - para os ensaios de ação antimicrobiana foi adotada estatística descritiva.

RESULTADO

Na verificação da atividade antimicrobiana do extrato de *P. ornatus*, observou-se formação de halos de inibição entre 18 e 22 mm sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Streptococcus pyogenes* NEWPROV 19615 e sobre o crescimento do fungo *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601. Não houve formação de halos para os seguintes microrganismos: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus sterothermo-*

philus ATCC 7953, *Candida albicans* NEWPROV 0031, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13046, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619, *Staphylococcus aureus* NEWPROV 25923, *Streptococcus pyogenes* NEWPROV 19615, *Shigella flexineri* NEW PROV 0122, *Salmonella typhimurium* NEWPROV 14 028 (Tabela 1).

Tabela 1 - Halos de Inibição, Concentração Inibitória Mínima e Concentração Microbicida Mínima do extrato hidroalcoólico de *P. ornatus*

Microrganismos	Halos de Inibição (mm)	CIM* (mg/mL)	CMM** (mg/mL)
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	18	20,31	1300,0
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	-	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i> (ATCC 7953)	-	-	-
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13046)	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	22	20,31	1300,0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 25933)	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25619)	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)	29	1300,0	-
<i>Shigella flexineri</i> (NEWPROV 0122)	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> (NEWPROV 14028)	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> (NEWPROV 19615)	22	325,0	1300,0

Fonte: Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos, 2013.

Nota: *Concentração Inibitória Mínima (CIM).

**Concentração Microbicida Mínima (CMM).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos, no que diz respeito à CIM e à CMM, foram positivos para as cepas de *Bacillus cereus* (ATCC 11778) *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) na concentração de 20,31 mg/mL e *Streptococcus pyogenes* (NEWPROV 19615) na concentração de

325 mg/mL. Para o fungo *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) foi observada apenas a CIM de 1.300 mg/µL, a mesma para a CMM (Tabela 1).

Fernandes *et al.* verificaram que a atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais deve-se aos produtos do metabolismo secundário, como terpenoides e compostos fenólicos, sendo eles flavonoides e saponinas, que em sua forma pura também exibem ação antimicrobiana. A diferença dos achados de atividade antimicrobiana descritos sobre plantas pode estar relacionada à quantidade de cada princípio ativo presente nos extratos, uso de técnicas e procedimentos diferentes, bem como época do ano em que foi feita a colheita do material.¹⁶

Brasileiro *et al.* avaliaram a atividade antimicrobiana e citotóxica do extrato de *P. ornatus* e outras 31 espécies de empregando o método de difusão em ágar e o teste de letalidade de *Artemia*, constatando que, entre as cepas testadas, não houve inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, confirmando os resultados obtidos neste trabalho, demonstrando também que o extrato apresentou toxicidade às larvas de *Artemia salina* (DL50<1000 ppm).⁴

Nogueira *et al.* salientaram que cepas de *S. aureus* foram sensíveis na presença do extrato de *Plectranthus amboinicus*, tendo usados 10 isolados de *S. aureus*, oito de *Pseudomonas aeruginosa*, quatro de *Candida albicans* e quatro de *Candida krusei*, isolados de otite externa aguda. A *Pseudomonas aeruginosa* foi resistente aos extratos de plantas testados.¹⁷

Lopes e Almeida¹⁸ também avaliaram a atividade antibacteriana do extrato da fruta de *Morinda citrifolia* L. sobre as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, demonstrando que o seu extrato não inibiu o seu crescimento.

Pinho *et al.*¹⁹ realizaram estudo sobre atividade antimicrobiana utilizando os extratos das plantas aroeira, barbatimão e erva baleeira em ensaios de difusão em ágar sobre as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Apuraram que os extratos das plantas em estudo inibiram o crescimento somente de *S. aureus*, mas não de *E. coli*.

Os extratos alcoólicos de própolis, com concentração de 11 e 20%, são capazes de inibir o crescimento de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*.²⁰

Silva *et al.* investigaram a atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato de *Mimosa caesalpinifolia* Benth nas cepas de *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilo-*

sis, *Candida tropicalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, utilizando a técnica de difusão em ágar. Constataram que o extrato exibiu atividade inibitória de crescimento para todos os microrganismos testados.²¹

Lopes *et al.*²² analisaram a atividade antimicrobiana do extrato seco de insulina e óleo de copaíba em cepas bacterianas e fúngicas (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*). Verificaram que o óleo de copaíba inibiu o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* e *E. faecalis*, sendo os demais microrganismos, resistentes. A CIM para os microrganismos sensíveis variou de 6,05 a 30,25 mg/mL, com CMM de 18,15 mg/mL para *E. faecalis*. O extrato de insulina não demonstrou ação antimicrobiana.²²⁻²⁸

Os extratos de orégano, tomilho, lipia, gengibre, sálvia, alecrim e manjerição foram estudados por Pozzo *et al.*²⁹ Os ensaios de ação antimicrobiana sobre 32 cepas de *S. aureus* isolados de mastite bovina demonstraram ação inibitória em todos os microrganismos testados.²⁹

A investigação da atividade antimicrobiana e antioxidante da planta *Ziziphus joazeiro*, conhecida como juazeiro ou laranjeira do vaqueiro, utilizando-se a técnica de difusão em ágar e CIM, evidenciou que o extrato das folhas e cascas possuía atividade antioxidante e antimicrobiana em 70% das cepas analisadas, destacando-se *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes*. O extrato das folhas mostrou CIM entre 0,25 e 0,5 mg/mL contra *Micrococcus luteus* e entre 0,125-0,250 mg/mL contra *Mycobacterium smegmatis*, enquanto o extrato da casca apresentou CIM entre 0,5 e 1,0 mg/mL para *M. smegmatis*.²⁴

Estudos fitoquímicos possibilitaram o isolamento de diterpenos do gênero *Plectranthus*, sendo a ornanatina A, barbatusina, labdano e forskolina os princípios ativos do gênero *Plectranthus* SP. Identificaram-se também alquiflenois e flavonoides.^{25,26} Esses princípios ativos poderiam estar relacionados à ação antimicrobiana observada nos resultados aqui descritos.

Devido à grande variedade da composição química de plantas, estudos realizados detectaram flavonoides, com várias ações farmacológicas, destacando-se a ação anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral, antimicrobiana e principalmente antifúngica.^{1,4,21,26-29} Neste estudo, registrou-se a atividade antifúngica do produto avaliado em diversas concentrações, obten-

do-se a inibição do fungo *Saccharomyces cerevisiae* em presença do extrato de *P. ornatus*. No entanto, não houve inibição de *Candida albicans*, pressupondo-se a interferência de vários fatores.

Os flavonoides e taninos têm a habilidade de inativar enzimas e complexarem-se com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias, configurando os prováveis mecanismos de ação antimicrobiana. A total ruptura de membranas microbianas pode ser dada por flavonoides de caráter lipofílico.^{14,21} Sendo assim, é possível que esses compostos estejam presentes no extrato de *P. ornatus*, sendo responsáveis por sua atividade antimicrobiana.

Em estudos de atividade antimicrobiana *in vitro* utilizando extratos brutos de plantas, o potencial antimicrobiano muitas vezes não está relacionado a um único princípio ativo. Portanto, o processo de isolamento de substâncias ativas que estejam presentes nos extratos em estudo pode inviabilizar o uso da planta como fitoterápico, pois sua ação está ligada à associação de vários princípios ativos e não a um único que esteja presente.³⁰

CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico das folhas de *P. ornatus* apresentou CIM de 20,31 mg/mL a 1.300 mg/mL, variando com a espécie testada. A CMM foi constatada em três entre as quatro cepas bacterianas que apresentaram halos de inibição. Este estudo reafirma a importância de investigações etnofarmacológicas na seleção de plantas com indicação terapêutica.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

REFERÊNCIAS

1. Mendes LPM, Maciel KM, Vieira ABR, Mendonça LCV, Silva RMF, Rolim-Neto PJ, et al. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2011; 32(1):121-5.
2. A cura está na natureza: medicina natural. São Paulo: Brasil; 2000. 544 p.
3. Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2004; 4(1):33-8.
4. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. Rev Bras Ciênc Farm. 2006 abr./jun; 42(2):195-202. [Citado em 2013 jan. 20]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000200004&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000200004>.
5. Mauro C, Silva CP, Missima J, Ohnuki T, Rinaldi RB, Frota M. Estudo anatômico comparado de órgãos vegetativos de boldo miúdo, *Plectranthus ornatus* Codd. e malvariço, *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. – Lamiaceae. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(4):608-13.
6. Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. Rev Bras Farmacogn. 2006; 16:408-20.
7. Duarte MR, Lopes JF. Morfoanatomia foliar e caulinar de *Leonurus sibiricus*, Lamiaceae, Rev Acta Farm Bonaerense. 2005; 24(1):68-74. [Citado em 2013 jan. 20]. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6711>
8. Albuquerque RL, Machado MIL, Silva MG, Morais SM, Matos FJA, Lima LB. Novo diterpeno isolado das folhas de *Plectranthus ornatus*. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo: SBQ; maio de 2003.
9. Albuquerque RL, Machado MIL, Silva MG, Morais SM, Matos FJA, Lima LB. Estudo químico e atividade do óleo essencial de *Plectranthus grandis* Will e *Plectranthus ornatus* Codd. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. São Paulo: SBQ; maio de 2003.
10. Codd LE. Flora of Southern Africa: Botanical Research Institute, Department of Agriculture and Water Supply. Pretoria. 1985; 28(Part 4):137-51.
11. Carceres A, Menéndez H, Médez E. Antigonorrhoel activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. J Ethnopharmacol. 1995; 48(2):85-8.
12. Farmacopeia Brasileira. 5ª ed., São Paulo: Atheneu; 2010. v. 1-2.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 3rd ed., M27-A3. Wayne, PA: CLSI; 2008.
14. (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 6th ed. M7-A6. Wayne, PA: CLSI; 2003.
15. (NCCLS) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Padrões de desempenho para teste de susceptibilidade antimicrobiana: padrão M2-A6 aprovado. 6th ed. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
16. Fernandes AP, Ribeiro GE, Rufino LRA, Silva LM, Boriollo MFG, Oliveira NMS, et al. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese "in vivo", e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular "in vitro". Rev Med Minas Gerais. 2011; 21(3):272-9.
17. Nogueira JCR, Diniz MFM, Lima EO. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais em otite externa aguda. Rev Bras Otorrinolaringol. 2008; 74(1):118-24.

18. Lopes LC, Almeida JVP. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da fruta *Morinda citrifolia* L. (NONI) em cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Rev Hig Ali. 2011; 25: 162-8.
19. Pinho L, Souza PNS, Sobrinho EM, Almeida AC, Martins ER. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. Rev Ciência Rural. 2012; 42(2):326-31.
20. José TDS, Assunção R, Oliveira NMS, Fiorini JE. Análise da atividade antimicrobiana com diferentes extratos de própolis. In: I Congresso de Biomedicina. Alfenas, Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS); 2008.
21. Silva MJD, Endo LH, Dias ALT, Silva GA, Santos MH, Silva MA. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinifolia* Benth. (Mimosaceae). Rev Ciên Farm Básica Apl. 2012; 33(2):267-74.
22. Lopes KC, Pereira MA, Nascimento LC, Fiorini JE. Avaliação da atividade antimicrobiana e ação de *Cissus sicyonoides* e *Copaifera langsdorffii* na diferenciação de sistemas eucarióticos unicelulares. In: Seminário de Iniciação Científica. Alfenas: Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS); 2006.
23. Pozzo MD, Santurio DF, Rossatto AC, Vargas SH, Alves ES, Loreto JV. Activity of essential oils from spices *Staphylococcus* spp. Isolated from bovine mastitis. Arq Bras Med Vet Zootec. 2011; 63(5):1229-32.
24. Silva TCL, Almeida CCB, Veras Filho J, Peixoto Sobrinho TJS, Amorim ELC, Costa EP, et al. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. Rev Ciên Farm Básica Apl. 2011; 32(2):193-9.
25. Oliveira ACP, Endringer DC, Amorim LAS, Brandão MGL, Coelho MM. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. J Ethnopharmacol. 2005; 16:465-9.
26. Wannmacher L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? Bol Saúde. 2002; 23(12):1127-41.
27. Bruneton J. Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants. 2nd ed. Paris: Lavoisier; 1999. 1119 p.
28. Dotto SR, Travassos RMC, Ferreira R, Santos R, Wagner M. Avaliação da ação antimicrobiana de medicações usadas em endodontia. Rev Odonto Ciência. 2006; 21(5):266-9.
29. Oliveira PM, Ferreira AA, Silveira D, Alves RB, Rodrigues GV, Emerenciano VP, et al. Diterpenoids from the Aerial Parts of *Plectranthus ornatus*. J Nat Prod. 2005; 68(4): 588-91.
30. Andrade JS, Fiorini JE. Atividade Antimicrobiana "in vitro", ação cicatrizante e anti-inflamatória "in vivo" do extrato de *Luffa opercolata* [tese]. Alfenas: Universidade José do Rosário Vellano; 2009. p. 58-65.