

UNIVERSIDADE PAULISTA

**TRIAGEM DE EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS
BRASILEIRAS CONTRA *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

JOSÉ RODRIGO DE ARRUDA

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE PAULISTA

**TRIAGEM DE EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS
BRASILEIRAS CONTRA *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini

JOSÉ RODRIGO DE ARRUDA

SÃO PAULO

2023

Arruda, José Rodrigo de.

Triagem de extratos vegetais de plantas brasileiras contra
Listeria monocytogenes / José Rodrigo de Arruda. - 2023.
89 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da
Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Ecotoxicologia e Inovações Terapêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini.

1. Listeriose. 2. Microdifusão em ágar. 3. Microdiluição em caldo.
4. Bioautografia. 5. *Artemia franciscana*. 6. Toxicidade. I. Suffredini,
Ivana Barbosa (orientadora). II. Título.

UNIVERSIDADE PAULISTA

**TRIAGEM DE EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS
BRASILEIRAS CONTRA *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/_____
Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/_____
Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/_____
Prof. Dr. Edson Roberto da Silva
Universidade de São Paulo – USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e ao Universo, onde no meu modo de ver a vida, tudo se inicia coma crença e a vontade de querer alcançar algo, o pensamento e a ação nos levam longe.

Às minhas irmãs e irmãos, que embora estejam longe, estão sempre comigo em pensamentos e sempre me impulsionaram para que eu fizesse tudo do meu jeito e no meu momento. À grandeza e ternura da minha querida mãe, que mesmo não estando mais na terra, conseguiu plantar a semente da justiça e da caridade em meu coração, enfatizando a necessidade de ter empatia pelo próximo. Aos poucos amigos, que me apoiam nesta jornada, Cezar Salvino, Ana Paula Martins, Tcharnia Gomes, Tacilmário Mariano.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini, que me ensina continuamente a correr atrás, mesmo quando eu achava que não haveria mais tempo...obrigado pela escolha, pela paciência, pela dedicação, pelo empenho, que faz com que eu consiga me tornar uma pessoa melhor, um profissional melhor.

Agradeço aos técnicos, profissionais e professores do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade da UNIP, em especial ao Sérgio, à Karen e à Lucielda, por estarem sempre dispostos a me receber e a desempenhar as atividades no laboratório de forma tão ímpar, tão produtiva.

Aos professores da Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da UNIP, obrigado pelas aulas, pelas disciplinas, pelo conhecimento adquirido, especialmente à Prof.^a Dr.^a Maria Anete Lallo, pelas aulas e conversas colaborativas.

Aos alunos da Pós-Graduação, pela troca de conhecimentos.

Ao CAPES/CNPq, pela bolsa, sem a mesma, não teria conseguido chegar até aqui.

EPÍGRAFE

“...Mas os livros que em nossa vida entraram
São como a radiação de um corpo negro
Apontando pra a expansão do Universo
Porque a frase, o conceito, o enredo, o verso
(E, sem dúvida, sobretudo o verso)
É o que pode lançar mundos no mundo...”

Caetano Veloso, Livros, 1997.

RESUMO

Listeria monocytogenes, bactéria Gram-positiva, patogênica, com distribuição ubiquitária, oportunista, que causa listeriose, com prevalência em animais e em humanos (zoonose). O objetivo deste trabalho foi identificar extratos vegetais ativos contra a bactéria. Assim, 2.280 extratos vegetais, oriundos de plantas da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica, foram testados contra *L. monocytogenes* no modelo da disco difusão em ágar, tendo resultado em 12 extratos ativos (0,53%), identificados como N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N1489,

N2161 e N2186. Para os 12 extratos foram obtidas as concentrações inibitórias mínimas e foi verificada a atividade biológica em modelos de bioautografia, além de testes de atividade antioxidante (DPPH e β -caroteno), de quantificação de compostos fenólicos totais (teste de Folin-Ciocalteu) e verificação de toxicidade a *Artemia franciscana*. A partir dos resultados obtidos foi feito um ranqueamento para se obter os extratos ordenados do mais ativo ao menos ativo, conforme se apresentou N1305, N2186, N272, N1259, N271, N432, N1005, N1395, N1489, N2161, N275 e N1251. Esses 12 extratos pertencem às famílias Annonaceae, Caesalpinioideae, Clusiaceae (ou Calophyllaceae), Flacourtiaceae (ou Salicaceae), Piperaceae, Rubiaceae e Simaroubaceae, e apresentam potencial como fonte de novos antibacterianos.

Palavras-chave: listeriose; disco difusão em ágar; microdiluição em caldo, bioautografia; *Artemia franciscana*; toxicidade.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes, is a Gram-positive, pathogenic bacterium, with ubiquitous distribution, opportunistic, which causes listeriosis, with prevalence in animals and humans (zoonosis). The aim of the present work was to identify plant extracts active against the bacteria. So, 2,280 extracts obtained from Amazon Rainforest and Atlantic Forest plants were tested against *L. monocytogenes* in the agar diffusion disc assay, resulting in 12 active natural extracts (0.53%), identified as N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N1489, N2161, and N2186. The minimum inhibitory concentrations were obtained for the active extracts, the biological activity was verified in bioautography assay, in addition to tests of antioxidant activity (DPPH and β -carotene) and quantification of total phenolic compounds (Folin-Ciocalteu assay), and verification of toxicity with *Artemia franciscana* test. From the results obtained, a ranking was made to obtain the ordered natural extracts from the most active to the least active, as presented: N2186, N1305, N272, N1259, N432, N1005, N1395, N1489, N271, N275, and N2161. These 12 natural extracts belong to the families Annonaceae, Caesalpinioideae, Clusiaceae (or Calophyllaceae), Flacourtiaceae (or Salicaceae), Piperaceae, Rubiaceae and Simaroubaceae, and have the potential as a source of new antibacterials.

Keywords: listeriosis; agar diffusion disc assay; microdilution broth assay; bioautography assay; *Artemia franciscana*; toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1**- Placa de Petri com colônias de *Listeria monocytogenes* em meio ágar Oxford Listeria 25
- Figura 2** - Placas com o meio ágar Oxford Listeria onde foram aplicados disco de difusão estéreis, na sequência houve a aplicação dos extratos, para a verificação da formação dos halos de inibição 26
- Figura 3** - Teste da microdiluição em caldo feito em microplacas de 96 poços com fundo em U contendo meio inoculado com *L. monocytogenes* e com os extratos vegetais identificados. A placa com escrita vermelha apresenta os extratos vegetais N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1289 e N1305. A placa com escrita azul apresenta os extratos vegetais N1395, N1489, N2161, N2186 e o gluconato de clorexidina a 0,05% sendo testados. Controle negativo - meio de cultura estéril. 28
- Figura 4** - Microplacas de 96 poços, com o meio de cultura inoculado e com os extratos vegetais, após 24h de incubação 29
- Figura 5** - Delineamento experimental para o projeto de prospecção de atividade biológica de extratos vegetais contra *Listeria monocytogenes*..... 35
- Figura 6** - Análise do experimento 1 feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, n=6, N=66. Teste de Kruskal-Wallis e teste posterior de Dunn's mostraram as diferenças entre os grupos, significância se $p < 0,05$. (*)= $p < 0,05$; (**)= $p < 0,01$ e (***)= $p < 0,001$ 38
- Figura 7**- Análise do experimento 2 feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, n=6, N=60. Análise de variância do tipo ANOVA de um fator e teste posterior de Tukey mostraram as semelhanças ou diferenças entre os grupos, significância se $p < 0,05$. (A) $p = 0,5819$; (B) $p = 0,9904$ 40
- Figura 8** - Análise do experimento feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, n=30, N=270. O teste de Kruskal-Wallis e o posterior de Dunn's mostraram as diferenças entre os grupos, significância se $p < 0,05$. A= $P > 0,05$; B= $p < 0,05$; C= $p < 0,001$ e D= $p < 0,0001$ 42
- Figura 9** - Análise do experimento feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, n=6, N=75. Análise de variância do tipo ANOVA de dois fatores e teste posterior de Tukey comparando os resultados dos tratamentos entre si, que mostraram as semelhanças ou diferenças entre os grupos, significância se $p < 0,05$ 44
- Figura 10**. Placas de sílica com a análise da difusão em bioautografia (DeB), realizada em triplicata com os 12 extratos. Verificou-se a formação de halos de inibição nos extratos N271, N275, N1005, N1251, N1305, N1395 e N2186. O

experimento tomou como padrão o gluconato de clorexidina 1% (CHX 1%).
..... 47

Figura 11. Análise do experimento feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, n=7, N=42. Análise de variância do tipo ANOVA de dois fatores e teste posterior de Tukey comparando os resultados dos tratamentos entre si, que mostraram as semelhanças ou diferenças entre os grupos, significância se $p < 0,05$ 48

Figura 12. Cromatogramas obtidos da análise de dois extratos vegetais, no modelo da bioautografia unidimensional. Halo de inibição observado em 11 dos 12 extratos analisados 50

Figura 13. Cromatogramas obtidos a partir da análise de um extrato vegetal por placa, na técnica de bioautografia bidimensional. Halos de inibição de crescimento bacteriano nos extratos N271, N272, N1005, N1251, N1259 e N1395..... 51

Figura 14. Cromatograma com os 12 extratos vegetais ativos e a clorexidina a 1%, após a aplicação do reativo de Kedde (ácido 35), para determinação de presença de glicosídeos cardioativos, a partir da observação do aparecimento de coloração azul-violeta sob luz visível. Na placa abaixo, não foi observado a coloração azul-violeta.....52

Figura 15. Cromatograma com a visualização da corrida sob luz U.V. com comprimento de onda de 254 nm. Foram observadas a presença de manchas azuladas, indicativas de compostos fenólicos, em algumas amostras 53

Figura 16. Cromatograma após a aplicação do reativo H_2SO_4 a 20%, com posterior aquecimento a $105^\circ C$, com a visualização da corrida no visível. 53

Figura 17. Cromatograma com visualização sob luz U.V. com comprimento de onda de 365 nm. as manchas azuladas sugerem a presença de ácidos fenólicos na linha de frente. As manchas avermelhadas são clorofila..... 54

Figura 18. Cromatograma após a aplicação do reagente de Dragendorff. Nota-se a presença de manchas de cor laranja no ponto de aplicação das amostras, indicativos de alcaloides. Observação da corrida sob luz visível. 55

Figura 19. Cromatograma após a aplicação do reativo KOH 5%, observado sob luz visível, os extratos N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1259, N1395 apresentaram manchas amareladas, indicativo da presença de antraquinonas.
.....56

Figura 20. Cromatograma após a aplicação do reativo KOH 5%, com visualização da corrida sob luz U.V. de comprimento de onda de 365 nm, manchas azuladas indicando a presença de cumarina. Apenas o extrato N1005 a presença de antranas, e os extratos N271, N275, N1251, N1395 apresentaram manchas avermelhadas, características de antraquinonas 56

Figura 21. Cromatograma com visualização da corrida sob luz U.V. com comprimento de onda de 254 nm. Os extratos N271, N275, N1251, N1259 e N1395, apresentaram manchas verdes indicativas da presença de compostos fenólicos 57

Figura 22. Cromatograma com visualização da corrida sob luz U.V. com comprimento de onda de 356 nm. Manchas roxas, verdes e laranjas indicam a presença de compostos fenólicos, logo os extratos N271, N272, N1005, N1259, N1305, N1489 e N2161 apresentam espectro de cor para compostos fenólicos 57

Figura 23. Cromatograma com visualização da corrida sob luz visível, notam-se manchas amareladas na corrida dos extratos N271, N272, N275, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N2161 e N2186 representando atividade antioxidante 58

Figura 24. Cromatograma com aplicação da solução com β -caroteno, notam-se manchas alaranjadas na corrida de alguns extratos. Os extratos N271, N272, N275 e N1005 apresentaram atividade antioxidante..... 59

Figura 25. Curvas padrão do Trolox e de Rutina para cálculo da quantidade de compostos fenólicos totais no teste de Folin-Ciocalteu 62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Relação das espécies cujos extratos vegetais apresentaram atividade contra *Listeria monocytogenes* a partir da triagem em grande escala feita com o modelo da disco difusão em ágar..... 37
- Tabela 2 -** Medidas dos diâmetros dos halos de inibição em disco difusão em ágar dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, a partir da análise no modelo da disco-difusão em ágar. Medidas dadas em milímetros 39
- Tabela 3 -** Medidas dos diâmetros dos halos de inibição em disco difusão em ágar dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, a partir da análise no modelo da disco-difusão em ágar. Medidas dadas em milímetros..... 41
- Tabela 4 -** Medidas dos diâmetros dos halos de inibição em disco difusão em ágar dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, com n obtido após cálculo de tamanho da amostra com base nos experimentos 1 e 2 anteriores. Medidas dadas em milímetros..... 43
- Tabela 5 -** Medidas dos diâmetros dos halos de inibição em disco difusão em ágar dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, a partir da análise no modelo da disco-difusão em ágar testado em três concentrações bacterianas diferentes. Medidas dadas em milímetros.45
- Tabela 6.** Concentrações bactericidas mínimas (CBM) para os extratos vegetais ativos contra *Listeria monocytogenes* obtidas pelo método da microdiluição em caldo (MDC). 46
- Tabela 7.** Medidas dos diâmetros dos halos de inibição obtidos do experimento de difusão em bioautografia dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*. Medidas dadas em milímetros.49
- Tabela 8.** Valores de Rf calculados para cada cromatograma obtido com reveladores específicos para prospecção de classes químicas presentes nos extratos vegetais antibacterianos. 60
- Tabela 9.** Quantidades e concentrações de trolox e rutina utilizados para determinação da equação da reta obtida, para validação do ensaio de Folin-Ciocalteu 62
- Tabela 10.** Escores relacionados à performance dos extratos vegetais após serem testados nos vários experimentos.63

Tabela 11. Resultados da concentração efetiva 50% dos extratos ativos no modelo da *Artemia franciscana*, obtidos por análise de Probit de Finney; dados em mg/mL 65

Tabela 12. Escores relacionados à performance dos extratos vegetais após serem testados nos vários experimentos 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

°C: grau Celsius

µg/mL: microgramas por mililitros

µg: microgramas

a.C.: antes de Cristo

AMP: ampicilina

APA: Área de Proteção Ambiental

ATCC®: American Type Culture Collection

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CHX: clorexidina

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CNS: Conselho Nacional de Saúde

CLO: cloranfenicol

DDA: disco difusão em ágar

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DVA: Doença veiculada por alimento

EST: estreptomicina

FC: Folin-Ciocalteu

FDA: Food and Drug Administration

GEN: gentamicina

h: horas

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

L: Listeria

L: litro

MDC: microdiluição em caldo

mg/mL: miligramas por mililitro

mg: miligramas

MTT: 3-(4,5-di metiltiazol-2-il) -2,5-di fenil tetrazólio brometo

N: número total de amostras

n: número de amostras por grupo

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

NPBio: Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade

p: significância estatística

pH: potencial hidrogeniônico

PVHA: Pessoas vivendo com HIV/AIDS

RU: rutina

TET: tetraciclina

TR: trolox

UFC/mL: Unidade Formadora de Colônias por mililitros

UNIP: Universidade Paulista

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivos gerais	20
2.2	Objetivos específicos	20
3.	JUSTIFICATIVA	21
4.	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	Coleta de plantas – feito previamente	21
4.2	Obtenção dos extratos – feito previamente	22
4.3	Preparo dos extratos para as análises	23
4.4	Difusão em ágar	24
4.4.1	Preparação da suspensão bacteriana para preparo do inóculo.....	24
4.4.2	Execução da técnica de disco-difusão em ágar para a realização da triagem e da verificação do diâmetro do halo de inibição.....	25
4.5	Microdiluição em caldo	27
4.6	Bioautografia	29
4.6.1	Difusão em bioautografia.....	29
4.6.2	Bioautografia unidimensional.....	30
4.6.3	Bioautografia bidimensional.....	30
4.7	Toxicidade a artêmia	31
4.7.1	Cultivo das artêmias	31
4.7.2	Ensaio de toxicidade a artêmia.....	32
4.8	Cromatografia de camada delgada com os extratos vegetais ativos	32
4.9	Ensaio relacionados à atividade sequestradora de radicais livres e atividade antioxidante dos extratos vegetais antibacterianos	33
4.9.1	Teste do DPPH em autografia.....	33
4.9.2	Ensaio do β -caroteno em autografia	33
4.10	Teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu	34
4.11	Delineamento experimental	34

4.12	Análises estatísticas.....	35
5.	RESULTADOS	37
5.1	Triagem dos extratos vegetais ativos a partir do modelo da disco difusão em ágar.....	37
5.2	Testes de sensibilidade.....	38
5.2.1	Diâmetros dos halos de inibição dos extratos vegetais ativos a partir do modelo da disco difusão em ágar.....	38
5.2.1.1	Obtenção do diâmetro do halo de inibição dos extratos vegetais ativos a partir do modelo da disco difusão em ágar, em triplicata – experimento piloto 1.....	38
5.2.1.2	Obtenção do diâmetro do halo de inibição dos extratos vegetais ativos a partir do modelo da disco difusão em ágar, em triplicata – experimento piloto 2.....	40
5.2.1.3	Ensaio da disco difusão em ágar em experimento com tamanho amostral adequado segundo cálculo de tamanho da amostra para obtenção do diâmetro do halo de inibição.....	42
5.2.1.4	Experimento com variação na concentração da suspensão bacteriana para obtenção do diâmetro do halo de inibição.....	43
5.2.2	Obtenção das concentrações bactericidas mínimas a partir do ensaio da microdiluição em caldo	45
5.3	Resultados dos experimentos em bioautografia.....	46
5.3.1	Difusão em bioautografia – DeB	46
5.3.2	Bioautografia unidimensional.	49
5.3.3	Bioautografia bidimensional.	50
5.4	Análise dos cromatogramas após a aplicação de reveladores na cromatografia de camada delgada.....	52
5.4.1	Reativo de Kedde (ácido 3,5).	52
5.4.2	Reativo H ₂ SO ₄ a 20%.	52
5.4.3	Reativo de Dragendorff.	54

5.4.4	Reativo KOH 5%	55
5.4.5	Reativo NP	56
5.4.6	Reativo DPPH.....	58
5.4.7	Reativo β -caroteno	58
5.4.8	Resultados dos cálculos de Rf (fator de retenção) dos extratos, após a corrida e aplicação dos reveladores nos cromatogramas	59
5.5	Análise dos ensaios relacionados à atividade sequestradora de radicais livres e atividade antioxidante dos extratos vegetais antibacterianos.....	60
5.5.1	Resultado do teste do DPPH em autografia	60
5.5.2	Resultado do ensaio de β -caroteno em autografia.....	61
5.6	Resultados do teste de Folin-Ciocalteu	61
5.7	Resultado do teste da toxicidade à <i>Artemia franciscana</i>.....	63
5.8	Ranqueamento dos extratos segundo os experimentos realizados.....	66
6	DISCUSSÃO	67
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
8	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE.....	88

1. INTRODUÇÃO

A bactéria *Listeria monocytogenes* foi identificada em 1926 por Murray, e foi relacionada à morte súbita incomum causada em coelhos de laboratório no Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge. Devido à sua característica marcante de causar leucocitose mononuclear em coelhos, o microrganismo foi outrora denominado *Bacterium monocytogenes*. Em 1927, na África do Sul, Pirie descobriu um microrganismo presente em animais conhecidos como “gerbos” (*Meriones unguiculatus*), que até então era responsável pela “Doença do Rio Tigre” (mais tarde conhecida como listeriose) e nominou o microrganismo de *Listerella hepatolytica*, batizado em homenagem a Lord Lister. Ambas as cepas descobertas por Pirie e Murray foram consideradas semelhantes pela *National Type Collection*, do *Lister Institute*, em Londres, e receberam o nome de *Listeria monocytogenes* (LETCHUMANAN *et al.*, 2018).

A bactéria *L. monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo, intracelular facultativo, responsável pela doença chamada listeriose, uma infecção rara, porém grave, transmitida por alimentos previamente contaminados (BARANCELLI *et al.*, 2011; NARAVANAN, 2013; FERREIRA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016; JORDAN, MCAULIFFE, 2018). A infecção acomete principalmente idosos, gestantes, crianças (incluindo recém-nascidos), pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA), diabéticos e pacientes com enfermidades autoimunes (CNS, 2017). A infecção pode causar um quadro de gastroenterite autolimitada, bacteremia e infecção do sistema nervoso central (neurolisteriose). A *L. monocytogenes* pode cruzar de forma ativa a barreira intestinal, disseminar-se através da corrente sanguínea e eventualmente atravessar a barreira placentária, levando à infecção placentária fetal (CHARLIER, *et al.*, 2020).

No Brasil, a listeriose é provavelmente subdiagnosticada e subnotificada, pois não existem dados a respeito da ocorrência da doença em relatórios oficiais (BRASIL, 2017).

Em ruminantes, essa doença causa encefalite ou romboencefalite, abortos no último período de gestação, septicemia, mastite e ceratoconjuntivite ou uveíte (ROCHA, 2013; WALLAND *et al.*, 2015; PAGLIANO *et al.*, 2016).

Ruminantes saudáveis podem também ser portadores de *L. monocytogenes* em seu trato gastrointestinal e são, portanto, considerados reservatórios deste patógeno. Estes animais contaminam o ambiente onde vivem (CARDENA-ALVAREZ *et al.*, 2022).

Tratamentos térmicos e controle de temperatura são estratégias que têm sido aplicadas na produção de alimentos para prevenir ou limitar a contaminação e o crescimento de patógenos transportados por alimentos, a exemplo da *L. monocytogenes*. Entretanto, a eficácia dos tratamentos térmicos contra esta espécie é limitada pela capacidade intrínseca deste patógenos de sobreviver e se replicar ativamente em temperaturas entre -0,4 °C e 45 °C, capacidade de multiplicação em um amplo intervalo de pH (4,6 – 9,6), sendo desta forma, conhecida como bactéria psicotrófica, apresentando tolerância de concentrações salinas de até 10% (COLE *et al.*, 1990; SCHUCHAT *et al.*, 1991; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; FREITAG *et al.*, 2009; NARAVANAN, 2013; STEA *et al.*, 2015; RADOSHEVICH, COSSART, 2017; BUCUR *et al.*, 2018;).

Alimentos prontos para consumo, incluindo carnes, peixes e laticínios, representam o principal veículo para casos esporádicos, ou até mesmo surtos de listeriose. *L. monocytogenes* de sorotipo 4b, de sequência tipo 6 (ST6) foi descoberta desde 1990 como um clone hipervirulento e representa uma ameaça para a saúde do consumidor, uma vez que está associada a quadros de meningite (CHERIFI, *et al.*, 2020; NÜESCH-INDERBINEN *et al.*, 2021)

A capacidade de contaminação de produtos animais e vegetais pela *L. monocytogenes* ocorre também, por esta apresentar a capacidade de aderência e formação de biofilme em superfícies como vidro, poliestireno, polipropileno e aço inoxidável, o que ocasiona sua permanência por longo tempo em indústrias de processamento de alimentos (BONSOGLIA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2017; JORDAN, MCAULIFFE, 2018).

Atualmente o gênero *Listeria* spp. apresenta as seguintes espécies, classificadas de acordo com suas características bioquímicas: *L. monocytogenes* (PIRIE, 1940), *L. grayi* (LARSEN & SEELIGER, 1966), *L. innocua* (SEELIGER, 1981), *L. welshimeri*, *L. seeligeri* (ROCOURT & GRIMONT, 1983), *L. ivanovii* (SEELIGER *et al.*, 1984), *L. marthii* (GRAVES *et al.*, 2010), *L. rocourtiae* (LECLERCQ *et al.*, 2010), *L. fleischmannii* (BERTSCH *et al.*, 2013), *L. weihenstephanensis* (HALTER *et al.*, 2013), *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L.*

cornellensis, *L. riparia*, *L. grandensis* (DEN BAKKER *et al.*, 2014), *L. booriae* e *L. newyorkensis* (WELLER, 2015).

Apenas duas espécies do gênero *Listeria* são consideradas de importância clínica, ou seja, que estão envolvidas no desencadeamento de enfermidade para o homem e outras espécies animais. Uma dessas espécies é a *L. monocytogenes*, identificada em grandes surtos oriundos da ingestão de alimentos contaminados como sendo a principal responsável; e a *L. ivanovii*, com importância na epidemiologia veterinária, ligada a infecção em ruminantes (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; BATZ *et al.*, 2005; LECLERCQ *et al.*, 2010; PAINTER *et al.*, 2013).

Devido à gama de locais nos quais os microrganismos do gênero *Listeria* podem ser encontrados, inclusive nas várias etapas da cadeia de produção dos alimentos de origem animal, cuja transmissão do patógeno pode se dar pela mão do trabalhador, a contaminação alimentar por esses patógenos é frequente e se torna um problema de saúde pública. Uma vez que conseguem resistir às condições de armazenamento usuais nos mercados, podendo provocar as infecções alimentares já citadas (BREED *et al.*, 1948; NILSSON *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2013; WALLAND *et al.*, 2015; PAGLIANO *et al.*, 2016).

A utilização de plantas medicinais é registrada desde os tempos de Hipócrates (460 a.C.). As propriedades terapêuticas das plantas de uso popular já eram conhecidas pelos povos primitivos em regiões onde hoje se localizam a China, a Índia e o Egito. Na atualidade, o uso de plantas medicinais continua a ser difundido, particularmente em regiões onde o acesso a medicamentos produzidos pelas indústrias é limitado, ou até mesmo inexistente, como em alguns países da África, América Latina e Ásia. A realização de estudos sistemáticos com extratos vegetais e animais têm demonstrado a possibilidade da descoberta de novos compostos, e através destes, o desenvolvimento de novos medicamentos, como ocorreu com alguns quimioterápicos antitumorais (paclitaxel, vincristina, vimblastina, podofilotoxina) e antibacterianos (penicilina, eritromicina – isolados de microrganismos) (SUFFREDINI *et al.*, 2002a; SUFFREDINI *et al.*; 2002b; YOUNES *et al.*, 2007).

A contribuição do reino vegetal para a humanidade é imensurável. Um dos maiores benefícios deste reino para o homem está no uso de plantas como

fontes terapêuticas, praticado por diversas civilizações a milênios. A droga vegetal utilizada de plantas, oriundas de suas partes processadas (folhas, frutos, raízes, casca, caule), serve como fonte de estudos para a obtenção de extratos que podem apresentar potencial interesse terapêutico. Com a evolução das técnicas de análise fitoquímica, observa-se que os produtos naturais e seus metabólitos secundários podem representar um reservatório de novas moléculas com atividade antibacteriana, antiinflamatória, antiparasitária, antioxidante, ou até anticarcinogênica. A Floresta Amazônica e a Mata Atlântica são biomas que apresentam uma diversidade biológica, e o arsenal de compostos presentes em plantas dessas regiões, gera maior interesse científico e maior possibilidade na descoberta de moléculas ativas inovadoras e eficientes, com potencial uso, inclusive em larga escala (BARBOSA *et al.*, 2017).

Com a maior biodiversidade do mundo, o que representa 20% da flora mundial, o Brasil destaca-se com relação ao desenvolvimento de metodologias terapêuticas baseadas em produtos naturais (CALIXTO, 2003). Segundo registros na Flora do Brasil (2021), existem 49.979 espécies de plantas reconhecidas para a flora brasileira, entre plantas nativas, exóticas, cultivadas e naturalizadas. Com o objetivo de identificar extratos obtidos de plantas, ativos contra microrganismos, o Grupo de Pesquisa de Atividades Biológicas, Farmacológicas e Toxicológicas de Produtos Naturais, cujas atividades científicas estão localizadas no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade da UNIP, mantém mais de 2.280 extratos obtidos de plantas amazônicas e da Mata Atlântica. O objetivo deste trabalho é identificar extratos vegetais ativos contra cepa ATCC®7644 da bactéria *L. monocytogenes*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais de plantas brasileiras contra cepa ATCC® 7644 da bactéria *L. monocytogenes*, pelos métodos de difusão em ágar, microdiluição em caldo, bioautografia e verificação da toxicidade dos extratos ativos selecionados através do modelo da *Artemia franciscana*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os extratos vegetais ativos contra *L. monocytogenes* em modelo de disco difusão em ágar e obter o diâmetro dos halos de inibição para cada extrato ativo;
- Determinar as concentrações inibitória e bactericida mínimas, nos ensaios de microdiluição em caldo, para os extratos vegetais ativos contra *L. monocytogenes*;
- Verificar a ação antioxidante e a quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos ativos;
- Determinar as frações ativas dos extratos selecionados através dos ensaios de bioautografia;
- Verificar a toxicidade no modelo da *Artemia franciscana*, dos extratos ativos selecionados.

3. JUSTIFICATIVA

Embora ocorra em baixa incidência na espécie humana, a listeriose deve ser considerada como um problema de saúde pública, onde podem ocorrer surtos fatais. Outro ponto a ser considerado é o impacto socioeconômico na população ativa acometida pela infecção, visto que o microrganismo abordado pode estar presente em alimentos também mantidos sob refrigeração, podendo sobreviver em ambiente adverso quando comparado às outras bactérias, ocasionando também, a necessidade de intervenção e adequação na manipulação de alimentos, na forma de estocagem e na embalagem dos mesmos.

A necessidade da descoberta de novos fármacos antimicrobianos, aumentando os protocolos terapêuticos para o tratamento da listeriose na população mais vulnerável é indispensável, visto que a *L. monocytogenes*, assim como outras espécies de bactérias, também tem demonstrado um perfil de resistência aos antimicrobianos já utilizados na terapêutica.

Nas Ciências Farmacêuticas, especificamente na Farmacognosia, os extratos vegetais são uma fonte para descoberta de novas moléculas que podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos, ou como fonte de matérias-primas farmacêuticas para obtenção de adjuvantes farmacêuticos (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

O acervo de extratos vegetais, presente no Laboratório de Extração da UNIP, no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade (NPBio), que conta com 2.280 extratos, torna-se de importância considerável para a promoção e o desenvolvimento de ensaios laboratoriais, baseados nas metodologias utilizadas para a realização deste trabalho científico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de plantas – feito previamente

O Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade da UNIP (NPBio), desde 1997, coleta plantas na Floresta Amazônica, no Parque Nacional de Anavilhanas e arredores (em igapó e terra firme), no município de Manaus (AM)

e de Novo Airão, e em região de Mata Atlântica, nos limites da APA Cananeia-Iguape-Peruípe, reserva natural localizada no Sudeste do Estado de São Paulo. Nessa pesquisa, as espécies vegetais foram coletadas na Floresta Amazônica e na Mata Atlântica em áreas que se encontram sob a jurisdição do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA - licenças números 12A/08 e 14879). As amostras das espécies coletadas foram depositadas no herbário da UNIP, onde foi feita a identificação botânica. O material vegetal coletado foi limpo, de modo que insetos e outros animais foram retirados, assim como órgãos de outras plantas, areia, terra, entre outros. O material limpo foi colocado em estufas de circulação de ar (Fanem®, Diadema, SP, Brasil) a 40°C e depois foi moído em moinho de martelo (Holmes®, Danville, Illinois, EUA). O material moído foi acondicionado em sacos plásticos, selado, identificado e mantido em câmara fria até a confecção dos extratos (YOUNES *et al.*, 2000, 2007).

A UNIP possui um barco tripulado, que permanece às margens do Rio Negro, na Floresta Amazônica, que eventualmente é usado na logística das coletas, nas margens do Rio Negro. As amostras do material coletado de cada espécie vegetal são retiradas, para a pesquisa botânica e taxonômica para se identificar a espécie vegetal. Cada amostra é denominada de exsicata, e foi depositada no Herbário UNIP, onde é identificada. Diferentes órgãos de cada espécie selecionada são coletados, de acordo com a disponibilidade de biomassa. O material coletado é acondicionado em sacos de algodão. O material vegetal limpo é seco em estufa de circulação de ar (Fanem®) a 40°C; em seguida, é moído em moinho de martelo (Holmes®). O material moído foi acondicionado em sacos plásticos, selados, identificados e mantidos em câmara fria até ser usados para a preparação dos extratos (YOUNES, *et al.*, 2000).

4.2 Obtenção dos extratos – feito previamente

O material vegetal coletado foi moído para realização de duas macerações subsequentes, feitas em percoladores de vidro (Kontes®, Vineland, NJ, EUA). A mistura de solventes composta por diclorometano e metanol (Synth®, Diadema, SP, Brasil), na proporção de 1:1, foi adicionada ao percolador, de modo a se cobrir todo o pó obtido da planta. O conjunto pó-mistura de solventes foi mantido

em contato por 24h (SUFFREDINI, *et al.*, 2007b). O solvente foi removido por evaporação rotativa (Buchii, Flawil, Suíça) e o extrato orgânico seco foi armazenado em câmara fria a -20°C. Em seguida, água Milli-Q (Millipore®) foi acrescentada ao pó que permaneceu no percolador e uma nova maceração foi realizada por mais 24h. O extrato aquoso foi congelado (Revco®, Cheektowaga, NY, EUA) a -70°C e, em seguida liofilizado em liofilizador de bandeja (Virtis®, Stone Ridge, NY, EUA). O armazenamento dos extratos aquosos secos foi feito em câmara fria a -20°C. Foram obtidos, portanto, dois extratos para cada material vegetal: um extrato orgânico que recebeu um número ímpar e um extrato aquoso que recebeu um número par (YOUNES *et al.*, 2007, 2001).

Nos ensaios de disco difusão em ágar e microdiluição em caldo foram analisados 2.280 extratos, depositados no banco de extratos da UNIP. Os testes foram realizados em cego, sem conhecimento prévio da espécie de planta empregada.

4.3 Preparo dos extratos para as análises

A metodologia utilizada para o preparo dos extratos orgânicos e aquosos foi descrita por Camargo *et al.* (2020); Suffredini (2014). Para a preparação das amostras, os extratos preparados anteriormente e em estoque a -20 °C, foram retirados 12h antes da câmara fria e mantidos em temperatura ambiente. Utilizando uma balança analítica (Ohaus® ou Mettler®), frascos estéreis, de 5 mL foram pesados e etiquetados com o correspondente número do extrato, anotadas as massas dos frascos, assim também como a concentração do extrato a ser pesada.

Trezentos miligramas dos extratos brutos foram pesados em frascos de vidro com tampa, e diluídos em 3 mL de solvente. Os extratos orgânicos foram diluídos em mistura de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth®, Diadema, SP, Brasil) e água Milli-Q (Millipore®), na proporção de 1:1, e os extratos aquosos foram diluídos em água Milli-Q (Millipore®) (SUFFREDINI, *et al.*, 2007b).

Para o ensaio de microdiluição, os extratos ativos foram diluídos nove vezes em escala de razão ½, e serão utilizados DMSO (Synth®), 50% para os orgânicos e água Milli-Q (Millipore®) para os aquosos, a fim de se obter as

seguintes concentrações: 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,12 mg/mL, 1,56 mg/mL, 0,78 mg/mL, 0,39 mg/mL e 0,19 mg/mL.

4.4 Difusão em ágar

4.4.1 Preparação da suspensão bacteriana para preparo do inóculo

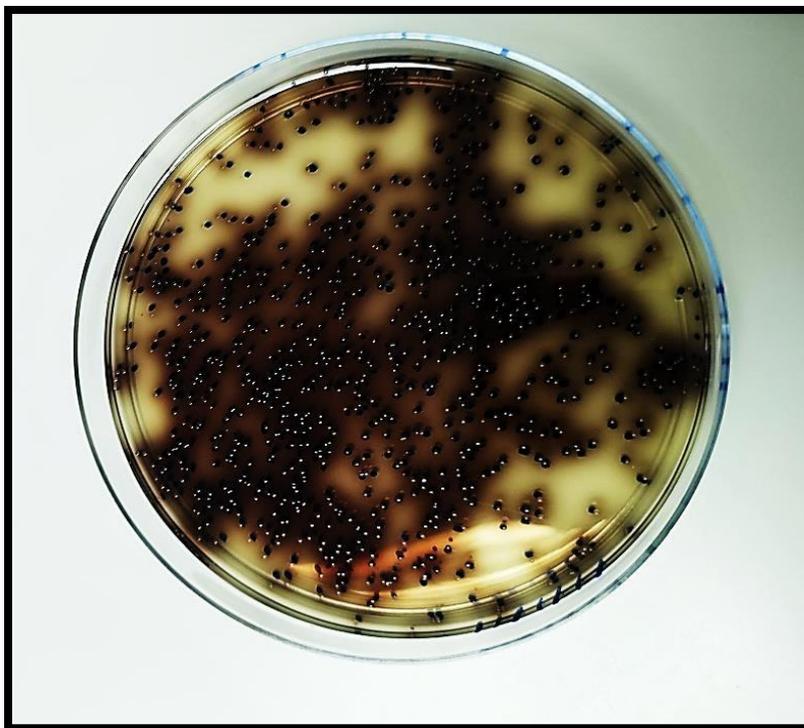
Foi usada a cepa bacteriana padrão de *L. monocytogenes* (ATCC® 7644), adquiridas liofilizadas, em alças de plástico descartáveis, e apresentaram-se acondicionadas em envelopes (Loops®, Remel®), que por sua vez estavam acondicionados em caixa apropriada, mantida sob refrigeração até o devido uso.

Segundo Bona *et al.* (2014) as metodologias utilizadas no ensaio de disco de difusão em ágar ou em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado ou cepa bacteriana, de acordo com o preconizado pelo CLSI (CLSI, 2008).

Foi utilizada a técnica de disco-difusão em ágar para a seleção dos extratos ativos. As colônias frescas formadas de cultura de 24 h foram suspensas e homogeneizadas em solução salina estéril e foram submetidas à contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) pela técnica da diluição seriada. Para isso, a bactéria foi cultivada em placas de Petri de 90 mm de diâmetro (JProlab®, Curitiba, PR, Brasil) com meio ágar Oxford Listeria (Listeria SelectiveAgar Base, Oxoid®, Basingstoke, UK) por 24h, a 36°C (Suffredini *et al.*, 2004). As colônias foram recolhidas em um tubo de ensaio contendo 9 mL de soro fisiológico estéril e a suspensão foi homogeneizada em vórtex (Kasvi®). Em seguida, foi realizada uma diluição seriada de razão 1:10 dos tratamentos, sejam eles extratos ou substâncias de referência, com no mínimo seis diluições em tubos de ensaio devidamente esterilizados e numerados sequencialmente, iniciando a partir do tubo referente à primeira diluição. O tubo no qual foi feita a suspensão foi chamado de tubo S, ou “tubo da suspensão inicial”. Para a contagem do número de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), foram plaqueados 100 µL das diluições referentes aos tubos cinco e seis, em duplicata, em técnica de inoculação em superfície. As placas inoculadas foram incubadas por 24h, a 36°C, e após o período de incubação, as colônias foram contadas para obter a concentração da suspensão inicial (Figura 1). Para o cálculo da concentração

da suspensão inicial, foram contadas as unidades formadoras de colônia em cada placa e multiplicado o valor encontrado por 10, para correção da diluição para mL. Depois, foi feita a média das duas leituras referentes a cada tubo. A seguir, considerou-se a razão de diluição, determinada pelo número do tubo, para se chegar à concentração do tubo da suspensão inicial. Após se determinar a concentração da suspensão inicial, um inóculo foi preparado na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, que representa 0,5 MacFarland, em soro fisiológico, com os quais foram realizadas a triagem inicial e a obtenção do diâmetro do halo de inibição para os extratos selecionados.

Figura 1. Placa com colônias de *Listeria monocytogenes* em meio ágar Oxford Listeria.



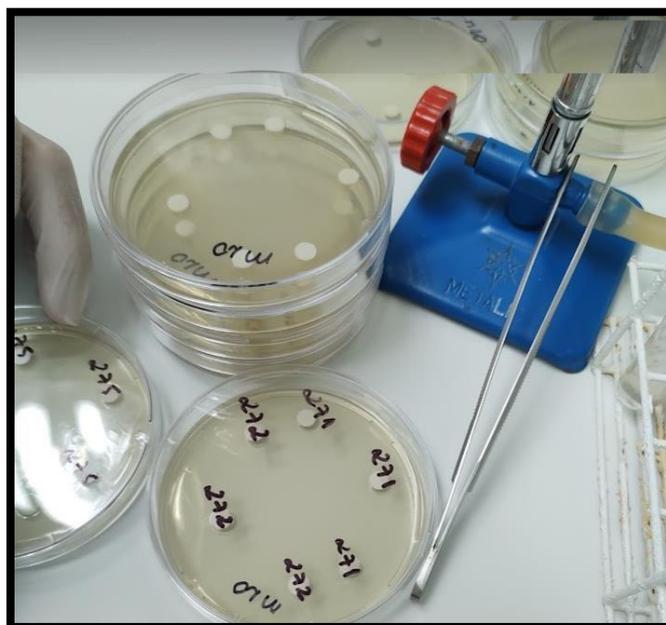
Fonte: autoria própria.

4.4.2 Execução da técnica de disco-difusão em ágar para a realização da triagem e da verificação do diâmetro do halo de inibição

Um *swab* estéril foi usado para inocular a bactéria na superfície de placas de Petri (12 cm de diâmetro) preparadas com 15 mL de ágar Oxford Listeria. Sobre a superfície das placas inoculadas, foram colocados 19 discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro, sobre os quais foram adicionados 10 μ L de cada extrato, na concentração única de 100 mg/mL. Todos os extratos foram testados em unicata, na triagem inicial. As placas foram incubadas a 36°C, por 24h, para realização da leitura. Considerou-se ativos os extratos que promoveram forma-

mação de halo de inibição de crescimento. Os extratos que apresentaram halo de inibição foram submetidos à avaliação em triplicata, no modelo de disco difusão em ágar (Figura 2) e no modelo da microdiluição em caldo (MDC), para se obter as concentrações inibitória e bactericida mínimas (CIM e CBM; CAMARGO *et al.*, 2020). A partir da obtenção dos diâmetros dos halos de inibição, foi feito cálculo estatístico de tamanho da amostra e o experimento para a obtenção do diâmetro do halo de inibição foi realizado novamente com o número adequado de tamanho amostral. Também foram utilizados discos de papeis impregnados com antibióticos, onde foram aplicados 3 discos por placa, com o meio de cultura ágar Oxford Listeria já inoculado na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Cada placa recebeu o mesmo antibiótico em triplicata, para comparação posterior dos halos formados pelos antibióticos e pelos extratos vegetais. Os antibióticos utilizados no experimento foram os seguintes: a ampicilina (AMP), 10 µg por disco; o cloranfenicol (CLO), 30 µg por disco; a estreptomicina (EST), 10 µg por disco; a gentamicina (GEN), 10 µg por disco e a tetraciclina (TET), 30 µg por disco.

Figura 2. Placas com o meio ágar Oxford Listeria sobre os quais foram distribuídos os discos de papel estéreis, e sobre os quais os extratos foram aplicados em triplicata, para a verificação da formação dos halos de inibição.



Fonte: autoria própria

4.5 Microdiluição em caldo

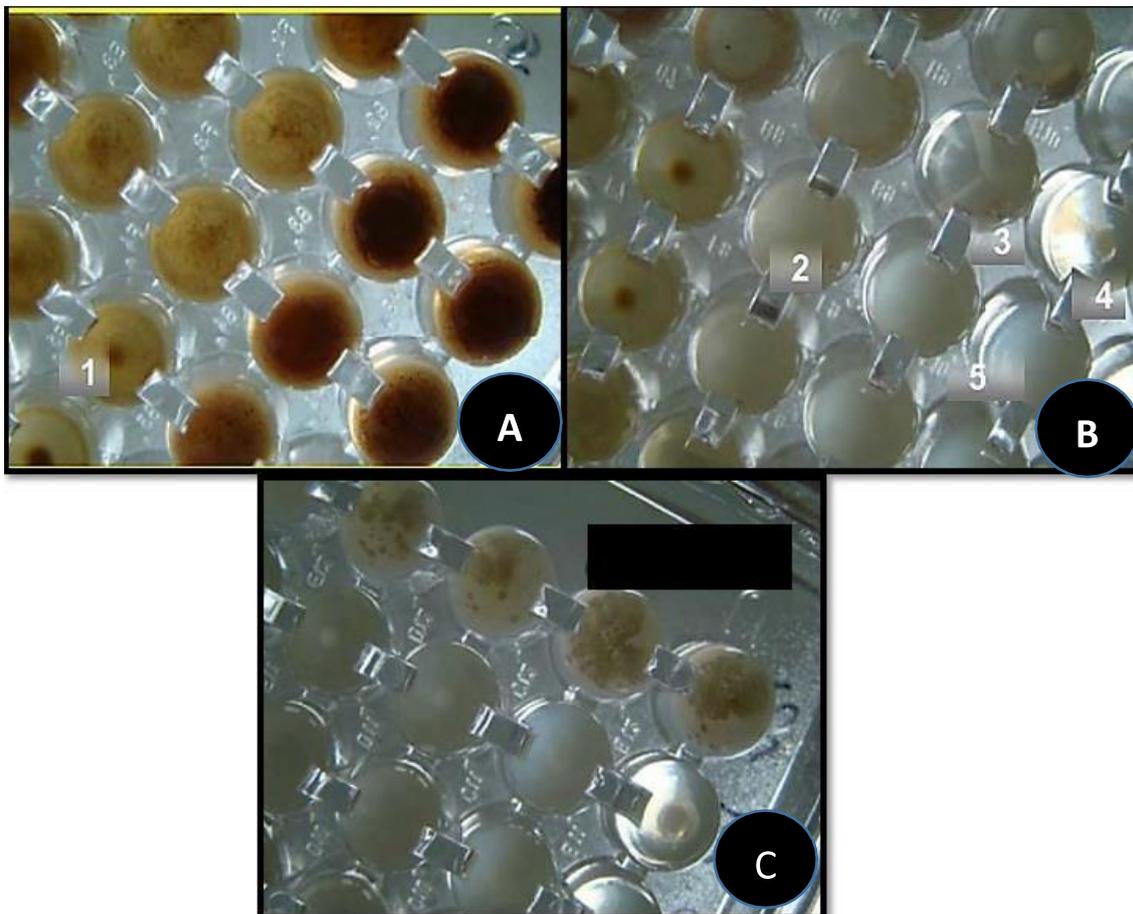
Para se obter a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM), foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, seguindo o documento CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008), com adaptações. Os inóculos foram preparados a partir de colônias frescas de 24h cultivadas em ágar Oxford Listeria. As colônias frescas foram suspensas em solução salina estéril, homogeneizadas e usadas para a preparação dos meios caldo com inóculo ajustado para uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, ou 0,5 MacFarland. Cento e noventa μL de meio inoculado foram adicionados aos poços de microplacas de 96 poços de fundo em U, nos quais foram colocadas alíquotas de 10 μL de diferentes concentrações de cada extrato vegetal ativo selecionado no teste de DDA. Para o teste, cada extrato foi diluído de modo que apresentou as concentrações finais de 5,00 mg/mL, 2,50 mg/mL, 1,25 mg/mL, $6,25 \times 10^{-1}$ mg/mL, $3,13 \times 10^{-1}$ mg/mL, $1,56 \times 10^{-1}$ mg/mL, $7,81 \times 10^{-2}$ mg/mL, $3,91 \times 10^{-2}$ mg/mL e $1,95 \times 10^{-2}$ mg/mL (Figura 3). Todos os testes foram realizados em duplicata. Depois de preenchidas, as microplacas foram incubadas a 36°C por 24h. Ao final deste período, foram transferidos 2 μL de cada poço para placas de Petri contendo ágar Oxford Listeria, para que fosse avaliada a presença de bactérias nos poços teste (Figura4). As placas foram incubadas a 36°C por 24h para leitura da concentração bactericida mínima (MARTINS *et al.*, 2019a, 2019b; SILVA *et al.*, 2020). O experimento para obtenção da CIM/CBM foi repetido três vezes, em dias distintos, para a replicata técnica.

Figura 3. Teste da microdiluição em caldo feito em microplacas de 96 poços com fundo em U contendo meio inoculado com *L. monocytogenes* e com os extratos vegetais identificados. A placa com escrita vermelha apresenta os extratos vegetais N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1289 e N1305. A placa com escrita azul apresenta os extratos vegetais N1395, N1489, N2161, N2186 e o gluconato de clorexidina a 0,05% sendo testados. Controle negativo - meio de cultura estéril.



Fonte: autoria própria.

Figura 4. Microplacas de 96 poços, com o meio de cultura inoculado e com os extratos vegetais, após 24h de incubação.



Legenda: a figura representa fotos das placas com os extratos após 24h de incubação. Foi utilizado o método de subcultura para verificar se houve crescimento de bactérias nos poços. Fonte: autoria própria.

4.6 Bioautografia

4.6.1 Difusão em bioautografia

Placas de cromatografia em sílica gel GF254, de base de alumínio, de 5 x 5 cm foram utilizadas. Uma placa para a análise de um extrato foi utilizada. Os extratos brutos foram aplicados em três volumes, de 2 μ L, 5 μ L e 10 μ L. Os cromatogramas foram acondicionados em placas de Petri de 12 cm e sobre estes, foram vertidos 15 mL de meio ágar Oxford Listeria inoculado com $1,5 \times 10^8$ UFC/mL de *L. monocytogenes*. As placas foram colocadas em incubadora, onde permaneceram por 18 a 24 h. Após esse período, foram observados halos de inibição de crescimento sobre os pontos de aplicação dos extratos ativos, após adição de 0,5 mL de corante de viabilidade MTT, ou 3-(4,5-di metiltiazol-2-il) - 2,5-difenil tetrazólio brometo, um sal de tetrazólio, na concentração de 0,5 mg/mL. Os halos de inibição foram medidos com um paquímetro, e os valores

foram comparados com os diâmetros obtidos dos ensaios da disco difusão em ágar.

4.6.2 Bioautografia unidimensional

Placas de cromatografia de sílica gel GF254 de base de alumínio de 5 x 5 cm foram utilizadas. Dos extratos brutos foram aplicados 10 µL em faixa sobre a placa, no ponto de partida, e foram eluídos em fase móvel composta por misturas de acetato de etila, metanol e água (100:35:10) (WAGNER; BLADT, 1996). A corrida teve linha de frente de 4 cm, a partir do ponto de partida. Depois da corrida, os cromatogramas foram colocados na capela para que os solventes da fase móvel evaporem totalmente, para não influenciarem na resposta biológica.

As suspensões bacterianas foram inoculadas em meio de cultura ágar Oxford Listeria na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, seguindo a padronização feita para os ensaios anteriores. Quinze mL da suspensão inoculada foi vertida sobre o cromatograma, que estava dentro de uma placa de Petri de 12 cm de diâmetro. Após a gelificação do meio, a placa de Petri foi levada para a incubadora, para que lá permanecesse sob as condições experimentais da cultura bacteriana previamente descritas (NCCLS, 2003). Os resultados positivos foram identificados quando ocorreu o aparecimento de halos de inibição sobre as manchas do cromatograma, ressaltadas pela adição de 0,5mL de corante de viabilidade MMT, um sal de tetrazólio, na concentração de 0,5mg/mL.

4.6.3 Bioautografia bidimensional

Placas de cromatografia de sílica gel GF254 de base de alumínio de 5 x 5 cm foram utilizadas. Dos extratos brutos, foram aplicados 10 µL no ponto de partida localizado na região inferior esquerda da placa, em ponto. O extrato foi eluído em fase móvel composta por misturas de acetato de etila, metanol e água (100:35:10) (WAGNER; BLADT, 1996). Ao final da eluição, cuja linha de frente ficou em 4 cm a partir do ponto de aplicação, a placa foi seca e a mistura de solventes, removida. Depois, a placa cromatográfica foi girada em 90°, no sentido anti-horário e foi colocada novamente para eluir. Depois das corridas, os

cromatogramas foram colocados na capela para que os solventes da fase móvel evaporem totalmente, para não interferirem na resposta biológica.

As suspensões bacterianas foram inoculadas em meio de cultura ágar estéril, ágar Oxford Listeria, na concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, seguindo a padronização feita para os ensaios anteriores. Quinze mL da suspensão inoculada foram vertidos sobre o cromatograma, que será acondicionado em uma placa de Petri de 12 cm de diâmetro. Após a gelificação do meio, a placa de Petri foi levada para a incubadora, para que lá permaneça sob as condições experimentais da cultura bacteriana previamente descritas (NCCLS, 2003). Os resultados positivos foram identificados quando houve o aparecimento de halos de inibição sobre as manchas do cromatograma, ressaltadas pela adição de 0,5 mL de corante de viabilidade MMT, um sal de tetrazólio, na concentração de 0,5 mg/mL.

4.7 Toxicidade a *Artemia franciscana*

4.7.1. Cultivo das artêmias

Em um recipiente plástico retangular, com capacidade de 1,5 L, foram adicionados 500 mL de água marinha, feita a partir da adição de 15 g de sal marinho utilizado em aquacultura aos 500 mL de água Milli-Q. O recipiente foi dividido em duas partes, na proporção de 1/3: 2/3, com um separador de plástico, de modo que a parte inferior deste separador deixe um vão, que possibilitará a passagem dos náuplios, ao eclodirem. Três gramas de cistos de artêmia foram adicionados na parte menor do recipiente, que foi coberta com papel alumínio, de modo que permaneceu protegida da luz. Os cistos permaneceram no aquário até que eclodissem, em um período de 24h. Uma lâmpada foi colocada para iluminar a porção maior do aquário. Após o nascimento dos náuplios, que nasceram no lado escuro do recipiente plástico, esses passaram para o lado claro. No dia da eclosão, dez náuplios foram transferidos com pipeta Pasteur para cada poço de placas de 24 poços. Após a transferência dos náuplios, cada poço recebeu água marinha suficiente para completar um volume final de 3 mL. Para que os náuplios fossem mantidos alimentados, uma gota de fermento biológico diluído em água foi adicionada a cada poço. Os náuplios permaneceram por 24 h nestas condições.

4.7.2 Ensaio da toxicidade a artêmia

Os experimentos de toxicidade foram feitos segundo as metodologias descritas pela OECD de número 202 e de número 34, descritas para *Daphnia*, um crustáceo de água doce, adaptados para artêmia, um crustáceo de água marinha. Os testes foram realizados com os dez náuplios de 24 h, acondicionados em cada poço das microplacas de 24 poços. O experimento foi realizado com os extratos diluídos nas concentrações finais de 1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,03 mg/mL e 0,01 mg/mL.

Foram pesados 12,1 mg de cada extrato, diluídos em 1 mL de água ou DMSO. Cada placa de 24 poços foi dividida ao meio para a aplicação de 2 extratos, sendo cada um testado nas quatro concentrações finais descritas. Os extratos e as substâncias de controle foram deixadas em contato com os náuplios por 24 e 48 horas, e ao final de cada um desses dois tempos, os náuplios sobreviventes foram contabilizados. Os dados relativos ao número de mortes dos náuplios pela concentração de extratos foram usados para o cálculo da concentração efetiva 50% (EC₅₀) de cada extrato, que é um indicativo de seu grau de toxicidade.

4.8 Cromatografia em camada delgada com os extratos ativos

Os 12 extratos ativos foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) para verificação da presença de flavonoides e compostos fenólicos, alcaloides, antraquinonas, cumarinas, antronas, terpenos e esteroides. Para isso, placas cromatográficas de sílica gel GF₂₅₄ (Macherey-Nagel) de 10 x 5 cm, marcadas com linha de frente de 4 cm, ponto de aplicação a 0,5 cm, distância de 0,5 cm entre as amostras, foram utilizadas para as análises das classes químicas. A fase móvel composta por mistura de acetato de etila, metanol e água (100:35:10). Depois da corrida, foram utilizados os reveladores químicos Kedde, Dragendorff, H₂SO₄ 20%, KOH, NP (*natural products reagent*), conforme descrito por Wagner; Bladt (1996) e adaptados por Díaz *et al.* (2017). As revelações foram feitas sob luz U.V. 254 nm e 365 nm, e sob luz visível, conforme indicação de Wagner; Bladt (1996). Os R_fs foram obtidos.

4.9 Ensaio relacionados à atividade sequestradora de radicais livres e atividade antioxidante dos extratos vegetais antibacterianos

Foram utilizados reveladores relacionados à avaliação da atividade antioxidante dos extratos vegetais, como o 2,2-difenil-picril-hidrazila (DPPH) e o β -caroteno (SHERMA, 2018).

4.9.1 Teste do DPPH em autografia

O teste do DPPH foi realizado por autografia, em placa cromatográfica de 10 x 5 cm, com base de alumínio e fase estacionária composta de sílica gel GF254, quadriculada com lápis, simulando um tabuleiro de xadrez. Os extratos foram aplicados em gota, nos quadrados correspondentes, e também foram eluídos no sistema cromatográfico composto por fase estacionária de sílica gel GF254, fase móvel composta por uma mistura de acetato de etila: metanol: água (100:35:10), linha de frente de 4 cm e luz ultravioleta (U.V.) 365 nm como revelador, além de nebulização com a solução de DPPH em metanol a 0,2 mg/mL. As manchas dos extratos com capacidade de sequestrar o radical livre gerado pelo DPPH ficam esbranquiçadas sobre um fundo roxo, que é a cor do radical.

4.9.2 Ensaio do β -caroteno em autografia

O ensaio do β -caroteno foi realizado por autografia, em placa cromatográfica de 10 x 5 cm, com base de alumínio e fase estacionária composta de sílica gel GF254, quadriculada com lápis, simulando um tabuleiro de xadrez. Os extratos foram aplicados em gota, nos quadrados correspondentes, e também foram eluídos no sistema cromatográfico composto por fase estacionária de sílica gel GF254, fase móvel composta por uma mistura de acetato de etila: metanol: água (100:35:10), linha de frente de 4 cm e luz ultravioleta (U.V.) 365 nm como revelador, além de nebulização com a mistura de β -caroteno, conforme descrito a seguir.

Para a revelação da capacidade antioxidante dos extratos foram preparadas duas soluções, A e B, misturadas no momento de serem nebulizadas sobre a placa. A solução A foi composta por 9 mg de β -caroteno dissolvidos em 30 mL de clorofórmio e a solução B foi feita com duas gotas de ácido linoleico em

60 mL de etanol, adicionadas à solução A e pós-exposição ao sol por pelo menos 6 h (SHERMA, 2018; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A visualização da atividade antioxidante dos extratos se dá a partir do aparecimento de manchas alaranjadas sobre as substâncias ativas em fundo esbranquiçado.

4.10 Teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu

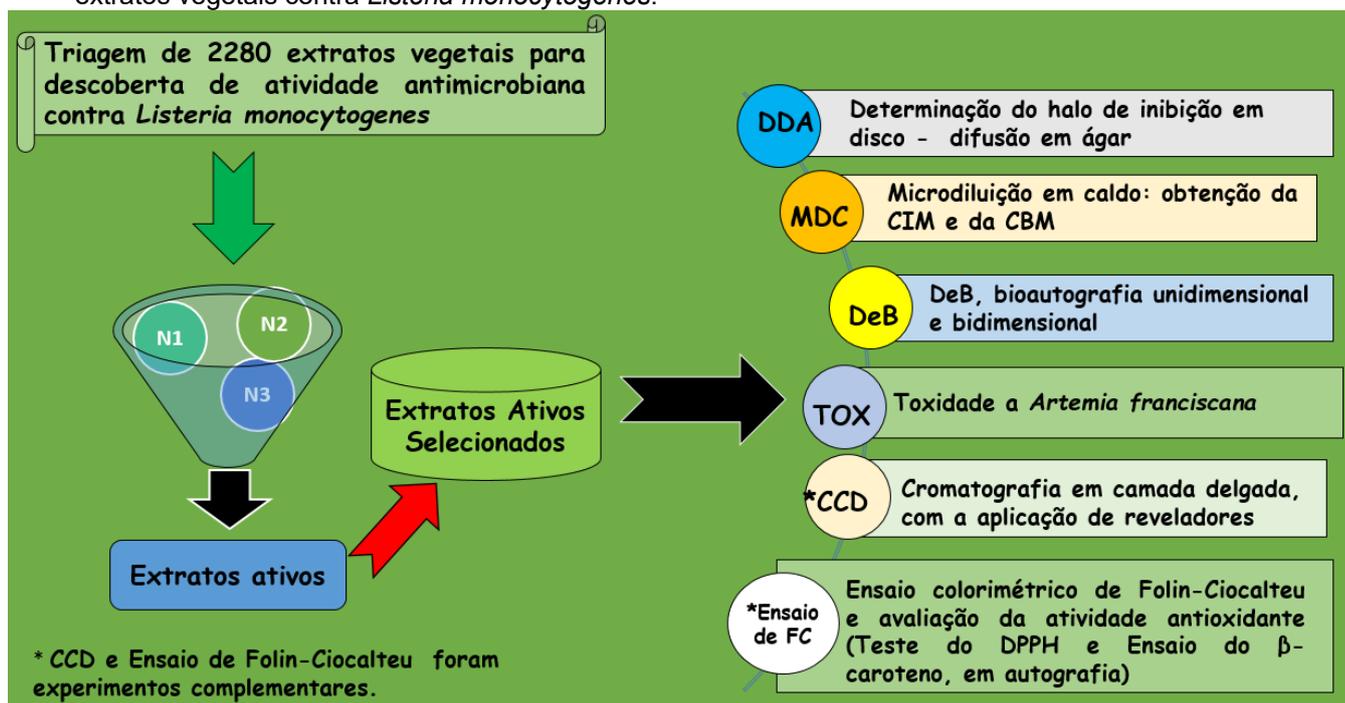
O reagente de Folin-Ciocalteu (FC) foi adquirido em sua forma diluída e usado diretamente para a realização das quantificações (Sigma-Aldrich, código F9252-100 mL). Como composto de referência foram utilizados o trolox (TR) e a rutina (RU). Uma solução mãe para cada um dos compostos citados foi preparada a uma solução estoque de 100 µg/mL, a partir da qual se obteve soluções em diluições seriadas de razão $\frac{1}{2}$, partindo de 10 mg/mL como maior concentração. Os extratos foram diluídos em etanol ou água, conforme fossem orgânicos ou aquosos. Para isso, cada extrato foi preparado a uma concentração inicial de 1 mg/mL. Para o teste, foram adicionados 20 µL da amostra ou da substância padrão ao poço correspondente de uma placa de 96 poços de fundo chato. Foram adicionados 100 µL da solução Folin-Ciocalteu, agitou-se bem e houve um tempo de espera de 5 min. Depois, adicionaram-se 80 µL de uma solução de carbonato de sódio 7,5 % e as placas foram agitadas em agitador de placas por 5 min. A microplaca foi coberta e protegida da luz e deixada 2 h no escuro, à temperatura ambiente. A mudança de coloração permitiu quantificar o teor de compostos fenólicos na amostra, por espectrofotometria. Foi realizada a medição em leitor de microplacas ajustado em 750 nm. Água ou solvente apropriado foram usados como branco (ZHANG *et al.*, 2006). Os compostos fenólicos totais foram quantificados em Teor de RU (massa molecular de 610,51 g/Mol) e Teor de TR (250,29 g/Mol) (SANTOS *et al.*, 2017).

4.11 Delineamento experimental

A figura 5, a seguir, mostra o delineamento experimental a ser executado no projeto. Primeiramente foram realizados os experimentos de identificação dos extratos ativos entre os 2.280 da Extratoteca da UNIP. Com os extratos ativos selecionados, foram realizadas as análises em disco difusão em ágar para obtenção do halo de inibição de crescimento (n=3) e foram feitas análises de

microdiluição em caldo para obtenção da CBM. A seguir, os extratos mais ativos foram submetidos às técnicas de bioautografia para a identificação das frações ativas. Por fim, os extratos foram testados quanto à toxicidade no modelo da *Artemia franciscana*. Ensaios adicionais de cromatografia em camada delgada, utilizando reveladores para determinação de grupos químicos, também foram realizados, além dos ensaios relacionados à atividade antioxidante.

Figura 5. Delineamento experimental para o projeto de prospecção de atividade biológica de extratos vegetais contra *Listeria monocytogenes*.



Fonte: autoria própria.

4.12 Análises estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados para os resultados obtidos em disco difusão em ágar para os extratos ativos ($n=6$; total= $6X$, onde X = número de extratos ativos) em dois experimentos 1 e 2. Para cada disco, duas medidas foram obtidas, e para a triagem, três discos foram utilizados para cada tratamento, totalizando seis medidas para cada grupo. A hipótese nula H_0 foi considerada como sendo a ausência de diferenças significativas entre o grupo de dados analisados e a amostra populacional, ao passo que a hipótese alternativa aponta que há diferenças.

Para o teste de normalidade, os dados foram considerados como representativos da distribuição normal quando $p > 0,05$. Para isso, as análises foram baseadas em dados obtidos aleatoriamente e independentemente, e foram feitas análises de identificação de outliers pelo método de ROUT com $Q=5\%$ (GraphPad Prism 7.0), de normalidade e de homogeneidade. A partir dos dados obtidos da análise do diâmetro do halo de inibição realizado em triplicata, em experimento piloto, foi feito o cálculo de normalidade de Shapiro-Wilk para cada ensaio realizado. Foi feita análise de variância do tipo ANOVA e foi aplicado o teste posterior de Tukey, caso os dados se encontram dentro da normalidade, ou teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Dunn's, caso os dados se encontrem fora da distribuição normal, além dos testes de Levene e Welch para verificação de homogeneidade. Depois, foram obtidos os valores do tamanho do efeito dados pelo η^2 ou RMSSE para cada experimento piloto, para se calcular o tamanho da amostra (Suplemento Realstats para Excel) considerando-se poder do teste de 0,80, significância de $p < 0,05$, com número de grupos variáveis entre 9 e 12.

A partir dos dados obtidos do experimento piloto, a obtenção do diâmetro do halo de inibição foi repetida, considerando-se o tamanho de amostra resultante dos cálculos anteriores, considerando-se o nível de significância de $\alpha < 0,05$. Os mesmos testes de normalidade, homocedasticidade, de identificação e outliers e de variância foram aplicados para o experimento de disco-difusão com número adequado de amostras, feito com 15 discos e 30 medidas por grupo/tratamento. Para esse ensaio, foi aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnoff, adequado a amostras maiores do que 50.

Ainda usando os experimentos em DDA, os tratamentos foram avaliados em análise de variância do tipo ANOVA de dois fatores, sendo um dos fatores o tratamento e o outro, a concentração da suspensão bacteriana. Para a análise entre os tratamentos, foi utilizado o teste posterior de Tukey, com significância se $p < 0,05$ (GraphPad Prism 7.05).

5 RESULTADOS

5.1 Triagem dos extratos vegetais ativos a partir do modelo da disco difusão em ágar

No processo de identificação de extratos ativos contra *L. monocytogenes*, foram testados 2.280 extratos aquosos (número par) e orgânicos (número ímpar). Destes, 12 apresentaram a formação de halo de inibição e foram considerados ativos. Os extratos são N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N1489, N2161 e N2186, o que representa 0,53% de extratos ativos contra a bactéria.

Os extratos selecionados (tabela 1) foram testados novamente em triplicata para se confirmar a atividade antibacteriana e para se obter o diâmetro do halo de inibição.

Tabela 1. Relação das espécies cujos extratos vegetais apresentaram atividade contra *Listeria monocytogenes* a partir da triagem em grande escala feita com o modelo da disco difusão em ágar.

Parte utilizada	Nº Extrato	Nº de Coleta	Data Coleta	Família	Gênero	Espécie	autor
FO	N271	AAO3330	11/09/1998	Flacourtiaceae (Salicaceae)	<i>Casearia</i>	<i>spruceana</i>	Benth. ex Eichler
FO	N272	AAO3330	11/09/1998	Flacourtiaceae (Salicaceae)	<i>Casearia</i>	<i>spruceana</i>	Benth. ex Eichler
OA	N275	AAO3309	10/09/1998	Clusiaceae (Calophyllaceae)	<i>Caraipa</i>	<i>grandifolia</i>	Mart.
CC	N432	IBS25	27/06/1998	Rubiaceae	<i>Alibertia</i>	<i>edulis</i>	(Rich.) A.Rich.
OA	N1005	AAO3534	23/01/2000	Clusiaceae	<i>Clusia</i>	cf. <i>viscida</i>	Engl.
FO	N1251	IBS40	29/09/2001	Clusiaceae (Calophyllaceae)	<i>Caraipa</i>	<i>grandifolia</i>	Mart.
OA	N1259	IBS56	30/09/2001	Piperaceae	<i>Piper</i>	<i>arboreum</i>	Aubl.
CA	N1305	IBS56	30/09/2001	Piperaceae	<i>Piper</i>	<i>arboreum</i>	Aubl.
FO	N1395	IBS143	08/12/2001	Leguminosae Caesalpinoideae (Fabaceae Caesalpinoideae)	<i>Hymenaea</i>	<i>parvifolia</i>	Huber
OA	N1489	AAO4035	13/05/2002	Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i>		
OA	N2161	AAO4120	20/07/2002	Annonaceae	<i>Diclinanona</i>	<i>calycina</i>	Benoist
FR	N2186	AAO2687	21/04/2007	Simaroubaceae	<i>Simaba</i>	<i>orinocensis</i>	Kunth

Legenda: FO=folhas; OA=órgãos aéreos; CC=cerne do caule, ou madeira; FR=frutos; CA=caule.

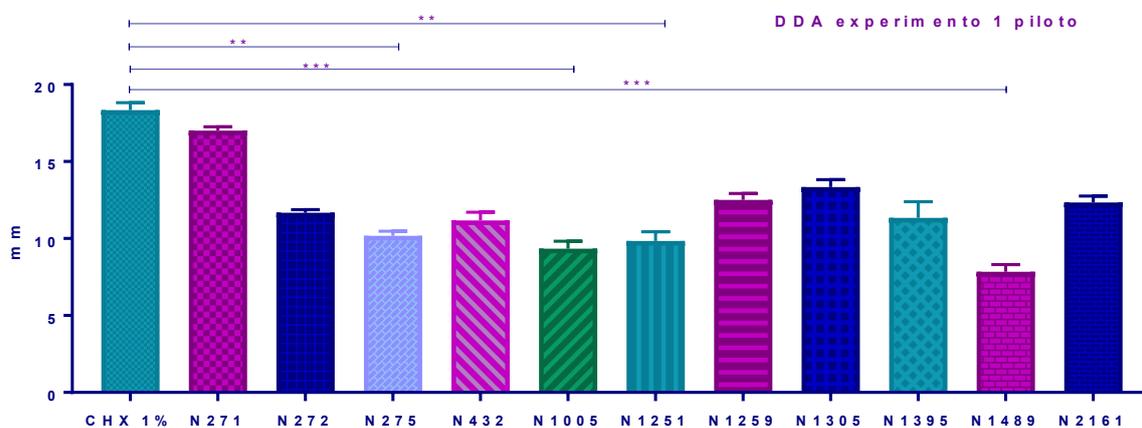
5.2 Testes de sensibilidade

5.2.1 Diâmetros dos halos de inibição dos extratos vegetais ativos a partir do modelo da disco difusão em ágar

5.2.1.1 Obtenção do diâmetro do halo de inibição dos extratos vegetais ativos a partir do modelo da disco difusão em ágar, em triplicata – experimento piloto 1

A figura 6 mostra e a tabela 2 relaciona os diâmetros dos halos de inibição dos extratos vegetais e antibióticos, em mm, resultantes da ação dos extratos vegetais ativos antibióticos que foram testados no modelo da disco difusão em ágar, usado tanto na triagem como na obtenção do diâmetro do halo de inibição formado pelos extratos ativos. Para os cálculos estatísticos os valores obtidos para os antibióticos não foram considerados por apresentarem somente n=2.

Figura 6. Análise do experimento 1 feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, n=6, N=66. Teste de Kruskal-Wallis e teste posterior de Dunn's mostraram as diferenças entre os grupos, significância se $p < 0,05$. (*)= $p < 0,05$; (**)= $p < 0,01$ e (***)= $p < 0,001$.



Fonte: autoria própria.

Tabela 2. Medidas dos diâmetros dos halos de inibição em disco difusão em ágar dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, a partir da análise no modelo da disco-difusão em ágar. Medidas dadas em milímetros.

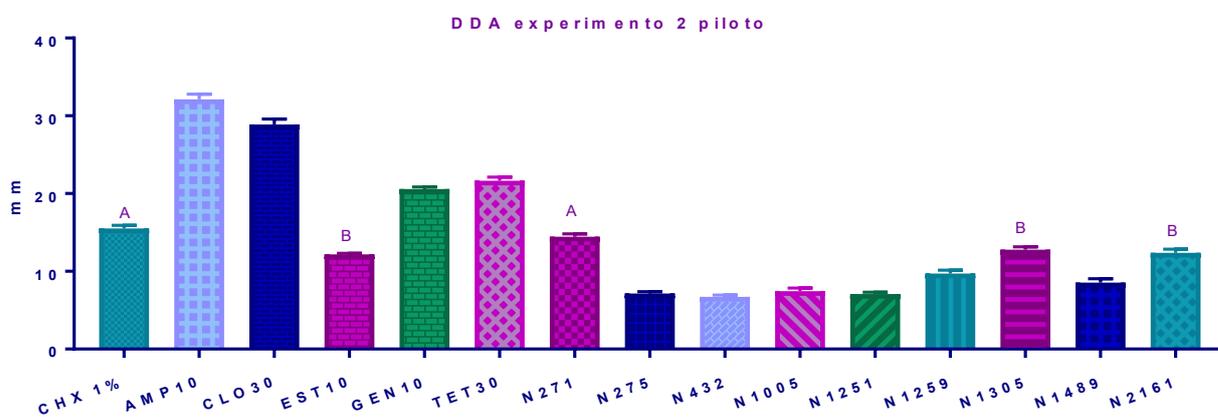
EXTRATO	Halo V1	Halo H1	Halo V2	Halo H2	Halo V3	Halo H3	Média	Erro padrão	Shapiro-Wilk	
									W	p-valor
N271	17	18	16	17	17	17	18.33	0.70	0.8268	0.1010
N272	12	11	11	12	12	12	17.00	0.37	0.6399	0.0014
N275	0,9	10	10	10	11	11	11.67	0.30	0.8663	0.2117
N432	10	10	12	13	10	12	10.17	0.43	0.8051	0.0653
N1005	8	8	10	11	10	9	11.17	0.77	0.9067	0.4150
N1251	9	8	9	10	12	11	9.33	0.70	0.9580	0.8043
N1259	13	13	12	14	12	11	9.83	0.85	0.9600	0.8201
N1305	14	15	13	14	12	12	12.50	0.61	0.9067	0.4150
N1395	8	9	12	11	15	13	13.33	0.70	0.9788	0.9453
N1489	8	8	7	6	9	9	11.33	1.49	0.9076	0.4207
N2161	12	13	11	12	12	14	7.83	0.67	0.9155	0.4733
CHX 1%	19,0	20,0	18	19	17	17	12.33	0.60	0.9067	0.4150
AMP 10	34,0	33,0					33,5			
CLO 30	34,0	36,0					35,0			
EST 10	16,0	15,0					15,5			
GEN 10	23,0	25,0					24,0			
TET 30	23,0	24,0					23,5			

Legenda: **CHX**: Clorexidina 0,05%; **GEN 10**: Gentamicina 10 µg; **AMP 10**: Ampicilina 10 µg; **TET 30**: Tetraciclina 30 µg; **EST 10**: Estreptocimina 10 µg. Números pares correspondem a extratos aquosos e números ímpares a extratos orgânicos.

5.2.1.2 Obtenção do diâmetro do halo de inibição dos extratos vegetais ativos a partir do modelo da disco difusão em ágar, em triplicata – experimento piloto 2

A figura 7 mostra e a tabela 3 relaciona os diâmetros dos halos de inibição dos extratos vegetais, em mm, resultantes da ação dos extratos vegetais ativos antibióticos que foram testados no modelo da disco difusão em ágar, usado tanto na triagem como na obtenção do diâmetro do halo de inibição formado pelos extratos ativos.

Figura 7. Análise do experimento 2 feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, n=6, N=60. Análise de variância do tipo ANOVA de um fator e teste posterior de Tukey mostraram as semelhanças ou diferenças entre os grupos, significância se $p < 0,05$. (A) $p = 0,5819$; (B) $p = 0,9904$.



Fonte: autoria própria.

Tabela 3. Medidas dos diâmetros dos halos de inibição em disco difusão em ágar dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, a partir da análise no modelo da disco-difusão em ágar. Medidas dadas em milímetros.

EXTRATO	Halo V1	Halo H1	Halo V2	Halo H2	Halo V3	Halo H3	Média	Erro padrão	Shapiro-Wilk	
									W	p-valor
N271	14.32	13.48	14.37	13.82	15.86	14.89	14.46	0.77	0.9506	0.7448
N275	7.71	7.1	6.42	6.5	7.84	7.23	7.13	0.54	0.912	0.4495
N432	7.58	6.71	7.19	6.33	6.52	5.96	6.72	0.54	0.9765	0.9328
N1005	9.19	7.69	6.89	6.46	7.45	7.07	7.46	0.87	0.8963	0.3525
N1251	7.47	6.81	7.69	7.35	6.14	7.01	7.08	0.51	0.9424	0.6783
N1259	11.28	10.32	9.32	9.63	9.64	8.18	9.73	0.94	0.9692	0.8869
N1305	13.8	13.42	13.53	11.67	11.86	12.32	12.77	0.85	0.8708	0.2294
N1395	9.88	9.9	8.09	8.66	7.87	6.97	8.56	1.06	0.9216	0.5171
N1489	11.19	11.26	14.12	13.2	11.84	12.69	12.38	1.06	0.9274	0.5602
N2161	15.54	15.56	14.57	14.68	15.49	17.33	15.53	0.90	0.84	0.1304
CHX	31.97	29.78	32.9	33.6	30.61	33.83	32.12	1.50	0.9206	0.5096
AMP 10	27.07	30.23	28.13	31.72	28.41	27.75	28.89	1.59	0.9044	0.4007
CLO 30	12.30	12.42	12.66	12.02	11.55	12.1	12.18	0.35	0.9734	0.9146
EST 10	21.43	21.17	20.38	20.76	19.72	20.05	20.59	0.60	0.9684	0.8816
GEN 10	22.58	21.77	23.04	21.73	21.07	19.65	21.64	1.09	0.9501	0.7413
TET 30	14.32	13.48	14.37	13.82	15.86	14.89	14.46	0.77	0.9506	0.7448

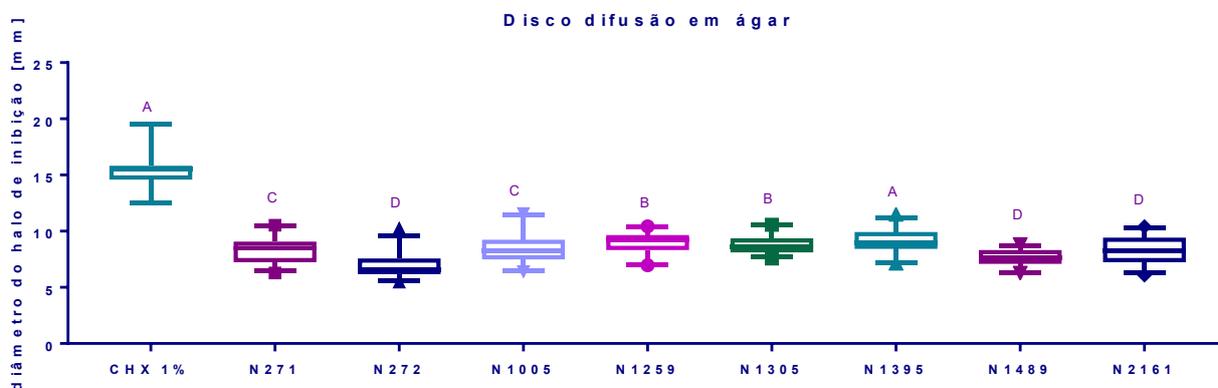
Legenda: **CHX**: Clorexidina 1%; **GEN 10**: Gentamicina 10 µg, **AMP 10**: Ampicilina 10 µg, **TET 30**: Tetraciclina 30 µg, **EST 10**: Estreptomicina 10 µg; números pares correspondem a extratos aquosos e números ímpares a extratos orgânicos.

As medidas nesse experimento foram feitas com paquímetro, e foram dadas em mm. No teste de normalidade de Shapiro-Wilk, os cálculos obtidos para cada grupo estão representados na tabela 2, e todos os 15 grupos testados apresentaram-se na curva de normalidade, o que levou à análise paramétrica do tipo ANOVA de um fator e teste posterior de Tukey. Ainda, a análise de Levene resultou em $p=0,029563$ e o teste de Welch em $p=0$, $F_{stat}=250.3883$. A ANOVA de um fator realizada com os 15 tratamentos resultou em $F_{(14,75)}=360,6$; $p<0,0001$, $\eta^2=0,9854$. De acordo com a análise, o extrato vegetal que mais apresentou atividade em relação à clorexidina 1% foi N271 ($p=0,5819$) e em relação à estreptomicina 10 µg foram os extratos N1305 ($p=0,9904$) e N2161 ($p=0,9904$). Em termos da verificação da análise de tamanho da amostra para ANOVA de um fator, feito com base no valor do tamanho de efeito de η^2 de 0,9854, não foi possível obter o tamanho da amostra pelo teste usado.

5.2.1.3 Ensaio da disco difusão em ágar em experimento com tamanho amostral adequado segundo cálculo de tamanho da amostra para obtenção do diâmetro do halo de inibição

A partir de análises anteriores, o tamanho da amostra adequado para essa análise foi de 11 a 15, obtidos dos experimentos pilotos 1 e 2, respectivamente. Com base nos cálculos, esse experimento foi feito com $n=15$, totalizando $N=225$. Os dados foram submetidos ao teste de identificação de outliers e foram identificados 3 (CHX1% 19,52 e 12,52; e N272 10,27). Ao se rodar o teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnoff novamente, verificou-se que todas as amostras apontaram normalidade, exceto para N272 ($p=0,0498$ e $p=0,0303$ antes de se retirar os outliers). Por esse motivo decidiu-se realizar o teste de K-W e teste posterior de Dunn's. Os resultados mostram valores relacionados a 9 tratamentos, valor total de 225. $K-W=97,33$; $p<0,0001$. Com relação à clorexidina 1%, verificou-se que os extratos obedeceram a seguinte ordem de atividade: N1395 ($p=0,0707$), N1259 ($p=0,0486$), N1305 ($p=0,0149$), N271 ($p=0,0001$), N1005 ($p=0,0002$), N2161 ($p<0,0001$), N1489 ($p<0,0001$) e N272 ($p<0,0001$). A figura 8 e a tabela 4 mostram o gráfico e a tabela com os dados obtidos dessa análise.

Figura 8. Análise do experimento feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, $n=30$, $N=270$. O teste de Kruskal-Wallis e o posterior de Dunn's mostraram as diferenças entre os grupos, significância se $p<0,05$. A= $P>0,05$; B= $p<0,05$; C= $p<0,001$ e D= $p<0,0001$.



Fonte: autoria própria.

Tabela 4. Medidas dos diâmetros dos halos de inibição em disco difusão em ágar dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, com n obtido após cálculo de tamanho da amostra com base nos experimentos 1 e 2 anteriores. Medidas dadas em milímetros.

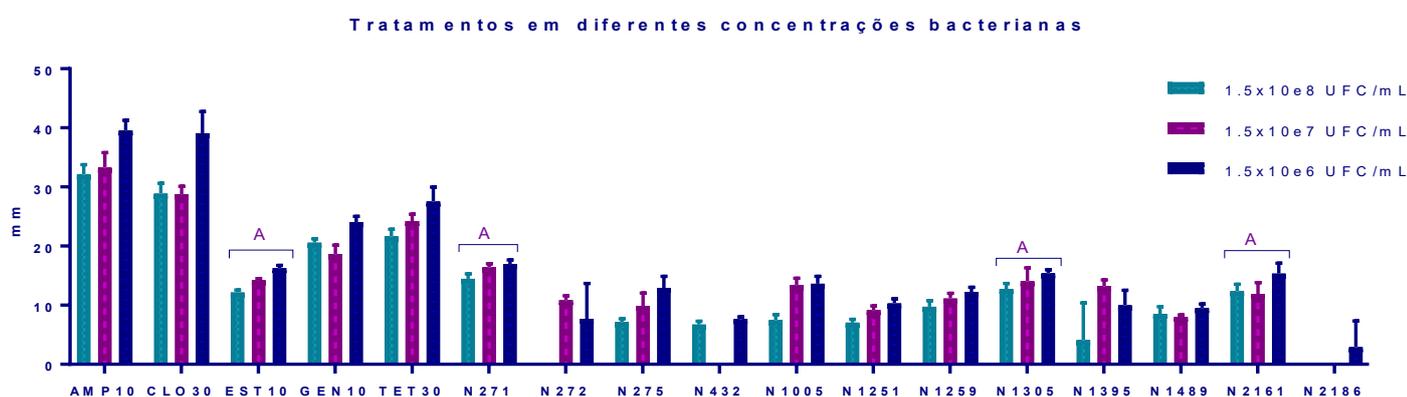
Medidas	CHX 1%	N271	N272	N1005	N1259	N1305	N1395	N1489	N2161
1	15,54	10,4	6,41	10,86	9,89	10,44	8,77	8,37	9,52
2	15,56	8,9	7,69	8,78	8,7	8,12	9,12	8,16	7,61
3	14,57	9,22	6,45	9,21	7,61	8,77	11,47	8,31	10,41
4	14,68	8,02	7,44	9,53	8,13	9,25	10,96	8,31	9,53
5	15,49	7,15	6,55	6,88	8,38	8,12	7,11	8,48	7,17
6	17,33	7,95	7,15	8,06	10,43	9,39	8,14	8,03	7,63
7	19,52	7,9	7,14	7,51	6,97	8,6	8,44	7,29	7,14
8	15,9	7,09	7,32	7,32	8,59	9,91	8,74	7,61	8,38
9	14,89	9,08	6,1	7,44	9,24	8,44	8,31	7,64	7,17
10	12,52	7,24	5,81	9,35	9,73	9,72	10,39	6,89	7,21
11	14,49	10,22	6,31	7,59	9,48	8,52	10,37	7,41	7,35
12	15,56	8,08	5,9	8,85	8,98	7,87	7,21	7,11	9,92
13		6,93	8,09	11,57	9,4	8,3	8,83	6,31	9,54
14		10,54	6,24	6,96	9,53	8,1	8,51	6,45	8,33
15		8,73	7,8	7,69	9,18	10,49	9,38	7,08	8,24
16		8,89	7,97	9,33	10,4	9,31	8,74	8,26	8,75
17		8,15	10,27	8,32	9,79	8,33	10,3	8,33	9,17
18		8,74	7,7	8,23	9,9	8,97	10,18	8,43	7,86
19		8,49	7,09	7,64	7,97	8,62	8,79	8,12	8,3
20		9,13	6,47	9,17	8,71	9,2	8,95	8,84	8,53
21		7,21	6,56	6,41	9,4	8,78	7,58	8,58	6,09
22		7,37	5,87	8,21	7,03	10,57	9,31	7,38	7,06
23		8,83	5,46		8,82	7,91	9,07	6,81	7,53
24		6,68	6,12		8,02	9,66	8,4	6,32	9,69
25		9,76	6,58		9,24	8,38	9,86	7,47	
26		8,6			9,63	8,12	10,15	7,45	
27		6,28			8,05	7,57	9,26	7,84	
28					9,94	8,07	9,27	8,45	
29					9,24		7,72	6,96	
30					8,68		9,28	7,14	

5.2.1.4 Experimento com variação na concentração da suspensão bacteriana para obtenção do diâmetro do halo de inibição

Esse experimento foi realizado para se avaliar o potencial antimicrobiano dos tratamentos em função da concentração da suspensão bacteriana, que variou entre $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, $1,5 \times 10^7$ UFC/mL, $1,5 \times 10^6$ UFC/mL, com as outras

condições sendo mantidas iguais. A figura 9 mostra os resultados da ANOVA de dois fatores obtidos dessa análise. O tratamento afetou a variância total do experimento em 88,99% ($F_{(16,255)}=429,63$; $p<0,0001$), a concentração bacteriana afetou em 3,67% da variância total ($F_{(2,255)}=141,71$; $p<0,0001$) e a interação entre os dois fatores afetou 4,04% da variância total ($F_{(32,255)}=9,76$; $p<0,0001$). Entre os tratamentos em diferentes concentrações bacterianas, observou-se que os antibióticos testados apresentaram halos de inibição maiores que os observados para os extratos vegetais, de modo geral. Portanto, somente os extratos vegetais que conseguiram apresentar halos de inibição cujo diâmetro se equiparou estatisticamente a algum antibiótico está demonstrado no gráfico da figura 9. Observa-se que todos os antibióticos testados são mais eficazes na atividade antimicrobiana do que os extratos vegetais, porém, os extratos N271, N1305 e N2161 mostraram-se muito ativos, de modo estatisticamente similar à estreptomicina 10 μg .

Figura 9. Análise do experimento feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, $n=6$, $N=75$. Análise de variância do tipo ANOVA de dois fatores e teste posterior de Tukey comparando os resultados dos tratamentos entre si, que mostraram as semelhanças ou diferenças entre os grupos, significância se $p<0,05$.



Fonte: autoria própria.

A tabela 5 reporta os resultados obtidos dos diâmetros dos halos de inibição do ensaio realizado com variação na concentração da suspensão bacteriana.

Tabela 5. Medidas dos diâmetros dos halos de inibição em disco difusão em ágar dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*, a partir da análise no modelo da disco-difusão em ágar testado em três concentrações bacterianas diferentes. Medidas dadas em milímetros.

	1.5x10 ⁸ UFC/mL						1.5x10 ⁷ UFC/mL						1.5x10 ⁶ UFC/mL					
AMP10	31.97	29.78	32.9	33.6	30.61	33.83	33.4	37.22	34.76	31.62	29.94	32.58	37.76	40.16	38.22	42	38.26	40.94
CLO30	27.07	30.23	28.13	31.72	28.41	27.75	28.97	28.3	30.76	29.66	28.06	26.88	43.02	42.51	34.7	34.7	40.24	39.5
EST10	12.3	12.42	12.66	12.02	11.55	12.1	14.47	14.19	14.48	13.93	14.03	14.44	16.08	15.79	16.34	15.89	16.8	16.8
GEN10	21.43	21.17	20.38	20.76	19.72	20.05	20.7	20.08	18.79	18.07	16.75	17.32	22.44	24.9	25.31	24.03	23.84	23.7
TET30	22.58	21.77	23.04	21.73	21.07	19.65	22.55	23.5	25.38	25.38	23.64	24.86	31.46	29.66	25.78	25.08	26.34	26.68
N271	14.32	13.48	14.37	13.82	15.86	14.89	16.78	16.66	16.16	15.35	16.68	16.94	17.76	16.9	17	17.52	16.95	15.71
N272	0	0	0	0	0	0	9.79	11.25	11.95	10.35	11.1	10.68	0	0	12.63	11.27	10.63	11.62
N275	7.71	7.1	6.42	6.5	7.84	7.23	10.83	11.29	9.49	12.84	7.73	7.22	12.49	11.83	11.08	11.78	16.09	14.43
N432	7.58	6.71	7.19	6.33	6.52	5.96	0	0	0	0	0	0	7.21	7.22	7.55	7.95	7.81	8.12
N1005	9.19	7.69	6.89	6.46	7.45	7.07	14.33	14.88	12.43	13.96	12.1	12.65	12.38	12.55	15.08	12.83	14.98	14.11
N1251	7.47	6.81	7.69	7.35	6.14	7.01	10.38	9.44	8.78	8.32	9.18	9.13	10.77	9.97	8.99	10.64	10.06	11.3
N1259	11.28	10.32	9.32	9.63	9.64	8.18	11.62	12.52	10.3	10.04	11.11	11.11	13.36	12.33	12.91	11.36	11.87	11.68
N1305	13.8	13.42	13.53	11.67	11.86	12.32	14.72	15.05	12.14	10.46	15.84	16.15	15.62	14.92	14.68	15.11	16.02	16.07
N1395	0	0	0	0	12.22	12.23	12.02	12.45	13.19	12.97	14.93	13.8	10.2	11.1	13.05	11.67	7.14	6.83
N1489	9.88	9.9	8.09	8.66	7.87	6.97	8.41	7.73	8.23	7.78	8.28	7.8	8.96	9	9.12	9.59	10.74	9.7
N2161	11.19	11.26	14.12	13.2	11.84	12.69	13.68	13.61	9.23	10.11	11.68	13.23	17.18	17.83	14.97	14.79	13.81	13.64
N2186	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.74	8.51

5.2.2 Obtenção das concentrações bactericidas mínimas a partir do ensaio da microdiluição em caldo

O teste da microdiluição em caldo (MDC) foi usado para se obter a concentração bactericida mínima, para os 12 extratos vegetais ativos selecionados na triagem feita anteriormente. O teste da MDC foi feito com *L. monocytogenes* em suspensão de 1,5x10⁸ UFC/mL. Os dados são apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Concentrações bactericidas mínimas (CBM) para os extratos vegetais ativos contra *Listeria monocytogenes* obtidas pelo método da microdiluição em caldo (MDC).

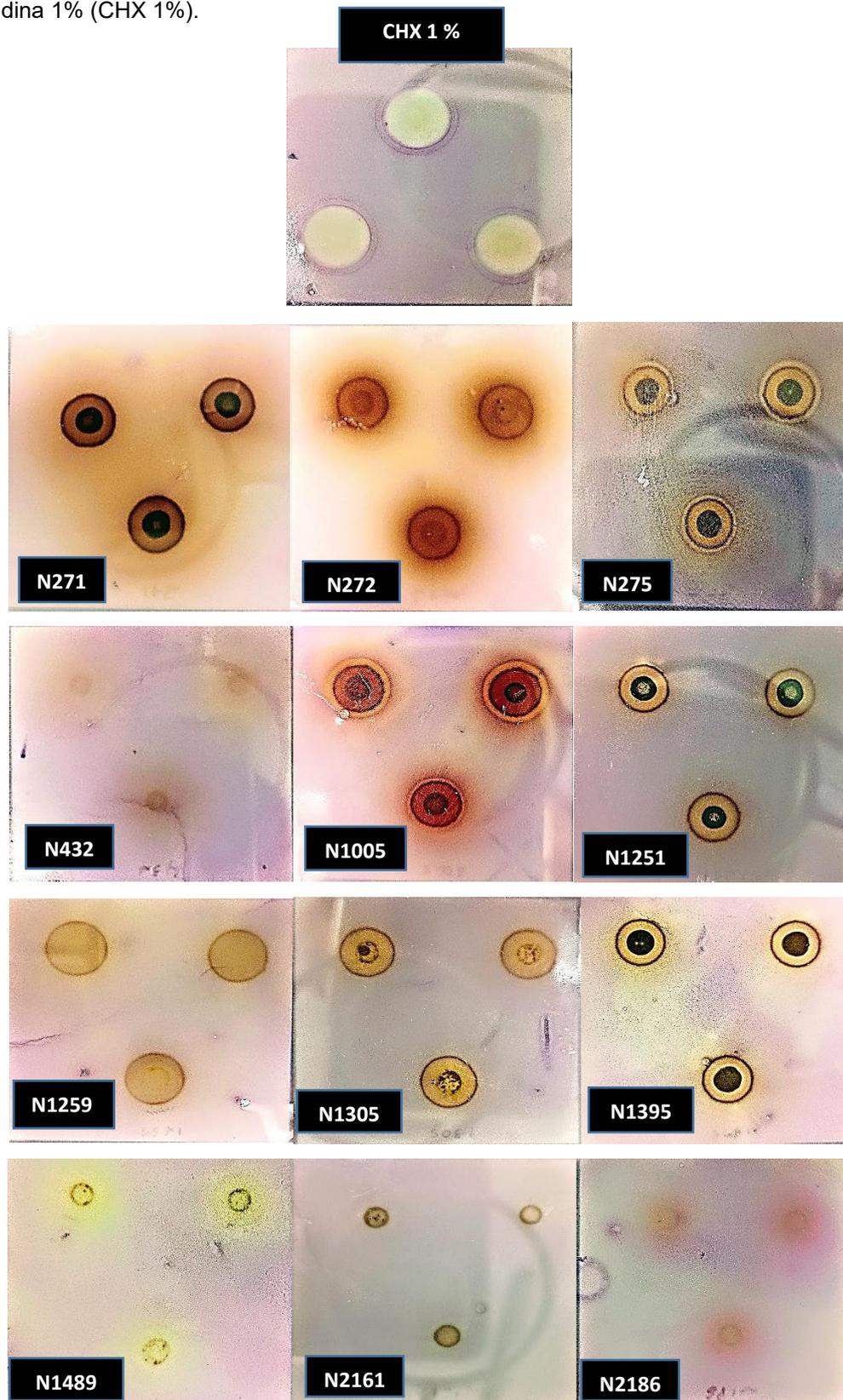
	1.5 x 10 ⁸ UFC/mL
Extrato (mg/mL)	
CHX (0,05%)	CBM
N271	10
N272	1.25
N275	5
N432	1.25
N1005	0.156
N1251	0
N1259	1.25
N1305	0.156
N1395	2.5
N1489	1.25
N2161	2.5
N2186	1.25
CHX	>0.03125

5.3 Resultados dos experimentos em bioautografia

5.3.1 Difusão em bioautografia - DeB

Os 12 extratos ativos foram testados no modelo de difusão em bioautografia para se verificar o comportamento de cada amostra de extrato aplicada sobre substrato de sílica gel, que é o material que compõe as placas cromatográficas usadas em bioautografia. Nesse primeiro experimento em bioautografia, cada amostra foi aplicada sobre a camada de sílica da placa cromatográfica. Após o desenvolvimento da técnica, é possível se verificar como as substâncias presentes em cada extrato se difundem no ágar a partir da sílica gel, em relação à difusão anteriormente observada a partir do disco de papel, na DDA. A partir dessa análise, é possível se determinar quais serão os extratos que podem ser analisados nas outras técnicas em bioautografia. Os extratos N271, N275, N1005, N1251, N1305, N1395 e N2186 apresentaram a formação de halo de inibição ao redor do disco de celulose aplicado na sílica, confirmando desta forma, a atividade antibacteriana destes extratos pelo método da DeB. É notada a formação dos halos de inibição da clorexidina 1%, sendo esta considerada como substância padrão neste experimento.

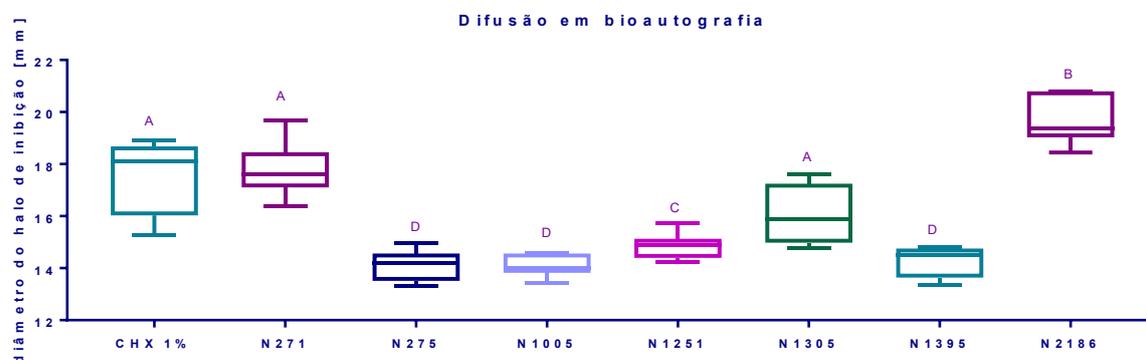
Figura 10. Placas de sílica com a análise da difusão em bioautografia (DeB), realizada em triplicata com os 12 extratos. Verificou-se a formação de halos de inibição nos extratos N271, N275, N1005, N1251, N1305, N1395 e N2186. O experimento tomou como padrão o gluconato de clorexidina 1% (CHX 1%).



Fonte: autoria própria.

Das 12 amostras de extratos selecionadas como ativas no modelo de difusão em ágar, sete amostras apresentaram halo de inibição no modelo da DeB. Esses extratos foram analisados estatisticamente em sextuplicata quanto à atividade antibacteriana, em comparação com a clorexidina 1%, como pode ser visto na figura 11 e na tabela 7. Nessa análise, os grupos apresentaram dados dentro da normalidade, pelo método de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$), por isso, foram analisados por ANOVA de um fator e teste posterior de Tukey. Houve diferença entre as médias ($F_{(7,40)}=30,78$; $p < 0,0001$; $\eta^2=0,8434$). Os extratos mais ativos nesse modelo foram o N2186, cujo halo de inibição foi maior do que o observado para a clorexidina 1% ($p=0,0062$), N271 que mostrou atividade similar à da clorexidina 1% ($p=0,9998$), seguidos do extrato N1251, menos ativo que a clorexidina (0,0003), e dos extratos N275, N1005 e N1395, muito menos ativo que a clorexidina ($p < 0,0001$ para os três extratos em relação à clorexidina 1%).

Figura 11. Análise do experimento feito com a técnica da disco-difusão em ágar a partir dos extratos selecionados na triagem, $n=7$, $N=42$. Análise de variância do tipo ANOVA de dois fatores e teste posterior de Tukey comparando os resultados dos tratamentos entre si, que mostraram as semelhanças ou diferenças entre os grupos, significância se $p < 0,05$.



Fonte: autoria própria.

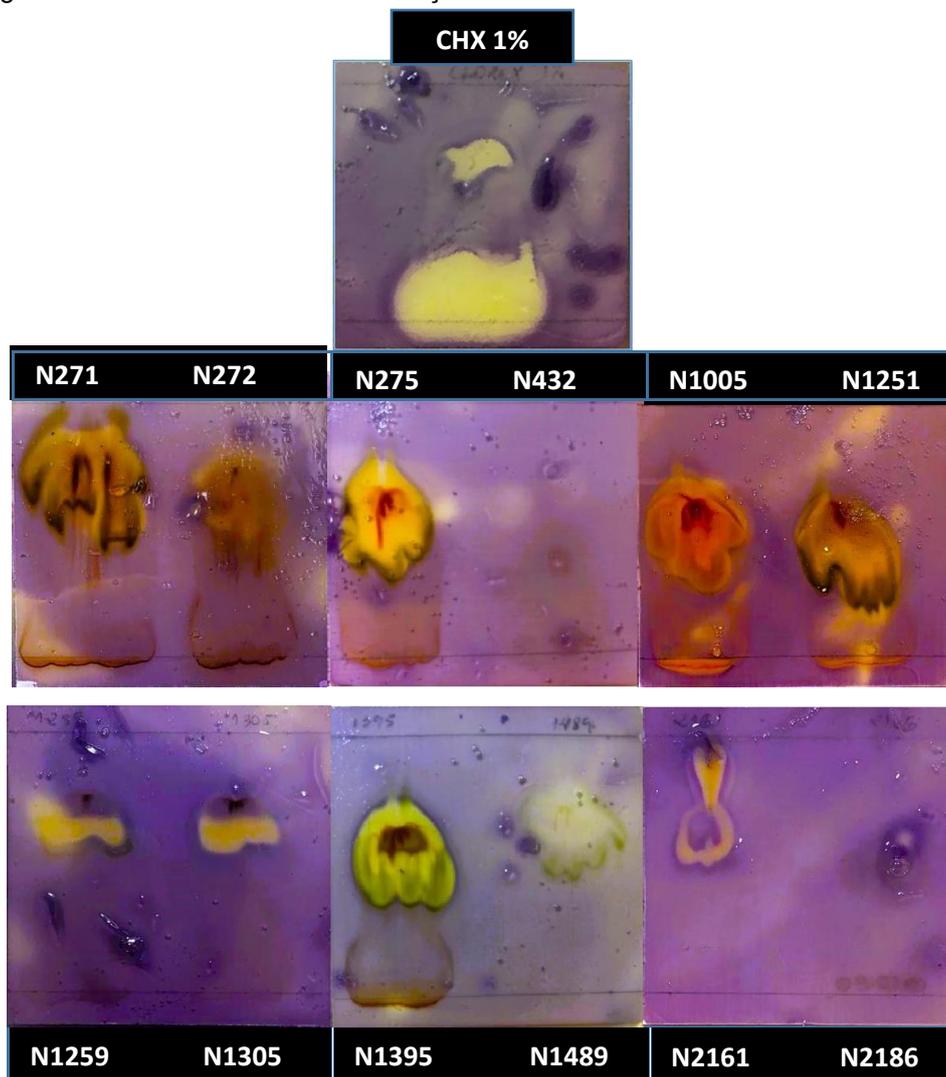
Tabela 7. Medidas dos diâmetros dos halos de inibição obtidos do experimento de difusão em bioautografia dos extratos vegetais selecionados e de antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes*. Medidas dadas em milímetros.

Medidas	CHX 1%	N271	N275	N1005	N1251	N1305	N1395	N2186
1	18,92	18,04	14,05	14,05	14,9	17,12	14,8	18,45
2	17,77	19,7	14,3	14,55	14,45	17,62	14,37	19,47
3	18,6	17,42	13,58	13,43	14,9	14,75	14,74	19,24
4	18,42	17,82	14,43	13,95	14,92	15,05	13,37	20,79
5	15,26	16,4	13,32	14,6	14,25	16,5	13,73	19,22
6	16,28	17,34	14,96	13,99	15,74	15,26	14,6	20,8

5.3.2 Bioautografia unidimensional

Foi notada a presença de halos de inibição com a maioria dos extratos, totalizando 11 extratos com formação evidente de halo. Tomando-se a clorexidina a 1% como padrão, observou-se que os extratos N271, N272, N275, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N1489, N2161 e N2186, apresentaram a formação de halos de inibição. Os extratos orgânicos, numerados com número ímpares, tiveram melhor desempenho de atividade antimicrobiana. O extrato aquoso N432 não apresentou formação de halo, entretanto é notável a formação de halo apresentada pelo extrato aquoso N272.

Figura 12. Cromatogramas obtidos da análise de dois extratos vegetais, no modelo da bioautografia unidimensional. Halos de inibição observados em 11 dos 12 extratos analisados.

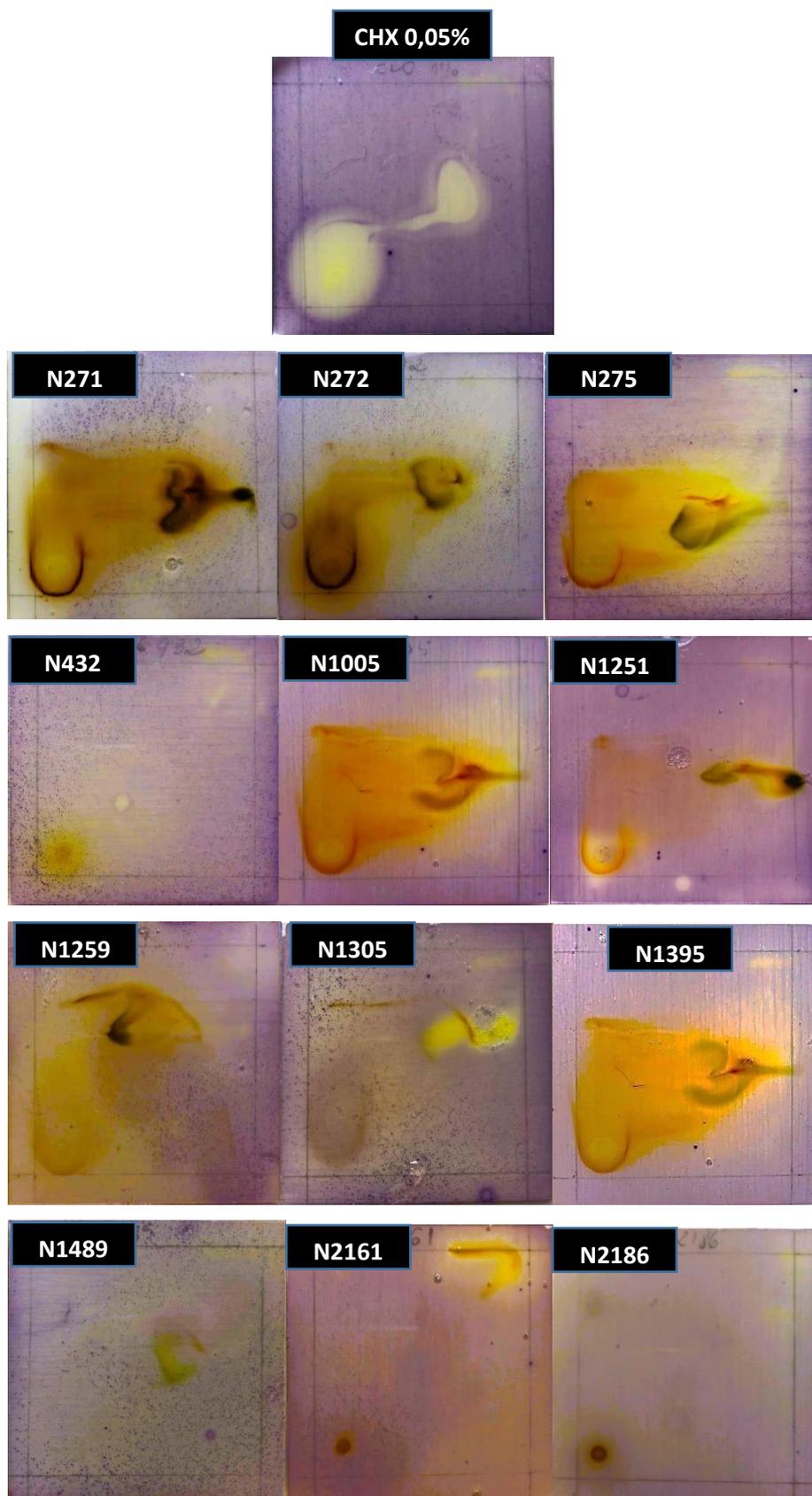


Fonte: autoria própria.

5.3.3 Bioautografia bidimensional

Assim como na bioautografia unidimensional, os resultados positivos foram identificados quando houve o aparecimento de halos de inibição sobre as manchas do cromatograma, ressaltadas pela adição de 0,5 mL de corante de viabilidade MMT, um sal de tetrazólio, na concentração de 0,5 mg/mL. Foi observado a formação de halos de inibição em 6 extratos, sendo eles: N271, N272, N1005, N1251, 1259 e N1395.

Figura 13. Cromatogramas obtidos a partir da análise de um extrato vegetal por placa, na técnica de bioautografia bidimensional. Observam-se halos de inibição de crescimento bacteriano nos extratos N271, N272, N1005, N1251, N1259 e N1395.



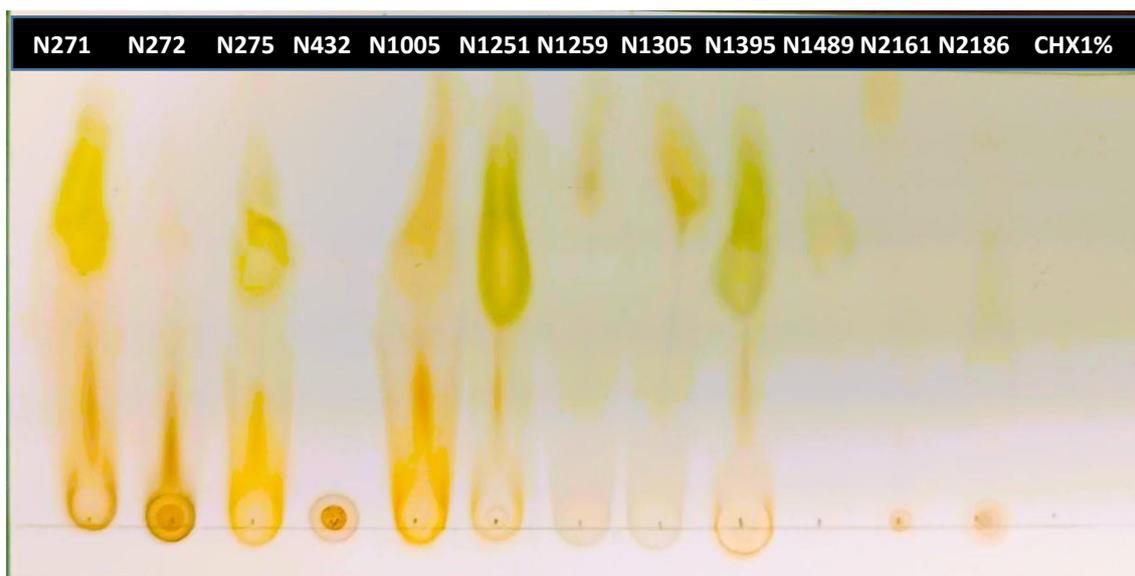
Fonte: autoria própria.

5.4 Análise dos cromatogramas após a aplicação de reveladores na cromatografia de camada delgada

5.4.1 Reativo de Kedde (ácido 3,5)

O reagente de Kedde, ácido 3,5-dinitrobenzóico a 3% foi diluído em hidróxido de potássio 2M (Merck, Darmstadt, Alemanha), com o qual a verificação de pontos roxos ou azul violeta ao visível é indicativo da presença de cardenólidos (SUFREDINI *et al.*, 2017). Dos doze extratos aplicados nas placas de cromatografia, nenhum apresentou a coloração correspondente para a determinação da presença de glicosídeos cardioativos.

Figura 14. Cromatograma com os 12 extratos vegetais ativos e a clorexidina a 1%, após a aplicação do reativo de Kedde (ácido 35), para determinação de presença de glicosídeos cardioativos, a partir da observação do aparecimento de coloração azul-violeta sob luz visível. Na placa abaixo, não foi observado a coloração azul-violeta.

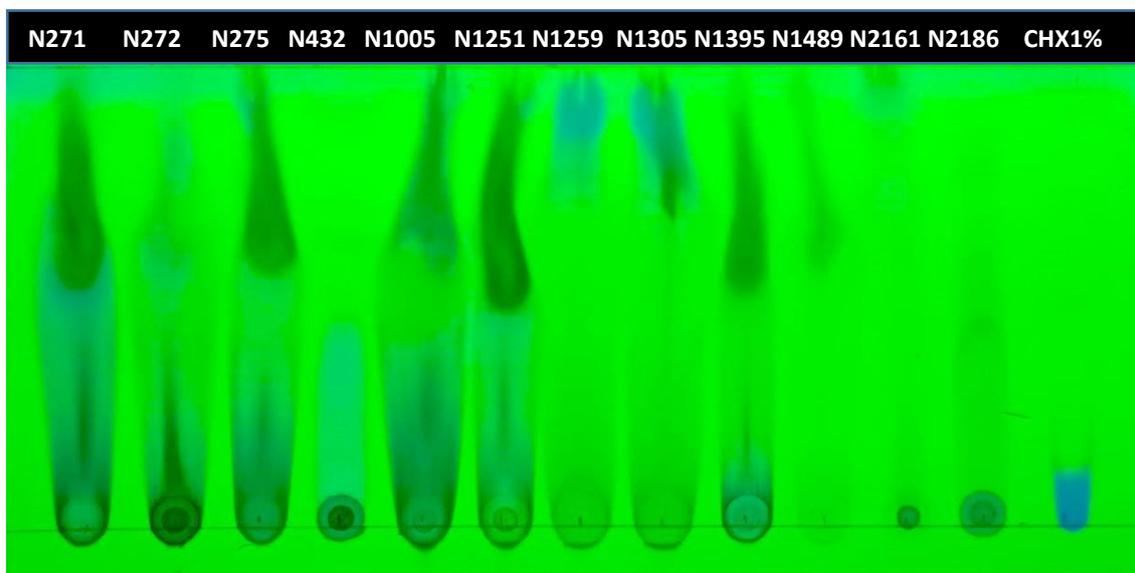


Fonte: autoria própria.

5.4.2 Reativo H₂SO₄ a 20%

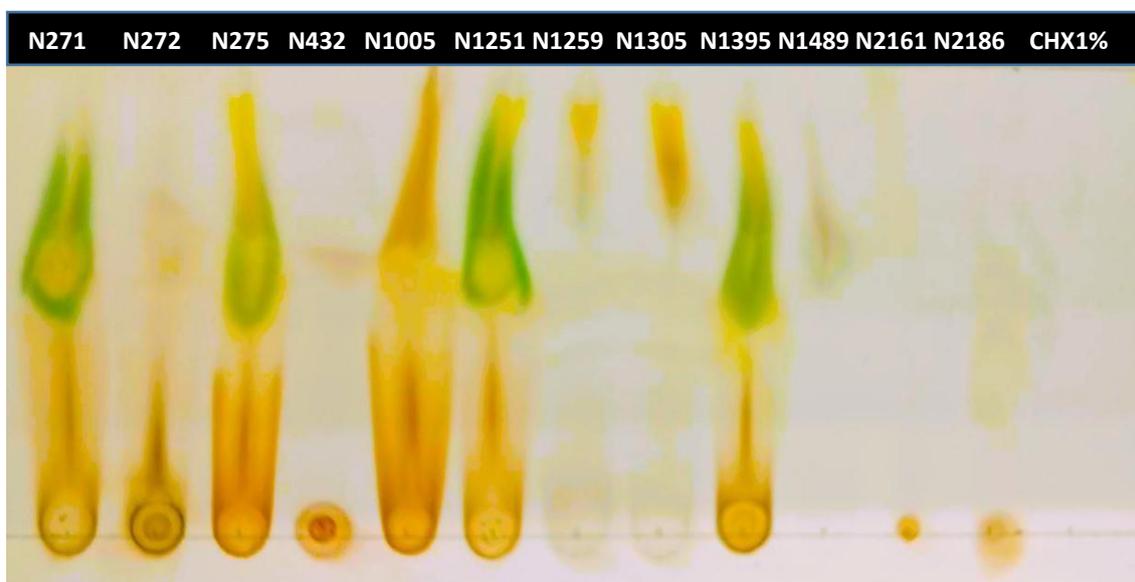
O reativo H₂SO₄ a 20% diluído em água destilada seguido de aquecimento a 105°C por 10 min foi utilizado como reagente para a verificação geral de compostos secundários (WAGNER; BLADT, 1996).

Figura 15. Cromatograma com a visualização da corrida sob luz U.V. com comprimento de onda de 254 nm. Foram observadas a presença de manchas azuladas, indicativas de compostos fenólicos, em algumas amostras.



Fonte: autoria própria

Figura 16. Cromatograma após a aplicação do reativo H_2SO_4 a 20%, com posterior aquecimento a $105^\circ C$, com a visualização da corrida no visível.



Fonte: autoria própria.

Figura 17. Cromatograma com visualização sob luz U.V. com comprimento de onda de 365 nm. as manchas azuladas sugerem a presença de ácidos fenólicos na linha de frente. As manchas avermelhadas são clorofila.

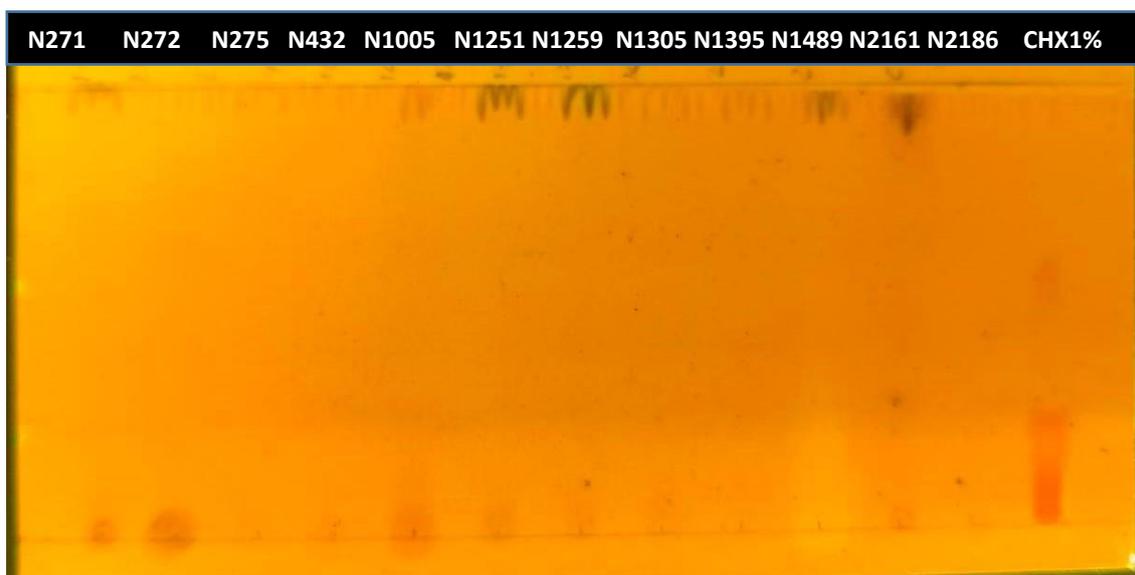


Fonte: autoria própria.

5.4.3 Reativo de Dragendorff

O reagente de Dragendorff foi preparado a partir de uma mistura de 0.85 g de nitrato básico de bismuto, $4[\text{Bi}(\text{NO}_3)(\text{OH})_2]\text{BiO}(\text{OH})$, diluído 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água destilada, e uma solução de 8 g de iodeto de potássio e água destilada na proporção de 1:1. A presença de alcaloide nos extratos é determinada pelo aparecimento de manchas ou pontos alaranjados ou marrons nos cromatogramas após a borrifação do reagente (WAGNER; BLADT, 1996). Os extratos N271, N272, N275, N1005, N1251 e N1259, N1305, N1395, N1489 e N2161, apresentaram manchas na cor laranja no ponto de aplicação do extrato, e o gluconato de clorexidina, que contém presença significativa de amidas, reagiu ao reagente de Dragendorff, mas é um falso-positivo.

Figura 18. Cromatograma após a aplicação do reagente de Dragendorff. Nota-se a presença de manchas de cor laranja no ponto de aplicação das amostras, indicativos de alcaloides. Observação da corrida sob luz visível.

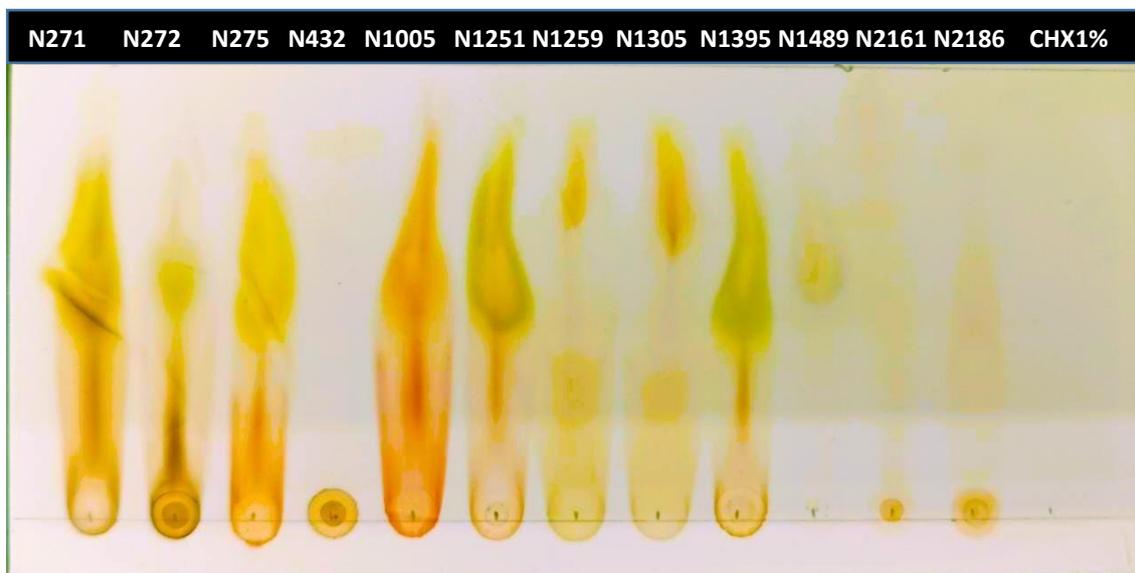


Fonte: autoria própria

5.4.4 Reativo KOH 5%

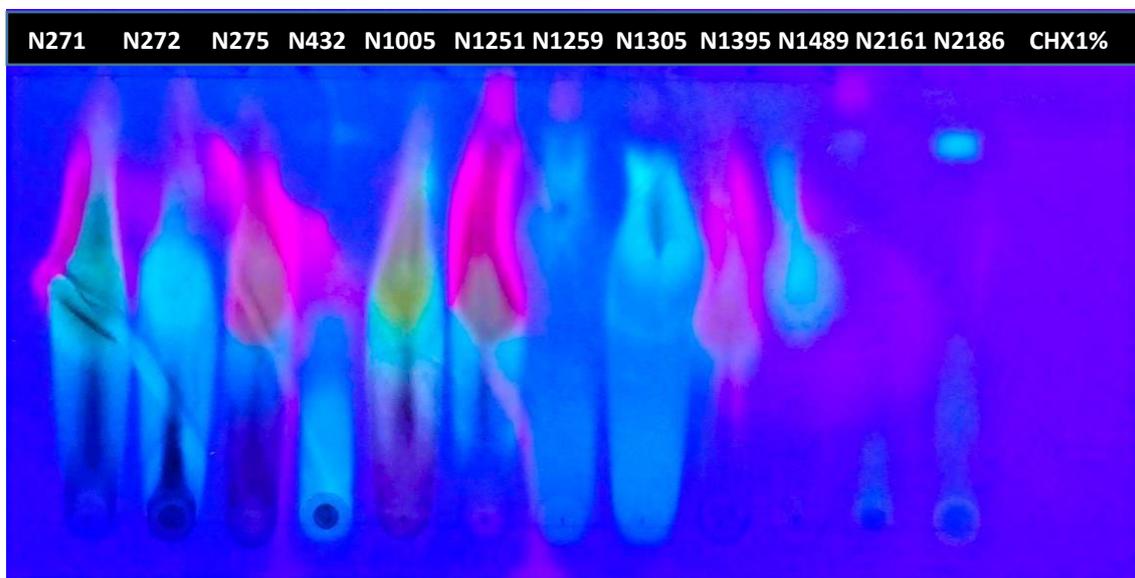
O reativo KOH 5% foi diluído em etanol (Merk, Darmstadt, Alemanha). Manchas amareladas no visível indicam a presença de antraquinona. O cromatograma foi observado na luz visível (WAGNER; BLADT, 1996). No UV-C de 365 nm foi possível a observação de antraquinonas (espectro de luz vermelho), antronas (espectro de luz amarelo) e cumarinas (espectro de luz azul) (WAGNER; BLADT, 1996). A maioria dos extratos apresentaram manchas amarelas no visível, indicando a presença de antraquinonas (extratos N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1259 e N1395). No UV-C de 365 nm foi observada a detecção de antraquinona, que é determinada pelo espectro de luz vermelho, antrona amarelo e cumarina em azul. Os extratos N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1259, N1489, N2161 e N2186 apresentaram manchas azuladas indicando a presença de cumarina. Apenas o extrato N1005 apresentou a presença de antrona, e os extratos N271, N272, N275, N432, N1251, N1395 apresentaram manchas avermelhadas, características de antraquinonas

Figura 19. Cromatograma após a aplicação do reativo KOH 5%, observado sob luz visível, os extratos N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1259, N1395 apresentaram manchas amareladas, indicativo da presença de antraquinonas.



Fonte: autoria própria.

Figura 20. Cromatograma após a aplicação do reativo KOH 5%, com visualização da corrida sob luz U.V. de comprimento de onda de 365 nm, manchas azuladas indicando a presença de cumarina. Apenas o extrato N1005 a presença de antrons, e os extratos N271, N275, N1251, N1395 apresentaram manchas avermelhadas, características de antraquinonas.



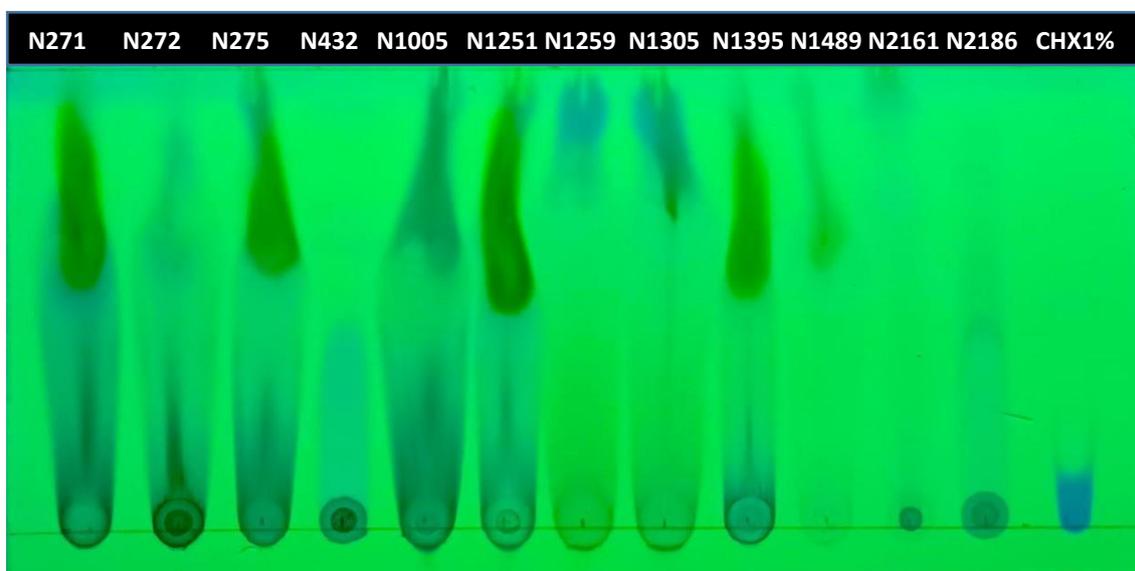
Fonte: autoria própria.

5.4.5 Reativo NP

O reagente difenilboriloxietildiamina (Reagente NP, Merck, Darmstadt, Alemanha) – foi diluído em metanol, e em seguida foi borrifado sobre o cromatograma para se analisar sob luz U.V., nos dois comprimentos de onda, 254 nm e 365 nm, para a verificação de possível presença de compostos

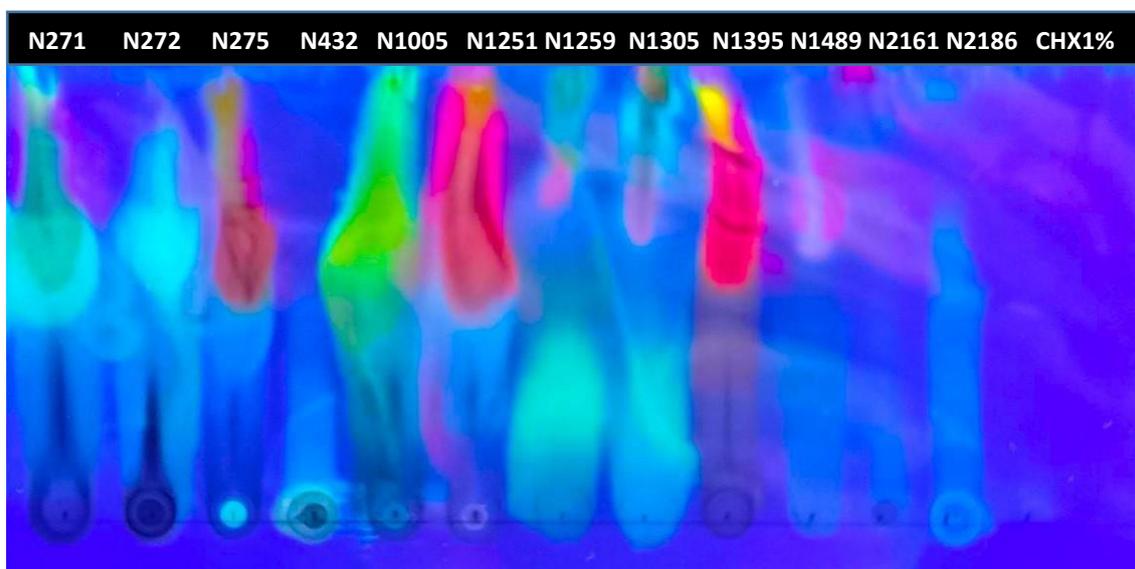
fenólicos (manchas roxas, verdes e laranja indicam a presença de compostos fenólicos, a exemplo do grupo dos flavonoides) (WAGNER; BLADT, 1996). Os extratos N271, N275, N1259 e N1395, de acordo com o cromatograma, apresentaram manchas verdes, indicativas de compostos fenólicos. Para o cromatograma em UV-C de 265 nm os extratos N271, N272, N1005, N1259, N1305, N1489 e N2161 apresentaram espectro de cor para compostos fenólicos.

Figura 21. Cromatograma com visualização da corrida sob luz U.V. com comprimento de onda de 254 nm. Os extratos N271, N275, N1251, N1259 e N1395, apresentaram manchas verdes indicativas da presença de compostos fenólicos.



Fonte: autoria própria.

Figura 22. Cromatograma com visualização da corrida sob luz U.V. com comprimento de onda de 356 nm. Manchas roxas, verdes e laranjas indicam a presença de compostos fenólicos, logo os extratos N271, N272, N1005, N1259, N1305, N1489 e N2161 apresentam espectro de cor para compostos fenólicos.



Fonte: autoria própria.

5.4.6 Reativo DPPH

A visualização da atividade antioxidante dos extratos foi feita com DPPH diluído a 0,2 mg/mL e borrifado sobre a placa, que apresentou manchas esbranquiçadas em fundo roxo sobre os compostos potencialmente sequestradores de radicais livres. Os extratos N271, N272, N275, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N2161 e N2186 apresentam significativa atividade antioxidante.

Figura 23. Cromatograma com visualização da corrida sob luz visível, notam-se manchas amareladas na corrida dos extratos N271, N272, N275, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N2161 e N2186 representando atividade antioxidante.

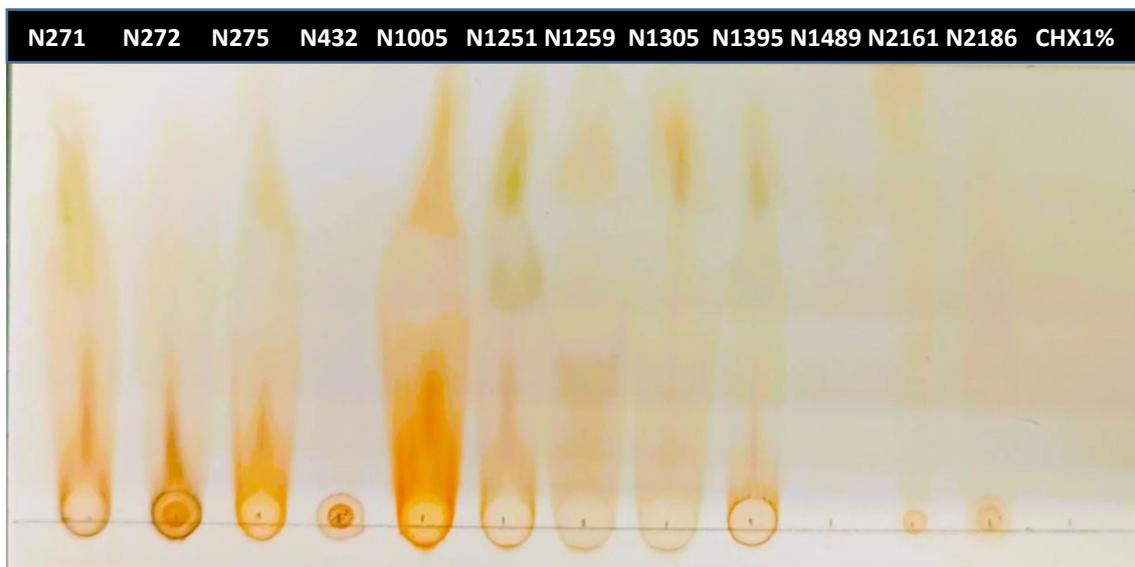


Fonte: autoria própria.

5.4.7 Reativo de β -caroteno

A visualização da atividade antioxidante dos extratos se dá a partir do aparecimento de manchas alaranjadas sobre as substâncias ativas em fundo esbranquiçado (SUFREDINI *et al.*, 2017). Pela observação do cromatograma, os extratos N271, N272, N275, N1005 apresentaram manchas alaranjadas, logo são, os que neste ensaio, apresentaram maior atividade antioxidante.

Figura 24. Cromatograma com aplicação da solução com β -caroteno, notam-se manchas alaranjadas na corrida de alguns extratos. Os extratos N271, N272, N275 e N1005 apresentaram atividade antioxidante.



Fonte: autoria própria.

5.4.8 Resultados dos cálculos de Rf (fator de retenção) dos extratos, após a corrida e aplicação dos reveladores nos cromatogramas

O cálculo do fator de retenção (Rf) em CCD é uma medida que indica a distância relativa percorrida por um composto em um sistema cromatográfico definido. O Rf é definido com a razão entre a distância percorrida pelo composto (mancha) e a distância percorrida pela fase móvel, a partir do ponto de aplicação. No experimento, o ponto de aplicação correspondeu a 0,5 cm da base da placa cromatográfica e a frente da fase móvel correspondeu a 0,5 cm da placa, logo a fase móvel percorreu 4 cm, considerando que a placa tem 5 cm x 5 cm.

A fórmula geral para calcular o Rf em CCD é a seguinte:

$$Rf = \text{distância percorrida pelo composto} / \text{distância percorrida pela fase móvel}$$

O resultado da Rf é uma grandeza adimensional. A tabela 8 abaixo descreve os valores dos Rfs obtidos para os extratos vegetais analisados.

Tabela 8. Valores de Rf calculados para cada cromatograma obtido com reveladores específicos para prospecção de classes químicas presentes nos extratos vegetais antibacterianos.

Número do extrato	Kedde	H ₂ SO ₄ 20%	Dragendorff	KOH 5%	NP	DPPH	β-caroteno
N271	0,925	0,86	Indeterminado	0,825	0,9225	0,875	0,775
N272	0,8	0,875	Indeterminado	0,8	0,8	0,85	0,75
N273	0,975	0,925	Indeterminado	0,875	0,975	0,825	0,725
N432	0	0,6	Indeterminado	0	0	0	0
N1005	1	1	Indeterminado	0,9	1	0,925	0,975
N1251	0,925	0,925	Indeterminado	0,85	0,95	0,8	0,825
N1259	0,975	0,9	Indeterminado	0,85	0	0,975	0,875
N1305	0,95	0,95	Indeterminado	0,875	1	0,925	0,85
N1395	0,975	0,925	Indeterminado	0,975	0,925	0,975	0,875
N1489	0,7	0,975	Indeterminado	0,85	0,75	0,6	0,8
N2161	1	0,975	Indeterminado	0,625	1	1	1
N2186	0,675	0,575	Indeterminado	0,85	0,625	0,775	0,625
CHX 1%	*0	*0	*0,25	*0	*0	*0	*0

Legenda: (*) o valor de Rf obtido para a clorexidina frente ao reagente de Dragendorff é um falso positivo, por conta da estrutura nitrogenada da clorexidina.

5.5 Análise dos ensaios relacionados à atividade sequestradora de radicais livres e atividade antioxidante dos extratos vegetais antibacterianos

5.5.1 Resultado do teste do DPPH em autografia

Dentre as diferentes metodologias para a avaliação da atividade antioxidante de extratos naturais, a atividade sequestrado do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidraliza (DPPH) é umas das mais utilizadas como ferramenta bioquímica por sua ação frente a um determinado antioxidante, apresentando o DPPH uma coloração ligeiramente púrpura reduzido a difenil-picril-hidrazina, que possui coloração amarela, monitorada pelo decréscimo da absorbância em uma banda de 520 nm (MOLYNEUX, 2004; PISOSCHI, 2016).

Radicais livres podem ser definidos como moléculas orgânicas e inorgânicas ou átomos que contêm um ou mais elétrons, não pareados na última cadeia eletrônica, com existência independente. São altamente reativos, sendo capazes de reagir com qualquer composto situado próximo a sua órbita 12 externa, tendo função oxidante ou redutora (HALLIWELL, 1994; VALKO, 2007).

Desta forma, a investigação da atividade antioxidante dos extratos ativos pode ser realizada e mensurada por sua atuação contra os radicais livres,

possibilitando a alguns deles, uma defesa antioxidante satisfatória frente aos componentes disponíveis para inativá-los. Dentre os 12 extratos ativos, 10 extratos apresentaram atividade antioxidante significativa, sendo eles: N271, N272, N275, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N2161 e N2186.

5.5.2 Resultado do ensaio do β -caroteno em autografia

Este método fundamenta-se na medida espectrofotométrica da descoloração (oxidação) do β -caroteno que é induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006). Neste ensaio os extratos N271, N272, N275 e N1005 apresentaram maior poder de oxidação do β -caroteno.

5.6 Resultados do teste de Folin-Ciocalteu

O teste de Folin-Ciocalteu foi utilizado para a obtenção do teor de compostos fenólicos totais nas amostras dos extratos observados, calculados como mg de TR e de RU, que foram os padrões utilizados no experimento. A intensidade do azul obtido na reação ocorrida é dependente da quantidade de substâncias redutoras ou substâncias fenólicas. Entretanto, é válido ressaltar que o reagente de Folin-Ciocalteu não é específico para grupos fenólicos, podendo sofrer interferência de outras moléculas redutoras presentes na amostra, tais como: ácido ascórbico, proteínas e açúcares redutores (IKAWA *et al.*, 2003). A tabela 9 relaciona a concentração (mg/mL) de TR e RU com a quantidade de compostos fenólicos totais, expressos em mg de TRU e RU. A partir dos valores obtidos das absorvâncias para cada concentração equivalente de TR e RU, foi possível traçar curvas de calibração (curvas-padrão) utilizando os pontos experimentais (Figura 25), obteve-se desta forma, a equação da reta para o TU e a RU.

Tabela 9. Concentração de trolox e rutina (mg/mL) *versus* a massa (mg) obtida para o valor de compostos fenólicos totais nestes padrões.

Dados Trolox e Rutina					
Trolox			Rutina		
mg/mL	mg	Trolox	mg/mL	mg	Rutina
1	0,2	0,463	1	0,2	0,964
0,5	0,1	0,246	0,5	0,1	0,72
0,25	0,05	0,151	0,25	0,05	0,465
0,125	0,025	0,098	0,125	0,025	0,275
0,0625	0,0125	0,068	0,0625	0,0125	
0,03125	0,00625	0,066	0,03125	0,00625	0,19
0,0156	0,00312	0,047	0,0156	0,00312	0,173
0,0078	0,00156	0,044	0,0078	0,00156	0,192
0,0039	0,00078	0,045	0,0039	0,00078	
0,0019	0,00038	0,042	0,0019	0,00038	
0,001	0,0002	0,044	0,001	0,0002	
0,0005	0,0001	0,042	0,0005	0,0001	

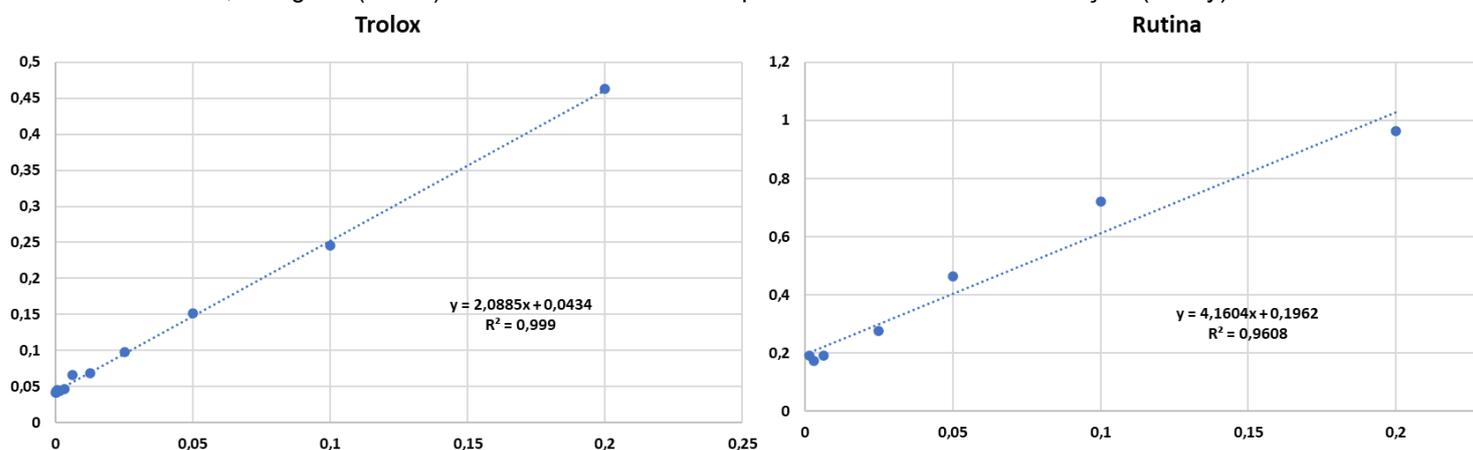
TR

$$y = 2,0885x + 0,0434$$

RU

$$y = 4,160x + 0,01962$$

Figura 25. Curva padrão da concentração x absorvância para trolox e rutina, nas concentrações de 0 a 0,25 mg/mL (eixo x) *versus* a absorvância equivalente a cada concentração (eixo y).



O teor substâncias redutoras em cada extrato vegetal, corresponde aos fenóis totais calculados em mg de TR e RU. Desta forma, os extratos que apresentam o maior potencial antioxidante são citados a seguir, do maior potencial para o menor: N272, N271, N1259, N1005, N275, N1251, N2161, N432, N1489, N1305, N1395, N2186.

Tabela 10. Determinação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos ativos, dados em fenóis totais calculados em mg de Trolox e fenóis totais calculados em mg de Rutina.

Números dos extratos	OD	fenóis totais calculados em mg de Trolox	µg equivalente de Trolox	teor Trolox (mg/g)	fenóis totais calculados em mg de Rutina	µg equivalente de Rutina	teor Rutina (mg/g)
N271	2,2256	1,04486	1044,86	1306,08	0,48779	487,79	609,74
N272	2,5346	1,19282	1192,82	1491,02	0,56206	562,06	702,58
N275	1,1136	0,51243	512,43	640,53	0,22051	220,51	275,63
N432	0,8006	0,36256	362,56	453,20	0,14527	145,27	181,59
N1005	1,5478	0,72033	720,33	900,41	0,32487	324,87	406,09
N1251	0,8564	0,38927	389,27	486,59	0,15869	158,69	198,36
N1259	2,1798	1,02294	1022,94	1278,67	0,47678	476,78	595,98
N1305	0,4658	0,20225	202,25	252,81	0,06480	64,80	81,00
N1395	0,4246	0,18252	182,52	228,15	0,05490	54,90	68,62
N1489	0,6556	0,29313	293,13	366,41	0,11042	110,42	138,03
N2161	0,833	0,37807	378,07	472,59	0,15306	153,06	191,33
N2186	0,2426	0,09538	95,38	119,22	0,01115	11,15	13,94

5.7 Resultados do ensaio da toxicidade a *Artemia franciscana*

Os extratos foram submetidos ao teste de letalidade para larvas (náuplios) de *Artemia franciscana*. Dos 12 extratos testados, 5 apresentaram toxicidade significativa em pelos menos, uma das 3 concentrações testadas. Os resultados obtidos na avaliação da viabilidade dos náuplios de *Artemia franciscana* para a análise da toxicidade dos 12 extratos vegetais, após exposição em 24 h e 48 h, tiveram como controle negativo água salinizada e o DMSO, e como controle positivo o gluconato de clorexidina 1% (CHX 1%). Quanto menor o valor da CE_{50} nos períodos de tempo citados, mais tóxico é considerado o extrato. A maioria dos extratos demonstrou limitação no cálculo de EC_{50} por conta da variação insuficiente de dados. Os extratos mais tóxicos foram N1005 (CE_{50} de 0,013 mg/mL); N1395 (CE_{50} de 0,074 mg/mL), N275 (CE_{50} de 0,54 mg/mL) e N1251 (CE_{50} de 1,10 mg/mL), em 24 h, enquanto que em 48h, os extratos mais tóxicos foram N1395 (CE_{50} de 0,06 mg/mL), N2186 (CE_{50} de 0,19 mg/mL), N271 (CE_{50} de 0,37 mg/mL) e por último com igual CE_{50} os extratos N272 e N1395 (ambos com CE_{50} de 0,44 mg/mL). Os extratos N272 e N432 não apresentaram toxicidade após 24 h de teste, porém, após 48 h, N272 apresentou toxicidade. Não foi possível calcular a EC_{50} para os outros extratos por conta dos valores de

mortalidade de náuplios obtidos, com variação acima ou abaixo de 5 unidades para todas as concentrações testadas.

Tabela 11. Resultados da concentração efetiva 50% dos extratos ativos no modelo da *Artemia franciscana*, obtidos por análise de Probit de Finney; dados em mg/mL.

24 h						48 h					
Extrato	Chi quadrado	CE50	G	Lim Sup	Lim Inf	Extrato	Chi quadrado	CE50	G	Lim Sup	Lim Inf
N271	Não calculou					N271	9,33	0,37	0,52	13,09	0,10
N272	Não tóxico					N272	158,07	0,44	0,26	0,62	0,29
N275	2,86	0,54	0,19	0,94	0,35	N275	Não calculou				
N432	Não tóxico					N432	Não tóxico				
N1005	74,38	0,013	0,31	0,02	0,007	N1005	Não calculou				
N1251	1,60	1,10	0,28	3,08	0,019	N1251	Não calculou				
N1259	Não calculou					N1259	Não calculou				
N1305	Não calculou					N1305	6,66	0,44	0,36	1,46	0,19
N1395	10,44	0,074	0,072	0,105	0,05	N1395	7,18	0,06	0,17	0,11	0,04
N1489	Não calculou					N1489	Não calculou				
N2161	Não calculou					N2161	Não calculou				
N2186	Não calculou					N2186	3,27	0,08	0,11	0,13	0,05
CHX 1%	5,52	0,36	0,11	0,80	0,21	CHX 1%	5,65	0,19	0,08	0,33	0,12
DMSO	Não tóxico					DMSO	Não tóxico				
Branco	Não tóxico					Branco	Não tóxico				

5.8 Ranqueamento dos extratos segundo os experimentos realizados

A tabela 8 contém todos os experimentos e seus resultados reunidos com a finalidade de se ranquear os 12 extratos selecionados quanto ao mais promissor antibacteriano. Foram estabelecidos escores para cada conjunto de resultados, estabelecidos segundo as regras a seguir:

- A) Escores para DDA – seguem as letras de significância em relação à clorexidina 1%, considerando-se maior ou menor atividade em relação ao composto padrão, sendo a letra A=4, B=3, C=2, D=1 e sem atividade=0
- B) Escores pra MDC – MBC de 0,156 mg/mL=5; MBC de 1,25 mg/mL=4; MBC de 2,5 mg/mL=3; MBC de 5 mg/mL=2 e MBC de 10 mg/mL=1, sem atividade = 0.
- C) Escores para DeB – seguem as letras de significância em relação à clorexidina 1%, considerando-se maior ou menor atividade em relação ao composto padrão, sendo a letra A=3, B=4, C=2, D=1 e sem atividade=0
- D) BU e BB – sim (1) ou não (0)
- E) Escores para toxicidade à artêmia: Escores para toxicidade à artêmia. Considerado como mais tóxico, o menor valor do EC₅₀ apresentado nos testes pelos extratos, em 24h e 48h : 1- Extremamente tóxico; 2 – Altamente tóxico; 3 – Medicamente tóxico; 5 – Pouco tóxico

Tabela 12. Escores relacionados à performance dos extratos vegetais após serem testados nos vários experimentos.

Extrato	DDA	MDC	DeB	BU	BB	Toxicidade artêmia	Soma de escores
N271	C	1	A	1	1	3	11
N272	D	4	0	1	1	5	12
N275	0	2	D	1	0	2	6
N432	0	4	0	0	0	5	9
N1005	C	5	D	1	1	1	11
N1251	0	0	C	1	1	3	7
N1259	B	4	0	1	1	3	12
N1305	0	5	3	1	0	3	12
N1395	A	3	D	1	1	1	11
N1489	D	4	0	1	1	3	10
N2161	D	3	0	1	0	3	8
N2186	0	4	B	1	0	3	12

6 DISCUSSÃO

A busca por compostos antimicrobianos a partir da biodiversidade brasileira é um dos objetivos do Grupo de Pesquisa “Atividades Biológicas, Farmacológicas e Toxicológicas de Produtos Naturais”, ligado ao PPG Patologia Ambiental e Experimental, em um trabalho que vem sendo desenvolvido desde 1997. Com a experiência adquirida, o Grupo deu suporte para que o presente projeto fosse desenvolvido, com vistas a se identificar princípios ativos naturais contra *L. monocytogenes*, uma bactéria de importância zoonótica cujo controle de doenças com a introdução de novos agentes antimicrobianos é fundamental para a manutenção da Saúde Única.

No Brasil, outros grupos de pesquisa já desenvolveram trabalhos de prospecção, como o realizado com óleos essenciais obtidos de 12 espécies vegetais coletadas na Reserva Ducke, a maior reserva biológica em território urbano, localizada em Manaus, AM (CARNEIRO *et al.*, 2008), contra espécies de *Klebsiella pneumoniae* e *S. epidermidis*. Em outro trabalho, OLIVEIRA *et al.*, 2013) avaliaram 19 extratos aquosos obtidos de plantas medicinais Amazônicas contra *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* var. *enteritidis*, *Salmonella enterica* var. *typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella enterica* var. *typhi*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella ozaenae* e *Candida albicans*. Algumas espécies ativas selecionadas nesse trabalho foram *Symphonia globulifera* e *Pentaclethra macroloba*, o pracaxi, ativas contra *S. aureus* e *K. ozonae*.

Em um estudo de 2017, Girondi *et al.* testaram 60 extratos obtidos por metodologias distintas de dez espécies vegetais, *Jatropha weddelliana*, *Attalea phalerata*, *Buchenavia tomentosa*, *Croton doctoris*, *Mouriri elliptica*, *Mascagnia benthamiana*, *Senna aculeata*, *Unonopsis guatterioides*, *Allagoptera leucocalyx* and *Bactris glaucescens*, que foram testados contra *Enterocacteriae*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* e muitos isolados clínicos. *Mouriri elliptica* e *Buchenavia tomentosa* foram as espécies mais ativas.

Poucos trabalhos de prospecção foram realizados com espécies de *Listeria*. Dos Santos *et al.* (2022) estudaram o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais e extratos vegetais de plantas comuns usadas na alimentação, como orégano, canela, gengibre, alho, tomilho, romã, azeitona, entre outras, e

verificaram que o óleo de canela diluído a 10% foi muito efetivo na eliminação da bactéria.

Entre esses estudos, verifica-se que os esforços em se identificar produtos naturais ativos existem, embora sejam realizados em pequena escala. No presente trabalho, a prospecção de atividade antibacteriana foi realizada com 2.280 extratos, oriundos de mais de 500 espécies diferentes, pertencentes a mais de 75 famílias botânicas, sendo, portanto, inédito em sua abrangência. Entre todos os extratos, apenas 12 se mostraram ativos contra *L. monocytogenes*, o que representa apenas 0,53% de extratos ativos contra esse microrganismo. Os extratos selecionados, N271, N272, N275, N432, N1005, N1251, N1259, N1305, N1395, N1489, N2161 e N2186 são discutidos a seguir.

Extratos N271 e N272

Os extratos N271, orgânico e N272, aquoso, foram obtidos de *Casearia spruceana* Berth. Ex Eichle, da família Flacourtiaceae (Salicaceae), da qual foram utilizadas as folhas como órgão vegetal. Apresentaram atividade contra *L. monocytogenes* nos ensaios da DDA, com a formação de halos de inibição de diâmetros de 8,35 mm e 6,90 mm respectivamente, e CBMs de 10 mg/mL e 1,25 mg/mL respectivamente, no modelo de MDC. No modelo de difusão em bioautografia, DeB, somente N271 apresentou capacidade de formar halo de inibição, cujo diâmetro obtido foi de 17,79 mm, no presente projeto.

Esses extratos foram anteriormente testados por Camargo e Suffredini (2014), tendo demonstrado atividade contra cepa de *Escherichia coli* (ATCC® 25922). Nesse trabalho, o extrato aquoso N272 apresentou CIM=CBM=600 mg/mL; com potencial antibiótico para uso veterinário.

Extrato N275

O extrato orgânico N275 foi obtido dos órgãos aéreos de *Caraipa grandifolia* Mart., espécie da família Clusiaceae (Calophyllaceae). No presente trabalho, verificou-se atividade desse extrato contra *L. monocytogenes* nos experimentos iniciais de DDA, sendo o diâmetro do halo de inibição obtido de 10,17 mm e de 7,13 mm, nos experimentos 1 e 2. Já no experimento realizado com n maior, o halo de inibição não foi reproduzido. Apresentou CBM de 5

mg/mL, no modelo de MDC, No ensaio da DeB, o halo de inibição apresentado foi de 14,11 mm, maior do que o observado para DDA.

Extrato N432

O extrato aquoso N432 foi obtido do caule da espécie *Alibertia edulis* (Rich.) A.Rich., pertencente à família Rubiaceae. A espécie é popularmente conhecida como “marmelo-do-Cerrado” sendo amplamente distribuída pelo Brasil, e que tem potencial ornamental, além de seus frutos servirem de alimento para moradores da região onde cresce. Induz efeitos farmacológicos devido à presença de compostos triterpênicos em suas folhas. O chá das folhas dessa planta é popularmente utilizado devido à ação anti-hipertensiva, hipoglicêmica e diurética. Estudos fitoquímicos anteriores, que utilizaram o caule de *A. edulis*, mostraram a presença de iridoides, saponinas, bem como a presença de um diterpeno oleanano, assim também como alcaloides e taninos (MENEGATI, 2016).

Extrato N1005

O extrato orgânico N1005 foi obtido dos órgãos aéreos de *Clusia* cf. *viscida* Engl, pertencente à família Clusiaceae. Apresentou atividade contra *L. mococtogenes* no modelo da DDA, no qual resultou em um diâmetro do halo de inibição de 8,41 mm, e de CIM de 0,156 mg/mL no modelo de MDC e de um diâmetro do halo de inibição de 14,01 mm no modelo de DeB. Esse extrato apresentou-se como o mais tóxico aos náuplios de artêmia, no teste executado em 24 h. Suffredini *et al.* (2006) reportou a toxicidade de *Vismia guianensis*, uma espécie de Clusiaceae, no modelo da artêmia.

Extrato 1251

O extrato orgânico N1251 foi obtido das folhas de *Caraipa grandifolia* Mart., da família Clusiaceae. De acordo com Suffredini *et al.* (2006), o extrato orgânico de *Caraipa grandifolia* Mart., obtido das folhas, foi submetido para análise de atividade contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) de Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*), quando foram realizados ensaios de microdiluição em

caldo. O extrato de *C. grandifolia*, mostrou atividade contra a cepa de *S. aureus* (ATCC® 29213), com MIC de 180 µg/mL e MBC de menor ou igual a 200 µg/mL.

Extratos N1259 e N1305

Os extratos orgânicos N1259 e N1305 foram obtidos do cerne do caule e dos órgãos aéreos de *Piper arboreum* Aubl., da família Piperaceae. No presente trabalho, mostraram-se ativos nos modelos de DDA, cujos diâmetros dos halos de inibição foram de 8,97 mm e 8,84 mm respectivamente, e no modelo da MDC, cujas CBMs foram de 1,25 mg/mL e 0,156 mg/mL respectivamente. No modelo da difusão em bioautografia, observou-se a formação de halos de inibição com diâmetros maiores do que aqueles observados no modelo da DeB, de 14,66 mm e 16,05 mm respectivamente.

Em um estudo anterior, Figueredo *et al.* (2014) utilizaram o extrato etanólico de *P. arboreum* e suas frações para avaliar a atividade tripanocida e antileishmania. O estudo demonstrou que houve maior atividade da fração hexânica do extrato e concluiu afirmando que o extrato de *P. arboreum* pode ser considerada uma alternativa de produtos naturais com atividade contra *Tripanossoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*.

Extrato N1395

O extrato orgânico 1395 foi obtido das folhas de *Hymenaea parvifolia* Huber., da família Leguminosae Caesalpinioideae (Fabaceae Caesalpinioideae). No presente estudo, foi verificada atividade nos modelos de DDA que resultou em diâmetro do halo de inibição de 9,09 mm, no modelo de MDC resultou em CBM de 2,5 mg/mL e no modelo DeB em diâmetro do halo de inibição de 14,27 mm.

De acordo com Da Silva Oliveira (2014), que fez uma revisão de literatura sobre o gênero *Hymenaea*, existem alguns estudos etnofarmacêuticos de importância considerável sobre este gênero, que relatam seu uso como decocto ou como xarope para tosse, anemia, bronquite, sinusite, dores abdominais, prostatite, asma, resfriado e afecções pulmonares, sua resina também é utilizada no tratamento de feridas. No levantamento de artigos desse estudo, foi verificado que as partes das plantas desse gênero mais utilizadas são a casca, resina, o caule e o epicarpo. As espécies apresentam em sua composição química

diterpenoides nos extratos de casca e resina, flavonoides, aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, cumarinas, sesquiterpenos, esteroides, lactonas, cromonas e diterpenos. Esse foi o extrato mais tóxico aos náuplios de artêmia após 48 h.

Extrato 1489

O extrato orgânico 1489 foi obtido dos órgãos aéreos de uma espécie do gênero *Ipomoea*, pertencente à família Convolvulaceae. Apresentou atividade no modelo da DDA de 7,66 mm de diâmetro do halo de inibição, no modelo da MDC resultou em CBM de 1,25 mg/mL e ausência de halo de inibição no modelo de DeB.

Segundo estudos realizados por Ojo *et al.* (2022) com *Ipomoea asarifolia*, utilizando as folhas e a planta inteira para a preparação dos extratos, foi observada a presença de alcaloides, saponinas, fenóis, taninos e antraquinonas, entretanto apenas nos extratos que utilizaram a planta inteira foi revelada a presença de flavonoides. Os extratos etanólico e metanólico apresentaram atividade contra *P. aeruginosa* e contra *S. aureus*. O extrato aquoso mostrou atividade apenas contra *S. aureus*.

Extrato N2161

O extrato orgânico N2161 foi obtido dos órgãos aéreos de *Diclinanona calycina* Bernoist, pertencente à família Annonaceae. No presente trabalho, esse extrato apresentou a capacidade de formar halo de inibição no modelo de DDA, com diâmetro de 8,26 mm, e CBM de 2,5 mg/mL obtido pelo modelo de MDC. No modelo de DeB, não apresentou capacidade de formar halo de inibição. Costa *et al.* (2022), que realizaram estudos com a espécie *D. calycina*, verificaram atividade antioxidante de extratos orgânicos desta planta. A investigação fitoquímica isolou e identificou trinta compostos, entre os quais nove alcaloides isoquinolínicos e quatro flavonoides. A atividade citotóxica dos compostos isolados foi avaliada contra linhagens de células cancerosas HL-60, MCF-7, HepG2 e HCT116 e não cancerosas MRC-5.

Extrato N2186

O extrato aquoso N2186 foi obtido dos frutos de *Simaba orinocensis* Kunth, espécie pertencente à família Simaroubaceae. De acordo com Fonseca Barbosa *et al.* (2010) a família Simaroubaceae possui aproximadamente possui 32 gêneros e 200 espécies e muitas dessas espécies são utilizadas na medicina popular como antielmíntico, amebicida e principalmente no tratamento da malária e alguns tipos de câncer. A maioria das plantas do gênero citado é identificada pela quantidade de substâncias amargas, sendo os quassinoides os de maior importância, os quais são reconhecidos por suas atividades antitumoral, antiviral, antimalária e antileucêmica. Dentro da família Simaroubaceae, o gênero *Simaba* recebe maior atenção pela bioprodução de quassinoides e de alcaloides do tipo canti-2-ona.

Comparação entre os resultados obtidos nos modelos de disco difusão em ágar e difusão em bioautografia

Para os estudos relacionados à identificação de atividade antimicrobiana de produtos naturais obtidos de extratos vegetais, a técnica de bioautografia é muito indicada, uma vez que reúne técnicas de separação por cromatografia em camada delgada a técnicas de sensibilidade microbiana executadas em meio ágar inoculado. Para que a possibilidade de se adotar a técnica de bioautografia para avaliar os extratos que foram selecionados por DDA, é necessário se fazer uma avaliação comparativa da difusão dos extratos a partir do disco de papel usado na DDA e da sílica gel, usada na bioautografia. Para isso, foi desenvolvido o método de comparação entre DDA e a DeB, a difusão em bioautografia. Embora sejam técnicas conhecidas, foram reunidas com o objetivo de se selecionar os extratos que respondem a ambas as técnicas, sem perder a atividade antimicrobiana.

O modelo da disco difusão em ágar foi adotado para ser usado na triagem em larga escala realizada por conta de ser uma técnica consagrada, por ser de fácil execução, rápida e reprodutível. Por esse motivo, pode ser adotada em qualquer laboratório que tenha a mínima infraestrutura para execução de ensaios microbiológicos. Esse ensaio é realizado com a adição de extrato vegetal sobre discos de papel de filtro estéreis, que são depositados sobre o meio de cultura inoculado em superfície. Assim, o extrato vegetal que está em

contato direto com o disco de papel vai se difundir para o meio de cultura conforme as afinidades de seu composto com o próprio disco de papel e com o meio de cultura, dependendo das características físico-químicas dos componentes desse extrato. A somatória desses fatores leva o extrato, caso tenha potencial de inibir o crescimento bacteriano, a formar um halo de inibição ao redor do disco de papel impregnado com o extrato.

Já no modelo da difusão em bioautografia, DeB, os extratos são depositados em gota sobre as placas de sílica gel, um material que é feito com base de óxido de silício (SiO_2), de origem mineral e diferente de celulose, que é material orgânico. Observa-se que para os diferentes extratos, a difusão a partir da celulose não se dá de modo semelhante ao que se observa para a difusão a partir da sílica gel. Nessa técnica, vários extratos deixaram de se difundir para o meio de cultura e perderam, assim, a atividade antibacteriana, como os extratos N272, N432, N1259, N1489 e N2161. Para esses extratos, a técnica que futuramente deverá ser adotada para a identificação de frações ativas deve ser outra além da bioautografia.

Atividade antioxidante e quantificação de fenólicos totais

A atividade antioxidante refere-se à capacidade de um composto ou extrato em neutralizar ou inibir a ação de espécies reativas de oxigênio, como os radicais livres e superóxidos, que podem causar danos celulares e contribuir para o desenvolvimento de várias doenças (Silva; Pogačnik, 2020).

A relação entre a atividade antioxidante e a quantificação de fenólicos totais pode apresentar variantes, dependendo das características específicas dos extratos vegetais em estudo, mas apresenta um indício do seu potencial antioxidante. Embora os compostos fenólicos sejam conhecidos pela sua atividade antioxidante, outros componentes presentes nas amostras podem contribuir para esta atividade, como vitaminas e minerais.

A atividade antioxidante de cada extrato foi avaliada qualitativamente segundo testes com o β -caroteno e o DPPH, realizados em autografia. Todas as amostras mostraram potencial antioxidante evidentes pelo aparecimento de manchas esbranquiçadas de intensidades distintas entre os extratos, o que pode indicar quantidades diferentes de compostos com potencial antioxidante. A partir

da análise da quantidade de compostos fenólicos totais, dados como Trolox e como Rutina, sugere-se que a atividade antioxidante esteja relacionada à presença desses compostos, que geralmente é associado por conta da capacidade do fenol neutralizar radicais livres, no caso da reação com DPPH. Por ordem decrescente da quantidade de compostos fenólicos totais estão os extratos N272, N271, N1259, N1005, N275, N2161, N432. Observa-se que pode-se estabelecer uma relação direta entre a atividade antioxidante e a quantidade de fenólicos totais, e no presente projeto oito dos 12 extratos antibacterianos apresentaram elevada quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante evidente, no modelo do DPPH, com exceção dos extratos N1489, N2161, N2186 e N432, que no modelo de autografia utilizado não apresentaram atividade captadora de radicais livres expressiva, e provavelmente deverão ser submetidos a outros sistemas cromatográficos para explorar mais esse potencial.

Atividade tóxica a náuplios de *Artemia franciscana*

Neste ensaio, a toxicidade aos náuplios da *Artemia franciscana* depende de alguns fatores, dentre eles, a composição química dos extratos vegetais, a concentração de cada extrato e o tempo de exposição aos náuplios, logo a mortalidade dos náuplios é utilizada como indicador da toxicidade aguda do extrato. A análise dos dados obtidos foi feita através do teste de Probit de Finney (1961), modelo baseado na probabilidade da resposta em relação à dose (concentração do extrato), permitindo estimar a EC₅₀ de cada extrato. Desta forma os extratos vegetais N1005, N1395, N275 e N2161 apresentaram maior mortalidade aos náuplios após 24h de exposição, sendo, portanto, os que apresentaram maior toxicidade, neste período. Na sequência do experimento, após 48h, foi observado que os extratos N1395, N2186, N271, N272 apresentaram maior toxicidade no período verificado.

Ranqueamento dos extratos quanto à potencial fonte de novos compostos anti-*Listeria*

De acordo com os experimentos realizados foi feito um ranqueamento considerando o desempenho dos extratos quanto a atividade antimicrobiana (DDA, MDC), atividade antioxidante (ensaio de FC, DPPH e β -caroteno) e estudo

de toxicidade (toxicidade a *Artemia franciscana*), dado pela somatória dos escores estabelecidos para cada extrato.

O extrato orgânico N1305, obtido de *Piper arboreum*, é referido como o de melhor atividade antimicrobiana, uma vez que obteve a maior soma de escores, o que significa que apresentou atividade antibacteriana significativa, apresentou capacidade de ser analisado pelas técnicas de bioautografia e apresentou baixa toxicidade à artêmia. Além desses resultados, apresenta boa quantidade de compostos fenólicos totais e potencial antioxidante, sendo que esses dois últimos parâmetros não foram considerados na análise, por terem sido recentemente incorporados ao processo analítico feito pelo grupo de pesquisa. Essa espécie tem sido estudada quanto às atividades biológicas como antibacterianas (Matias et al., 2022; da Silva et al., 2020), antifúngicas (Vasques da Silva et al., 2002), citotoxicidade (Macedo et al., 2019), larvicida (Pereira Filho et al., 2021; Carrara et al., 2014) e como anti-inflamatório (Finato et al., 2018). Os trabalhos não reportam atividade contra *Listeria* spp., o que faz com que os dados alcançados no presente trabalho sejam inéditos.

O extrato aquoso N2186 apresentou atividade antimicrobiana com CBM de 1,25 mg/mL no modelo da MDC. No modelo da DeB apresentou halo de inibição de 19,66 mm. Não demonstrou atividade antioxidante nos ensaios de DPPH e β -caroteno, mas apresentou atividade antioxidante no ensaio de FC, porém mostrou-se tóxico no período de 48h no ensaio de toxicidade à artêmia.

O extrato aquoso N272, apresentou atividade antimicrobiana, no modelo da DDA, com halo de inibição de 6,90 mm, com CIM=CBM=600 mg/mL, no modelo da MDC; com potencial antibiótico para uso veterinário, no modelo de MDA. Não apresentou formação de halo de inibição no modelo da difusão em bioautografia. Apresentou atividade antioxidante nos ensaios de DPPH, β -caroteno e FC. Apresentou toxicidade no período de 48h no ensaio de toxicidade à artêmia.

O extrato orgânico N1259 apresentou atividade antimicrobiana, com formação de halo de inibição no modelo de DDA, cujo diâmetro do halo foi de 8,97 mm. No modelo da MDC, cuja CBM foi de 1,25 mg/mL. No modelo da difusão em bioautografia, observou-se a formação de halo de inibição com diâmetro maior do que aqueles observados no modelo da DeB, de 14,66 mm. Apresentou atividade antioxidante nos ensaios de DPPH e FC, não

apresentando atividade no ensaio de β -caroteno. No ensaio de toxicidade à artêmia, não apresentou toxicidade.

O extrato orgânico N271 apresentou formação de halo de inibição no ensaio da DDA, com a formação de halos de inibição de diâmetros de 8,35 mm e CBM de 10 mg/mL, no modelo de MDA. No modelo de difusão em bioautografia, DeB, apresentou capacidade de formar halo de inibição, cujo diâmetro obtido foi de 17,79 mm. Apresentou atividade antioxidante nos ensaios de DPPH, β -caroteno e FC. Apresentou toxicidade, após 48h, no ensaio de toxicidade à artêmia.

O extrato aquoso N432 apresentou atividade antimicrobiana, com formação de halo de inibição no ensaio de DDA, no valor do halo de 6,72 mm e no modelo da MDC com CBM de 1,25 mg/mL. Não apresentou formação de halo nos ensaios de difusão em bioautografia, DeB. Nos ensaios de DPPH, β -caroteno não apresentou atividade antioxidante, embora essa atividade foi demonstrada no ensaio de FC. Não demonstrou toxicidade no ensaio de toxicidade à artêmia.

O extrato orgânico N1005, apresentou atividade antimicrobiana no modelo da DDA, no qual resultou em um diâmetro do halo de inibição de 8,41 mm, e de CIM de 0,156 mg/mL no modelo de MDC e de um diâmetro do halo de inibição de 14,01 mm no modelo de DeB. Esse extrato apresentou-se como o mais tóxico aos náuplios de artêmia, no teste executado em 24 h. Apresentou atividade antioxidante nos ensaios de DPPH, β -caroteno e FC.

O extrato orgânico N1395, demonstrou ser o extrato mais tóxico no ensaio de toxicidade à artêmia, no teste executado em 48h. Verificou-se atividade nos modelos de DDA com diâmetro do halo de inibição de 9,09 mm, no modelo de MDC apresentou CBM de 2,5 mg/mL e no modelo DeB em diâmetro do halo de inibição de 14,27 mm. Apresentou atividade antioxidante nos ensaios de DPPH, β -caroteno e FC. Foi o extrato que apresentou maior toxicidade aos náuplios de artêmia quando o experimento foi executado a 48h.

O extrato orgânico N1489, apresentou atividade antimicrobiana no modelo da DDA que resultou em um halo de inibição de 7,66 mm de diâmetro, no modelo da MDC resultou em CBM de 1,25 mg/mL e ausência de halo de inibição no modelo de DeB. No ensaio de toxicidade à artêmia, não apresentou toxicidade.

Não apresentou atividade antioxidante nos ensaios de DPPH, β -caroteno, embora tenha apresentado esta atividade no ensaio de FC.

O extrato orgânico N2161, apresentou atividade antimicrobiana com halo de inibição no modelo de DDA, de 8,26 mm, e CBM de 2,5 mg/mL obtido pelo modelo de MDC. No modelo de DeB, não apresentou capacidade de formar halo de inibição. Apresentou atividade antioxidante no ensaio do DPPH, e do FC, embora não tenha apresentado atividade antioxidante no ensaio do β -caroteno. Não apresentou toxicidade no ensaio de toxicidade à artemia.

O extrato orgânico N275 apresentou atividade antimicrobiana nos experimentos iniciais de DDA, sendo o diâmetro do halo de inibição obtido de 10,17 mm e de 7,13 mm, nos experimentos 1 e 2. Já no experimento realizado com n maior, o halo de inibição não foi reproduzido. Apresentou CBM de 5 mg/mL, no modelo de MDC. No ensaio da DeB, o halo de inibição apresentado foi de 14,11 mm, maior do que o observado para DDA. Nos ensaios de DPPH e β -caroteno apresentou atividade antioxidante, assim também como no ensaio de FC. No ensaio de toxicidade à artemia, demonstrou-se tóxico na execução em 24h.

O extrato orgânico N1251 não apresentou atividade antimicrobiana com considerável no ensaio de DDA. Não apresentou CBM no modelo da MDC. Apresentou atividade antioxidante no ensaio de DPPH, o que não foi observado no ensaio do β -caroteno. Apresentou atividade antioxidante no ensaio de FC. Demonstrou toxicidade no ensaio de toxicidade à artêmia, na execução em 24h.

O presente projeto demonstrou resultados inéditos obtidos do processo de triagem em larga escala de extratos vegetais obtidos de plantas coletadas na Amazônia e na Mata Atlântica, dois importantes biomas brasileiros ricos em diversidade, contra *Listeria monocytogenes*, uma bactéria de importância epidemiológica por estar envolvida em doenças transmitidas por alimentos e que afeta principalmente pessoas dos grupos de risco. Embora tenham sido identificados 12 extratos vegetais ativos, o procedimento de ranqueamento feito indicou quais são os extratos vegetais com prioridade para serem investigados quanto à composição química e identificação dos compostos responsáveis pela atividade antibacteriana, procedimento a ser feito em futuros projetos do Grupo de Pesquisa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, a prospecção de atividade antibacteriana foi realizada com 2.280 extratos, oriundos de mais de 500 espécies diferentes, pertencentes a mais de 75 famílias botânicas, sendo, portanto, inédito em sua abrangência.

Nos ensaios da DDA os extratos N271, N272, N1005, N1259, N1305, N1395, N1489 e N2161 apresentaram as medidas dos halos de inibição comparáveis com os halos da CHX 1%, considerando a significância, se $p < 0,05$. A= $p > 0,05$; B= $p < 0,05$; C= $p < 0,001$ e D= $p < 0,0001$.

Nos ensaios de DDA, MDC, Deb e toxicidade à artemia, os extratos N271, N272, N1005, N1259, N1305, N1395, N2186, apresentaram os melhores escores para estas técnicas, logo podemos dizer que estes extratos podem ser candidatos ao desenvolvimento de possíveis antibióticos, o que nos leva a propor análises com outras metodologias, para investigação das suas composições.

Com relação atividade antioxidante, os extratos N271, N272, N275, N1005, N1251, N1259, N1305 e N1395 apresentaram potencial atividade. No ensaio de Folin-Ciocalteu, os extratos N271, N272, N1005 e N1269 apresentaram alto teor de fenólicos totais, estes extratos necessitam de mais estudos para elucidação de sua composição química.

Com os resultados obtidos neste trabalho, conseguimos submeter um artigo na revista *Frontiers in Antibiotics*, aceito para publicação: doi: 10.3389/frabi.2023.1122400.

8 REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma M2-A8**. – 8. ed. São Paulo. Organização Pan-Americana da Saúde. 2003. Vol. 23 N° 1. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/metodo_ref_testes_diluicao_modulo5.pdf. Acesso em: 22. dec. 2022.
- BAQUERO, F.; LANZA, V. F.; DUVAL, M.; COQUE, T. Ecogenética da resistência a antibióticos em *Listeria monocytogenes*. **Microbiologia Molecular**, v. 113, n. 3, p. 570–579, 2020.
- BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155–168, 2011.
- BARBOSA, H. M.; ALBINO, A. M.; CAVALCANTE, F. S.; LIMA, R. A. ABORDAGEM FITOQUÍMICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM *Solanum acanthodes* (SOLANACEAE) HOOK. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 4, n. 1, 2017.
- BARBOSA, L. F.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Chemical constituents of *Simaba suffruticosa* (Simaroubaceae); Constituintes químicos de *Simaba suffruticosa* (Simaroubaceae). 2010. **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Sociedade Brasileira de Química. 2010. Disponível: <https://www.osti.gov/etdeweb/servlets/purl/21438125>. Acesso em: 05 nov. 2022.
- BERTSCH, D.; RAU, J.; EUGSTER, M. R.; HAUG, M. C.; LAWSON, P. A.; LACROIX, C.; MEILE, L. *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 526-532, 2013.
- BONSAGLIA, E. C. R.; SILVA, N. C. C.; JÚNIOR, A. F.; JÚNIOR, J. A.; TSUNEMI, M. H.; RALL, V. L. M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 386–391, 2014.
- BOYCE, J. M., PITTET, D. Guideline for hand hygiene in health-care setting. Recommendations of the healthcare infection control practices advisory committee and the HIPAC/SHEA/APIC/IDSA hand hygiene task force. **American Journal of Infection control**, v. 30, p. 1-46, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção. Brasília: **Ministério da Saúde**. 2017. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/saude-de-az/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acesso em: 17 ago. 2022.

- BRITO, M. C. T. **Micropartículas com clorexidina: caracterização, atividade antimicrobiana contra microrganismos da orofaringe em pacientes de UTI e desenvolvimento de pomada Orabase**. Orientador: Dr. Fábio Correia Sampaio. 2019. 264 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2019.
- BUCUR, F. I.; GRIGORE-GURGU, L.; CRAUWELS, P.; RIEDEL, C. U.; NICOLAU, A. I. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2700. 2018.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.
- CAMARGO, L. R. P.; CARVALHO, V. M.; DÍAZ, I. E. C.; PACIENCIA, M. L. B.; FRANA, S.A.; YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; REIS, L. F. L.; SUFFREDINI, I. B. Susceptibility of virulent and resistant *Escherichia coli* strains to non-polar and polar compounds identified in *Microplumeria anomala*. **Veterinary World**, v.13, n. 7, p.1376 - 1387, 2020.
- CARDENAS-ALVAREZ, M. X.; ZENG, H.; WEBB, B. T.; MANI, R.; MUNOZ, N.; BERGHOLZ, T. M. Comparative genomics of *Listeria monocytogenes* isolates from ruminant listeriosis cases in the Midwest United States. **Microbiology Spectrum**, p. e0157922, 2022. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/spectrum.01579-22>. Acesso em 05. Nov. 2022.
- CARNEIRO, A. L. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, V. M. A. D.; FERNANDES, O. C. C.; CAUPER, G. S. D. B.; POHLIT, A. M. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 31–38, 2008.
- CARRARA, V. S.; VIEIRA, S. C.; DE PAULA, R. G.; RODRIGUES, V.; MAGALHÃES, L.G.; CORTEZ, D. A.; DA SILVA FILHO, A. A. In vitro schistosomicidal effects of aqueous and dichloromethane fractions from leaves and stems of Piper species and the isolation of an active amide from *P. amalago* L. (Piperaceae). **Journal of Helminthology**, v. 88, n. 3, p. 321-6, 2014. doi: 10.1017/S0022149X13000205. Epub 2013 Apr 8. PMID: 23561585.
- CHARLIER, C.; DISSON, O.; LECUIT, M. "Maternal-neonatal listeriosis. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 391-397. 2020.
- CHERIFI, T; ARSENAULT, J.; PAGOTTO, F.; QUÉSSY, S.; CÔTÉ, J. C.; NEIRA, K.; FRAVALO, P. Distribution, diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in swine slaughterhouses and their association with food and human listeriosis strains. **PloS one**, v. 15, n. 8, p. e0236807, 2020.
- CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Norma aprovada 3ª ed. Wayne, PA, CLSI Document M31-A3, 2008.

- CNS - Conselho Nacional de Saúde - CNS debate estratégias de combate ao HIV/Aids e ao preconceito (saude.gov.br). Disponível em: <http://conselho.saude.gov.br/ultimas-noticias-cns/572-cns-debate-estrategias-de-combate-ao-hiv-aids-e-ao-preconceito#:~:text=A%20sigla%20utilizada%20atualmente%20pelo,e%20garantia%20de%20tratamento%20adequado>. Acesso em: 06 nov. 2022.
- COLE, M. B.; JONES, M. V.; HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 1, p. 63-72, 1990.
- COSTA, E. V.; SOARES, L. D. N.; CHAAR, J. D. S.; SILVA, V. R.; SANTOS, L. D. S.; KOOLEN, H. H.; BEZERRA, D. P. Benzylated dihydroflavones and isoquinoline-derived alkaloids from the bark of *Diclinanona calycina* (Annonaceae) and their cytotoxicities. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 26, n. 12, p. 3714, 2021.
- DA SILVA, A. C. A.; MATIAS, E. F. F.; ROCHA, J. E.; ARAÚJO, A. C. J.; DE FREITAS, T. S.; CAMPINA, F. F.; COSTA, M. D. S.; SILVA, L. E.; AMARAL, W. D.; MAIA, B. H. L. N. S.; FERRIANI, A. P.; BEZERRA, C. F.; IRITI, M.; COUTINHO, H. D. M. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) characterization and evaluation of antibacterial bioactivities of the essential oils from *Piper arboreum* Aubl., *Piper aduncum* L. e *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Z Naturforsch C J Biosci**, v. 76, n. 1-2, p. 35-42, 2020. doi: 10.1515/znc-2020-0045. PMID: 32673283.
- DA SILVA OLIVEIRA, F. G.; DE SOUZA ARAÚJO, C.; ROLIM, L. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. The genus *Hymenaea* (Fabaceae): A chemical and pharmacological review. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 58, p. 339–388, 2018.
- DE OLIVEIRA, V. M. M.; MEDEIROS, T. D. S.; SOARES, N. R. M.; DOS SANTOS ARRAES, D. R.; DA COSTA, M. K. V.; FERREIRA, A. M. S. D.; DE QUEIROZ, G. A.; FARIAS, A. L. F.; DE CASTRO CANTUÁRIA, P.; DE ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas de *Ambelania acida* Aublet (Apocynaceae). **Plantas medicinais do estado do Amapá: dos relatos da população à pesquisa científica**, v. 1, n. 1, p. 14-28. 2021.
- DEN BAKKER, H. C.; WARCHOCKI, S.; WRIGTH, E. M.; ALLRED, A. F.; AHLSTROM, C.; MANUEL, C. S.; WIEDMANN, M. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 1882–1889, 2014.
- DOS SANTOS, L. R.; ALÍA, A.; MARTIN, I.; GOTTARDO, F. M.; RODRIGUES, L. B.; BORGES, K. A.; FURIAN, T. Q.; CÓRDOBA, J. J. Antimicrobial activity of essential oils and natural plant extracts against *Listeria monocytogenes* in a dry-cured ham-based model. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 4, p. 1729–1735, 2022.

- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; DOS SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, pág. 446–452, 2006.
- FDA. Chlorhexidine Official FDA information, side effects and uses. Drug information Online. Drugs.com. Revised 06/2018. Disponível em: www.drugs.com/pro/chlorhexidine.html. Acesso em: 20 dez. 2022.
- FERREIRA, V.; WIEDMANN, M.; TEIXEIRA, P.; STAZIEWICZ, M. J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 1, p. 150-170, 2014.
- FIGUEREDO, F. G.; TINTINO, S. R.; DE BRITO, D. I. V.; BRAGA, M. F. B. M.; LEITE, N. F.; LUCENA, B. F. F.; SOBRAL-SOUZA, C. E.; GOMEZ, M. C. V.; COUTINHO, H. D. M. "Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 1, p. 149-154, 2014.
- FINATO, A. C.; FRAGA-SILVA, T. F.; PRATI, A. U. C.; DE SOUZA JÚNIOR, A. A.; MAZZEU, B. F.; FELIPPE, L. G.; PINTO, R. A.; GOLIM, M. A.; ARRUDA, M. S. P.; FURLAN, M.; VENTURINI J. Crude leaf extracts of Piperaceae species downmodulate inflammatory responses by human monocytes. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198682, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0198682. PMID: 29924840; PMCID: PMC6010286.
- FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 20 nov. 2021.
- FREITAG, N. E.; PORT, G. C.; MINER, M. D. *Listeria monocytogenes*—from saprophyte to intracellular pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 623-628, 2009.
- GIRONDI, C. M.; DE OLIVEIRA, A. B.; PRADO, J. A.; KOGA-ITO, C. Y.; BORGES, A. C.; BOTAZZO DELBEM, A. C.; PEREIRA, D. F. A.; SALVADOR, M. J.; BRIGHENTI, F. L. Screening of plants with antimicrobial activity against enterobacteria, *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. **Future Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 671–681, 2017.
- GRAVES, L. M.; HELSEL, L. O.; STEIGERWALT, A. G.; MOREY, R. E., DANESHVAR, M. I.; ROOF, S. E.; SAUDERS, B. D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1280-1288, 2010.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, 253-65, 1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7970288>. Acesso em: 14 mai. 2022.

- HALTER, E. L.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 641-647, 2013.
- IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1811-1815, 2003.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Foodborne listeriosis**. In: Modern Food Microbiology. Food Science Text Series. Springer, Boston, MA, p. 591-617, 2005.
- JORDAN, K.; MCAULIFFE, O. *Listeria monocytogenes* in foods. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 86, p. 181-213, 2018.
- LARSEN, H. E.; SEELIGER, H. P. R. A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria grayi* sp. n. In **Proceedings of the Third International Symposium on Listeriosis**. Bilthoven/Holland, 1966. p. 35-39.
- LEE, Bo-H.; HÉBRAUD, M.; BERNARDI, T. Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2221, 2017.
- LETCHUMANAN, V.; WONG, P. C.; GOH, B. H.; MING, L. C.; PUSPARAJAH, P.; WONG, S. H.; LEE, L. H. A review on the characteristics, taxonomy and prevalence of *Listeria monocytogenes*. **Progress In Microbes & Molecular Biology**, v. 1, n. 1, p. 25-47, 2018.
- MACEDO A. L.; DA SILVA, D. P. D.; MOREIRA D. L.; DE QUEIROZ, L. N.; VASCONCELOS, T. R. A.; ARAUJO, G. F.; KAPLAN, M. A. C.; PEREIRA, S. S. C.; DE ALMEIDA, E. C. P.; VALVERDE, A. L.; ROBBS, B. K. Cytotoxicity and selectiveness of Brazilian Piper species towards oral carcinoma cells. **Biomedical Pharmacotherapy**, v. 110, p. 342-352, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.129. Epub 2018 Dec 4. PMID: 30529767.
- MARTINS, E. R.; DÍAZ, I. E. C.; PACIENCIA, M. L. B.; FANA, S. A.; MORAIS, D.; EBERLIN, M. N.; SILVA, J. S.; SILVEIRA, E. R.; BARROS, M. P.; SUFFREDINI, I. B.; Interference of Seasonal Variation on the Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from the Leaves of *Iryanthera polyneura* in the Amazon Rain Forest. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 10, e1900374, 2019a.
- MARTINS, E. R.; DÍAZ, I. E. C.; PACIENCIA, M. L. B.; FRANA, S. A.; MARQUES, M. O. M.; DE MORAIS, D. R.; EBERLIN, M. N.; SUFFREDINI, I. B.; Amazon climatic factors driving terpene composition of *Iryanthera polyneura* Ducke in *terra-firme* forest: A statistical approach. **PLoSOne**. v. 14, n. 11, e0224406, 2019b.

- MATIAS E. F. F.; PEREIRA, A. P. D.; BRAZ, A. V. O.; RODRIGUES, M. C.; SILVA, J. L.; MAIA, P. A. A.; SANTOS, S. C. D.; REBELO, R. A.; BEGNINI, I. M.; SILVA, L. E. D.; AMARAL, W. D.; KOWALSKA, G.; ROWIŃSKI, R.; HAWLENA, J.; KOWALSKI, R.; COUTINHO, H. D. M.; ALENCAR, V. R. C. T. Chemical Profile and Biological Activities of Essential Oil from *Piper arboreum* for Development and Improvement of Mouthwash. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6408, 2022. doi: 10.3390/molecules27196408. PMID: 36234949; PMCID: PMC9572885.
- MENEGATI, S. E. L. T.; DE LIMA, F. F.; TRAESEL, G. K.; SOUZA, R. I. C.; DOS SANTOS, A. C.; DE SANTANA AQUINO, D. F.; OESTERREICH, S. A. Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 1096–1102, 2016.
- MERCK & CO. INC. Chlorhexidine. The Merck Index Online. All rights reserved, 2019. Disponível em: <https://www.rsc.org/merck-index>. Acesso em: 20 dez. 2022.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, 211-19, 2004. Disponível em: <http://www.thaiscience.info/journals/Article/SONG/10462423.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2022.
- NÜESCH-INDERBINEN, M.; BLOEMBERG, G. V.; MULLER, A.; STEVENS, M. J.; CERNELA, N.; KOLLOFFEL, B.; STEPHAN, R. Listeriosis caused by persistence of *Listeria monocytogenes* serotype 4b sequence type 6 in cheese production environment. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 284–288, 2021.
- OJO, S. K. S.; SUNMONU, G. T.; ADEOYE, A. O.; FISAYO, C. Therapeutic potential of *Ipomoea asarifolia* on infected Swiss albino rats with *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*. **Journal of Herbmед Pharmacology**, v.11, n. 3, p. 409-418. 2022.
- OLIVEIRA, A. A.; SEGOVIA, J. F.; SOUSA, J. Y.; MALTA, E. C.; GONÇALVES, M. C.; BEZERRA, R. M.; KANKAZI, L. I. Antimicrobial activity of Amazonian medicinal plants. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2013.
- OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, L.; MIMICA, I. M. Características dos Principais Grupos de Antibacterianos: Espectro de Ação e Indicações. *In*: Alterthum F, Trabulsi LR. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. p. 87-91.
- PAGLIANO, P.; ASCIONE, T.; BOCCIA, G.; DE CARO, F.; ESPOSITO, S. *Listeria monocytogenes* meningitis in the elderly: epidemiological, clinical and therapeutic findings. **Le Infezione in Medicina**, v. 24, n. 2, p. 105-111, 2016.

- PEREIRA FILHO, A. A.; PESSOA, G. C. D.; YAMAGUCHI, L. F.; STANTON, M. A.; SERRAVITE, A. M.; PEREIRA, R. H. M.; NEVES, W. S.; KATO, M. J. Larvicidal Activity of Essential Oils From Piper Species Against Strains of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Resistant to Pyrethroids. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 685864, 2021. doi: 10.3389/fpls.2021.685864. PMID: 34149785; PMCID: PMC8213341.
- PIRIE, J. H. H. *Listeria*: Chance of a name of a genus bacteria. **Nature**, v. 145, n. 3668, p. 264-264, 1940.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A.; CIMPEANU, C.; PREDOI, G. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9130976/>. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/9130976>. Acesso em: 08 abr. 2022.
- RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 32-46, 2018.
- RITTER, J. M.; FLOWER, R.; HEDERSON, G.; LOKE, Y. K.; MACEWAN, D.; RANG, H; P. **Farmacologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2020. p. 667.
- ROCHA, P. R. D.; LOMONACO, S.; BOTTERO, M. T.; DALMASSO, A.; DONDO, A.; GRATTAROLA, C.; CASALONE, C. Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* strains constitute a genetically homogeneous group related to human outbreak strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 3059-3066, 2013.
- ROCOURT, J.; GRIMONT, P. A. D. *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 866-869, 1983.
- RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta Daninha**, v. 27, p. 507-513, 2009.
- SANTOS, D. Y. A .C.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, p. 1-5, 2017.
- SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 2, p. 169-183, 1991.
- SEELIGER, H. P. R. Apathogene Listerien: *L. innocua* sp. n. (Seeliger et Schoofs, 1977). **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie**, v. 249, n. 4 p. 487-493, 1981.

- SHERMA, J.; RABEL, F. Uma revisão dos métodos de cromatografia de camada fina para determinação da autenticidade de alimentos e suplementos dietéticos. **Jornal de cromatografia líquida e tecnologias relacionadas**, v. 41, n. 10, pág. 645–657, 2018.
- SILVA RFM, POGAČNIK L. Polyphenols from Food and Natural Products: Neuroprotection and Safety. **Antioxidants** (Basel), v. 9, n. 1, p. 61, 2020. doi: 10.3390/antiox9010061.
- SILVA, H. R. et al. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. **Higiene alimentar**, v. 30, n. 262-263, p. 17-20, 2016.
- SILVA, N. H.; PACIENCIA, M. L. B.; FRANA, S. A.; Diaz, I. E. C.; SUFFREDINI, I.B. Antibacterial activity of essential oils from leaves of *Iryanthera ulei* Warb. (Myristicaceae): a temporal analysis perspective. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 23, n. 5, p. 800-901, 2020.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002.
- SLEEIGER, H. P.; ROCOURT, J.; SCHRETTENBRUNNER, A.; GRIMONT, P. A.; JONES, D. Notes: *Listeria ivanovii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, n. 3, p. 336-337, 1984.
- STEA, E. C.; PURDUE, L. M.; JAMIESON, R. C.; YOST, C. K.; TRUELSTRUP, L. Comparison of the Prevalences and Diversities of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* in an Urban and a Rural Agricultural Watershed. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p. 3812-3822, 2015.
- SUFFREDINI, I. B. *et al.* Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts-Clusiaceae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 287-290, 2006.
- SUFFREDINI, I. B. *et al.* In vitro anti-HIV and antitumor evaluation of Amazonian plants belonging to the Apocynaceae family. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, v. 9, n. 2, p. 175-176, 2002a.
- SUFFREDINI, I. B.; CAVARSAN, E. C. M.; MARIN, L. C.; DÍAZ, I. E. C.; PACIÊNCIA, M. L. B.; FRANÇA, S. A. Análise preliminar de extratos de plantas da Amazônia brasileira usando ensaios de bancada em uma base de produção visando a identificação de produto natural com potencial antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 38, n. 1, 2017.
- SUFFREDINI, I.B. *et al.* As bases fisiológicas do câncer e a pesquisa de novos antineoplásicos. A importância da biodiversidade brasileira. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 20, n. 2, p. 103-28, 2002b.

- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, 44-84, 2007. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272506002196?via%3Dihub>.
doi: 10.1016 / j.biocel.2006.07.001. Acesso em: 05 abr. 2022.
- VASQUES, DA SILVA R.; NAVICKIENE HM, KATO MJ, BOLZANI VDA S, MÉDA CI, YOUNG MC, FURLAN M. Antifungal amides from Piper arboreum and Piper tuberculatum. *Phytochemistry*, v. 59, n. 5, p. 521-7, 2002. doi: 10.1016/s0031-9422(01)00431-9. PMID: 11853747.
- WAGNER, HILDEBERT; BLADT, SABINE. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Second edition. Springer Science & Business Media, 1996.
- WALLAND, J.; LAUPER, J.; FREY, J.; IMHOF, R.; STEPHAN, R.; SEUBERLICH, T.; OEVERMANN, A. *Listeria monocytogenes* infection in ruminants: Is there a link to the environment, food and human health? A review. **Zurich Open Repository and Archive**, v. 6, p. 319–328, 2015.
- WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN, M.; DEN BAKKER, H. C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 286-292, 2015.
- YOUNES, R. N.; SUFFREDINI, I. B.; OLIVEIRA, A. A.; VARELLA, A. D. Avaliação da Ação Antitumoral de Extratos de Plantas Brasileiras: Estudo Sistemático. **Prática Hospitalar**, v. 54, n. 12, p. 57-64, 2000.
- YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B.; Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, n. 6, p. 763-8, 2007.
- ZHANG, Q.; ZHANG, J.; SHEN, J.; SILVA, A.; DENNIS, D.A.; BARROW, C. J. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, n. 3-5, p. 445-450, 2006.

APÊNDICE

Notas a respeito das moléculas antimicrobianas utilizadas na técnica da disco difusão em ágar

1 Digluconato de clorexidina

A clorexidina é uma molécula ativa que em sua forma de sal, torna-se mais estável. Apresenta duas formas como sal, o digluconato de clorexidina que apresenta ação antimicrobiana e o dicloridrato de clorexidina com ação sobre o intestino. Quimicamente, a digluconato de clorexidina é uma bisguamida dicatiônica, que tem característica desinfetantes e também antissépticas, sendo desta forma, amplamente utilizada em produtos para saúde humana e animal (BRITO, 2019).

O digluconato de clorexidina, forma do sal da clorexidina, foi utilizado nos experimentos deste trabalho na concentração de 1% como padrão e apresenta alta atividade antimicrobiana, tendo em vista que é um antisséptico com um amplo espectro de ação, exercendo atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (BRITO, 2019). Quando aplicado topicamente, o N-clorinato derivado da clorexidina liga-se covalentemente às proteínas da região da pele e mucosa oral, resultando em um efeito antimicrobiano persistente, embora com absorção sistêmica limitada, mesmo sendo administrado na forma oral (BOYCE, PITTET, 2002).

A fórmula química do digluconato de clorexidina é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, com peso molecular 505,45 g/mol. Este sal possui características importantes, tais como baixa toxicidade, não apresenta absorção cutânea considerável, não é absorvido pelo organismo quando administrado na forma oral, possui ação cicatrizante e não deixa resíduos no local da aplicação. É um sal inodoro, incolor, não corrosivo, não volátil e biodegradável, devido a tais características, amplia a sua utilização por vários segmentos do mercado. Outras características que devem ser levadas em consideração para esta molécula devem-se ao seu comportamento químico anfótero, podendo atuar como ácido ou base, apresenta-se solúvel em água e possui incompatibilidade com tensoativos aniônicos (MERCK, 2019; Chlorhexidine Official FDA, 2018).

A respeito do mecanismo de ação do digluconato de clorexidina, ocorre que, por este ser uma molécula dicatiônica, a mesma é atraída pela carga negativa da superfície da membrana celular bacteriana, desta forma é adsorvida por interações eletrostáticas, sendo provável que seja por ligações hidrofóbicas ou por ligações de pontes de hidrogênio, embora essa adsorção é determinada pela concentração administrada deste sal. Em dosagens mais elevadas, causa danos irreversíveis nas células bacterianas, com precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas (BRITO, 2019).

2 Ampicilina

A ampicilina é um fármaco antimicrobiano de amplo espectro e faz parte da terceira geração das penicilinas, esta geração também é conhecida como aminopenicilina, tendo ação bactericida, inibindo a síntese de proteínas da parede celular bacteriana, conseqüentemente inibe a replicação. Sabe-se que as proteínas de ligação à penicilina, são constituintes da parede celular bacteriana, que é alvo dos antibióticos beta-lactâmicos. A ampicilina é o antimicrobiano de primeira escolha para o tratamento da listeriose, a resistência a este fármaco é infrequente (OLIVEIRA, OLIVEIRA, MIMICA, 2015).

3 Cloranfenicol

O cloranfenicol é um fármaco antimicrobiano de amplo espectro de ação, predominantemente bacteriostático, sendo ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O mecanismo de ação é realizado pela inibição da síntese de proteínas bacterianas, quando o mesmo se liga a subunidade 50S do ribossomo bacteriano. A forma de resistência é provocada pela enzima cloranfenicol acetiltransferase é mediada por plasmídios (RANG *et al.*, 2020).

4 Estreptomicina

A estreptomicina é um fármaco antibiótico pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos. De um modo geral, os antibióticos deste grupo (gentamicina, estreptomicina, amicacina, tobramicina e neomicina), apresentam semelhanças entre si na toxicidade, atividade microbiana e nas características

farmacocinéticas. O mecanismo de ação da estreptomicina é realizado através da inibição síntese das proteínas bacterianas. A estreptomicina tem ação bactericida. A estreptomicina é amplamente utilizada contra microrganismos entéricos Gram-negativos e Gram-positivos. É comum a combinação deste fármaco com uma penicilina, nas infecções causadas por estreptococos, *Listeria spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* (RANG *et al.*, 2020).

5 Gentamicina

Assim como a estreptomicina, a gentamicina também é um fármaco antibacteriano que faz parte do grupo dos aminoglicosídeos, sendo deste grupo o aminoglicosídeo mais utilizado. Apresenta ação bactericida.

6 Tetraciclina

A tetraciclina é um fármaco antimicrobiano que apresenta um amplo espectro de ação, faz parte do grupo das tetraciclinas, tem mecanismo de ação bacteriostático e capacidade de entrar dentro da célula bacteriana, agindo desta forma, na cadeia de síntese proteica, impedindo a ligação do RNA tranferase ao ribossomo bacteriano, inibindo a incorporação de aminoácidos e consequentemente a síntese proteica (OLIVEIRA, OLIVEIRA, MIMICA, 2015). Entretanto, a resistência à tetraciclina é comum ao gênero *Listeria spp.* e está diretamente associada a conjugação e troca de material genético entre bactérias dos seguintes gêneros: *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.* e *Listeria spp.* (BAQUERO *et al.*, 2020). A estreptomicina faz parte do grupo X de drogas, sua utilização em gestantes é contra-indicada, pois podem ocorrer efeitos teratogênicos, como a má formação fetal (ANVISA, 2003).