



PERFIL FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA E ANTIBACTERIANA DE *Bromelia antiacantha* BERTOL.

*PHARMACOGNOSTIC PROFILE AND EVALUATION OF ANTIBACTERIAL AND
CYTOTOXIC ACTIVITIES OF THE Bromelia antiacantha BERTOL.*

Rodrigo Luiz Fabri¹, Juliana Aparecida Batista Marques da Costa²

¹ Professor Adjunto I; Faculdade de Ciências da Saúde; Universidade Presidente
Antônio Carlos/Juiz de Fora/ Minas Gerais

² Aluna de Graduação do Curso de Buiomedicina; Faculdade de Ciências da Saúde;
Universidade Presidente Antônio Carlos/Juiz de Fora/ Minas Gerais

*autor para correspondência: rodrigofabri@yahoo.com.br

Recebido em 06/05/2012, Aceito em 28/05/2012.

RESUMO: O objetivo deste estudo foi investigar o potencial químico-terapêutico para as atividades citotóxica e antibacteriana de *Bromelia antiacantha* Bertol., coletada no sudeste do Brasil. Além disso, identificar as principais classes de constituintes fitoquímicos presentes na espécie. As folhas e frutos de *B. antiacantha* foram coletados e os respectivos extratos foram preparados. A atividade citotóxica foi avaliada frente à *Artemia salina* e a atividade antibacteriana foi realizada para seis linhagens de bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enterica* sorovar *tythimurium* e *Enterobacter cloacae*. Os principais fitoconstituintes encontrados nas amostras foram alcaloides, fenóis, flavonoides, triterpenos e esteroides. O teste de citotoxicidade mostrou que os extratos e partições das folhas e frutos de *B. antiacantha* tiveram moderada toxicidade, sendo mais efetiva para partição em diclorometano dos frutos. Em relação à atividade antibacteriana, os

extratos e partições de *B. antiacantha* foram ativos somente contra as linhagens de *P. aeruginosa* e *E. coli*, principalmente o extrato metanólico das folhas. *Bromelia antiacantha* se apresenta como uma fonte promissora de substâncias bioativas principalmente em relação à *P. aeruginosa* e *E. coli*.

PALAVRAS-CHAVE: *Bromelia*; toxicidade de drogas; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*.

ABSTRACT: The aim of this study was to investigate the chemical-therapeutic potential of *Bromelia antiacantha* Bertol., collected in southeastern Brazil, for the cytotoxic and antibacterial activities and identify the main phytochemical groups shown in the species. Leaves and fruits of *B. antiacantha* were collected and their respective extracts were prepared. The cytotoxic activity was evaluated against *Artemia salina* and antibacterial activity was performed for six bacteria strains, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enterica* sorovar *tythimurium* and *Enterobacter cloacae*. The main phytoconstituents found in the samples were alkaloids, phenols, flavonoids, triterpenes and steroids. The cytotoxicity assay showed that the extracts and partitions of leaves and fruits of *B. antiacantha* had moderate toxicity, being most effective in dichloromethane partition of the fruits. In regard to the antibacterial activity, *B. antiacantha* extracts and partitions were active only against *P. aeruginosa* and *E. coli* strains, mainly the methanolic extract of the leaves. *Bromelia antiacantha* shows itself as a promising source of bioactive substances mainly against *P. aeruginosa* and *E. coli*.

KEYWORDS: *Bromelia*; toxicity of drugs; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular de que acompanham o homem desde a pré- história e que evoluíram com ele ao longo dos anos⁽²⁾.

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido muito significativo nos últimos tempos. Segundo De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das

diferentes partes do mundo⁽¹⁾. Diversas culturas dos mais distintos lugares, desenvolvidas ou não têm utilizado o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças, práticas estas pessoas dos países em desenvolvimento no mundo, dependem da medicina tradicional para as suas necessidades básicas de saúde e cerca de 85% da medicina tradicional envolve o uso de plantas ou extratos desta⁽³⁾.

De acordo com o DECRETO nº 5813 de 22 de junho de 2006, ficou

aprovada a Política Nacional de Plantas Mediciniais, garantindo à população fitoterápicos, ampliando as opções terapêuticas aos usuários, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integridade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais⁽⁴⁾.

A *Bromelia antiacantha* Bertol. é uma planta popularmente conhecida como "aguama", "piña de ratón", e "gravatá" nos países do México, Peru e Brasil. No Brasil essa espécie pode ser encontrada nas regiões sul e sudeste, sendo caracterizada popularmente pelos nomes de gravatá, caraguatá, croata e caruatá^(5,6). Segundo Reitz⁽⁷⁾, os índios bororós no sul do Brasil ferviam os frutos para tratar a tosse e usavam como emoliente, uma tradição que foi continuada pelos colonizadores europeus.

Segundo Píon-Leon et al.⁽⁸⁾ na América Central, a planta é utilizada para fins terapêuticos e alimentares, sendo o fruto cozido a principal parte utilizada para o tratamento de tosse, bronquite, diabetes e escorbuto. Além disso, os autores observaram que o fruto apresentou atividade antibacteriana, principalmente para bactérias Gram positivas e correlacionaram essa atividade com os compostos fenólicos presentes no fruto, entre eles taninos e flavonóides. Em outro estudo realizado no sul do Brasil, com a mesma espécie, também foi observado atividade dos frutos e folhas para bactérias Gram

brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e positivas, destacando *Staphylococcus aureus*⁽⁹⁾.

Por considerar relevante o potencial antibacteriano de espécies vegetais frente às bactérias causadoras de infecções relacionadas ao cuidado em saúde, propõe-se nesse estudo explorar o potencial químico-terapêutico para as atividades antibacteriana e citotóxica e identificar as principais classes de constituintes fitoquímicos de *Bromelia antiacantha*, coletada do sudeste do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

As folhas e frutos de *Bromelia antiacantha* Bertol foram coletadas na zona rural da cidade de Rio Pomba MG, Brasil, em agosto de 2010. A exsicata foi depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJ 4226) da Universidade Federal de Juiz de Fora/MG.

Preparação do extrato metanólico e das partições

As folhas e frutos de *B. antiacantha* foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C e pulverizadas, a fim de obter o material vegetal seco da folha e do fruto (39,6 g e 129,5 g respectivamente). Estes materiais foram extraídos por maceração com metanol

(MeOH), à temperatura ambiente, até a exaustão. Os extratos foram concentrados à pressão reduzida utilizando evaporador rotatório, obtendo 18,2 g de extrato das folhas e 36,9 g de extrato dos frutos.

Os extratos metanólicos (10 g), após a remoção do solvente, foram ressuspensos em MeOH: água (8:2) e, em seguida, particionado com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila (3 x 200 ml). Os solventes foram evaporados e as partições foram pesadas e mantidas sobre refrigeração até o momento da realização dos ensaios fitoquímicos e biológicos.

Análise fitoquímica

As amostras (extratos e partições) foram submetidas às análises para determinação das principais classes químicas e metabólitos especiais, de acordo com o protocolo descrito por Matos⁽¹⁰⁾, com algumas modificações. Resumidamente, as amostras foram suspensas em MeOH (1mg/ml) e os seguintes testes foram realizados: taninos por meio da reação com gelatina 2,5%; triterpenos e esteroides pelo reativo de Liebermann-Burchard; alcaloides pelos reativos de Dragendorff, Bouchardat, Mayer e Bertrand; fenóis pela reação com FeCl₃ 5%; flavonoides pela reação de Shinoda e AlCl₃ 5%; antraquinonas pela reação de Borntraeger; saponinas pelo teste de

formação de espuma persistente e cumarinas pela reação com KOH 10%.

Atividade citotóxica

A presença de constituintes citotóxicos foi avaliada utilizando-se a metodologia proposta por Meyer et al.⁽¹¹⁾. Larvas de *Artemia salina* (microcrustáceos), obtidas a partir de ovos utilizados como ração para peixes ornamentais (TROPFISH®), foram colocadas para eclodir em aquário com água do mar artificial arejada durante 48 horas. Esse microcrustáceo é amplamente testado em ensaios de toxicidade devido à rapidez de seu crescimento e o baixo custo de criação e manutenção em laboratório. As amostras solubilizadas em água do mar artificial, com a ajuda de um diluente (DMSO 1%). Os testes foram realizados em tubos de ensaio com 10 náuplios, preenchidos com 4,5 ml de água do mar artificial e 0,5 ml das amostras. As amostras foram testadas em 5 concentrações diferentes de 1000 à 10 µg/ml. Após 24 horas foram contados os crustáceos vivos nas diferentes concentrações. Timol e a água do mar artificial + DMSO 1% foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em CL₅₀ (concentração necessária para matar 50% dos microcrustáceos) que foi calculado pelo programa estatístico Probit.

Atividade antibacteriana

Método de difusão em Agar

As linhagens padrão de bactérias usadas neste trabalho foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Shigella dysenteriae* (ATCC 13313), *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* (ATCC 13311) e *Enterobacter cloacae* (ATCC 10699). A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada de acordo com os protocolos descritos na literatura^(12,13). O meio de cultura foi o ágar Mueller-Hinton, preparado de acordo com as instruções do fabricante e colocados em placas de Petri. Inicialmente foi feito um inóculo com as colônias das linhagens padrão com uma alça de platina fazendo o repique em placa de Petri deixando em estufa biológica por 24 horas para crescimento. O inóculo foi adicionado à salina estéril para a padronização de uma densidade microbiana de 0,5 a 1,0 da escala de McFarland (10^8 células/ml). Em seguida 100 µl do inóculo foi aplicado em ágar

Mueller-Hinton com o auxílio de um bastão em L de vidro. Após 15 minutos, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro no ágar com o auxílio de um perfurador apropriado. As amostras vegetais foram diluídas em DMSO para uma concentração final de 5 mg/ml e uma alíquota de 50 µl de cada extrato foi colocado, assepticamente, nos poços da placa de cultura, previamente semeada com a bactéria. As placas foram incubadas a 37°C, e observadas após 24 horas. O diâmetro da zona de inibição foi expresso em mm. Todos os testes foram realizados em duplicata. Para controle positivo foi utilizado os antibióticos amoxicilina (30 µg), eritromicina (2 µg) e cloranfenicol (30 µg) e para controle negativo, DMSO.

RESULTADOS

Análise Fitoquímica

Os resultados da triagem fitoquímica dos extratos metanólicos e partições das folhas e frutos de *B. antiacantha* estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Triagem fitoquímica do extrato metanólico e partições das folhas e frutos de *Bromelia antiacantha*.

Amostras ^a	Principais fitoconstituintes ^{b,c}								
	Al	Sa	Fe	Fl	Ta	Tr	Es	An	Cm
<i>Folha</i>									
BAM	+	-	+	+	+	+	+	-	+
BAH	+	-	-	-	+	-	+	-	-

BAD	+	-	+	+	-	-	+	-	-
BAA	+	-	+	+	-	-	+	-	-
BAHa	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>Fruto</i>									
BAM	+	-	+	+	+	+	+	+	+
BAH	+	-	+	+	+	+	-	-	-
BAD	+	-	+	+	-	-	-	-	-
BAA	+	-	+	+	-	-	+	-	-
BAHa	-	-	+	+	-	+	-	+	-

^a BAM – extrato metanólico; BAH – partição em hexano; BAD – partição em diclorometano; BAA – partição em acetato de etila e BAHa – partição hidrometanólica.

^b Al – alcaloides; Sa – saponinas; Fe – fenóis; - Fl – flavonoides; Ta – taninos; Tr – triterpenos; Es – esteroides; An – antraquinonas e Cm – cumarinas.

Atividade citotóxica

Os resultados do teste de letalidade contra *Artemia salina* estão expressos na

Tabela 2. $CL_{50} < 250,0 \mu\text{g/ml}$ foi considerado significativo para extratos vegetais⁽¹⁴⁾.

Tabela 2: Teste de citotoxicidade do extrato metanólico e partições das folhas e frutos de *Bromelia antiacantha*.

Amostras ^a	Atividade citotóxica CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$) ^b
<i>Folha</i>	
BAM	> 1000
BAH	241,6 (124,4 - 469,1)
BAD	112,4 (49,0 - 250,0)
BAA	53,9 (21,0 - 138,2)
BAHa	>1000
<i>Fruto</i>	
BAM	> 1000
BAH	> 1000
BAD	29,8 (14,2 - 62,4)
BAA	> 1000
BAHa	> 1000
Timol ^c	1,4 (0,7-3,0)

^a BAM – extrato metanólico; BAH – partição em hexano; BAD – partição em diclorometano; BAA – partição em acetato de etila e BAHa – partição hidrometanólica.

^b 95% intervalo de confiança em parênteses

^c Controle positivo

Atividade antimicrobiana

O método de diluição em ágar foi realizado com o objetivo de se avaliar

qualitativamente a atividade antibacteriana das amostras. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade antibacteriana do extrato metanólico e partições das folhas e frutos de *Bromelia antiacantha*.

Amostras ^a	Atividade antibacteriana ^b					
	(Halo em mm)					
	Sa	Sd	Pa	Ec	En	St
<i>Folha</i>						
BAM	0	0	11	8	0	0
BAH	0	0	0	0	0	0
BAD	0	0	11	0	0	0
BAA	0	0	0	0	0	0
BAHa	0	0	0	0	0	0
<i>Fruto</i>						
BAM	0	0	0	0	0	0
BAH	0	0	0	0	0	0
BAD	0	0	0	0	0	0
BAA	0	0	10	0	0	0
BAHa	0	0	0	0	0	0
Amoxicilina ^c	20	0	0	24,5	0	0
Eritromicina ^c	15	0	0	14,5	0	0
Cloranfenicol ^c	20	32	28	18	30	30
DMSO ^d	0	0	0	0	0	0

^a BAM – extrato metanólico; BAH – partição em hexano; BAD – partição em diclorometano; BAA – partição em acetato de etila e BAHa – partição hidrometanólica.

^b Sd - *Shigella dysenteriae*; Sa - *Staphylococcus aureus*; Pa - *Pseudomonas aeruginosa*; Ec - *Escherichia coli*; En - *Enterobacter cloacae* e St - *Salmonella entérica sorovar tythimurium*

^c Controles positivos

^d Controle negativo

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise fitoquímica para o extrato metanólico e partições das folhas e frutos de *B. antiacantha* foram semelhantes, sendo que os alcaloides foram identificados em todas as amostras, exceto BAHa (Tabela 1). Fenóis e flavonoides só não foram observados em BAH das folhas. Antraquinonas foi identificado somente em BAM e BAHa dos frutos. Triterpenos foram positivos para BAM e BAHa das folhas e BAM, BAH e BAHa dos frutos e esteroides não foram identificados no BAHa das folhas e nos frutos esteve presente em BAM e BAA. Já taninos e cumarinas foram identificados em BAM e BAH, e BAM, respectivamente, tanto de folhas quanto de frutos. Saponinas não foram observadas em nenhuma das amostras testadas.

O bioensaio de toxidez frente à *Artemia salina* tem sido utilizado para seleção de extratos de plantas com substâncias de potencial farmacológico. O teste de citotoxicidade contra o microcrustáceo tem uma correlação positiva com atividade para células tumorais principalmente para células leucêmicas KB, sendo uma ferramenta útil para a determinação preliminar da atividade antitumoral⁽¹⁵⁾. Além da atividade antitumoral, outros testes farmacológicos também possuem ligação com essa atividade, destacando pesticida⁽¹⁵⁾, tripanomicida⁽¹⁶⁾ e

antimaláricos⁽¹⁷⁾. No presente estudo foi observado que para as folhas *B. antiacantha*, somente as BAH, BAD e BAA apresentaram citotoxicidade com CL₅₀ de 53,9; 112,4 e 241,6 µg/ml, respectivamente (Tabela 2). Já em relação aos frutos, BAD foi à única que obteve atividade com CL₅₀ 29,8 µg/ml. De acordo com Rieser et al.⁽¹⁴⁾, somente BAD de ambas partes usadas e BAA da folha apresentaram citotoxicidade significativa, sendo o CL₅₀ < 250,0 µg/ml. Este estudo corrobora com o trabalho realizado, no sul do Brasil, por Manetti et al.⁽⁹⁾, o qual identificou toxicidade no extrato alcoólico das folhas e frutos de *B. antiacantha*.

Os ensaios com bactérias tem sido de suma importância devido à frequência de resistência microbiana que tem levado ao aumento de infecções graves. A resistência por muitos microorganismos tem causado graves problemas de saúde pública e prejuízos econômicos^(18,19). A atividade antibacteriana foi observada tanto para as folhas quanto para os frutos de *B. antiacantha*, sendo susceptíveis somente duas linhagens de bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Em relação a *P. aeruginosa* as amostras ativas foram BAM e BAD das folhas e BAA dos frutos. Já para *E. coli* somente BAM das folhas apresentou atividade.

Esses resultados são extremamente importantes visto que

bactérias Gram-negativas como *E. coli* e *P. aeruginosa* são responsáveis por elevada incidência de infecções. As infecções mais frequentes em UTIs são aquelas causadas por bacilos Gram-negativos, como *P. aeruginosa*, em especial pneumonias associadas à ventilação mecânica. No Brasil, a resistência a *P. aeruginosa* é muito preocupante. Nas UTIs dos grandes hospitais, resistência a *P. aeruginosa* é de 20 a 75% para antibióticos beta-lactâmicos e aminoglicosídeos e isso vem acompanhado de resistência cruzada⁽²⁰⁾.

Mecanismos de ação antibacteriana para algumas dessas classes já foram descritos. Para os alcaloides, essa propriedade pode ser atribuída a sua habilidade de intercalarem com o DNA microbiano⁽²¹⁾. Para triterpenos e esteroides, o mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido, mas especula-se que estejam envolvidos na ruptura de compostos lipofílicos das membranas microbianas^(22,23). Os compostos fenólicos possuem uma relativa toxidez a microrganismos devido à localização e ao número de grupos hidroxilas presentes nos grupamentos fenólicos, sendo que quanto maior o número de hidroxilações, maior a toxicidade⁽²⁴⁾. Além disso, já foi descrito que quanto maior a oxidação dos fenóis, maior seu efeito inibitório⁽²⁵⁾. O mecanismo responsável pela toxicidade de compostos fenólicos para microrganismos inclui a inibição enzimática por compostos oxidados, possivelmente através de reações com

grupos sulfidrilas ou por interações não específicas com as proteínas⁽²⁶⁾. Os flavonoides, de maneira geral, são conhecidos por serem sintetizados por plantas em resposta a infecção microbiana⁽²⁷⁾. Sua atividade é provavelmente devido à habilidade de se complexarem com as proteínas extracelulares e solúveis e com a parede celular bacteriana. Flavonoides lipofílicos podem romper a membrana microbiana⁽²⁷⁾. Já os taninos apresentam seu mecanismo de ação provavelmente por inativar proteínas como as adesinas bacterianas, enzimas e proteínas transportadoras da parede celular⁽²⁸⁾.

CONCLUSÃO

Bromelia antiacantha se apresenta como uma fonte promissora de substâncias bioativas principalmente em relação à *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Estudo fitoquímico preliminar mostrou que essa espécie possui principalmente alcaloides, triterpenos, esteroides e flavonoides. Os resultados obtidos reforçam a necessidade de novas pesquisas a fim de ampliar os conhecimentos sobre as propriedades biológicas da espécie.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Doutora Fátima Regina Salimena pela identificação botânica da espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

1. Araújo CAC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. Mem. Inst Oswaldo Cruz. 2001;96(5):723-728.
2. Coutinho MR, Quadri MB, Moreira RFPM, Quadri MGN. Partial purification of anthocyanins from *Brassica oleracea* (red cabbage). Sep. Sci. Technol. 2004;39(16):3769-3782.
3. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz. J. Med. Biol. Res. 2000;33(2):179-189.
4. Brasil, Ministério da Saúde. Atos do Poder Executivo. Decreto n. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília (Brasil): Ministério da Saúde, 2006.
5. Lorenzi HE, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. 512 p.
6. Vallés D, Furtado S, Cantera AMB. Characterization of new proteolytic enzymes from ripe fruits of *Bromelia antiacantha* Bertol (Bromeliaceae). Int. Conf. Enzyme Technol. 2007;40(3):409-413.
7. Reitz R. Bromeliáceas e a malária – bromélia endêmica. In: Reitz R. (Ed). Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues; 1983.
8. Píon-Leon JF, López-Angulo G, Paredes-Lopes O, Uribe-Beltrán MJ, Diaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F. Physicochemical nutritional and antibacterial characteristics of the fruit of *Bromelia penguin* L. Plant Foods Hum. Nutr. 2009;64(3):181-187.
9. Manetti LM, Turra AF, Takemura OS, Svidzinski TIE, Júnior AL. Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica, moluscicida e antioxidante de *Bromelia antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). Rev. Bra. Plantas Med. 2010;12(4):406-413.
10. Matos FJA. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2 ed. Fortaleza: UFC; 1997.

11. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, MacLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982;45(1):31-34.
12. Perez C, Pauli M, Bazerque P. An antibiotic assay by the well agar method. *Acta Biol. Med. Exp.* 1990;15:113-115.
13. Ahmad I, Mehmood, Mohammad F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J. Ethnopharmacol.* 1998;62(2):183-193.
14. Reiser MJ, Gu ZM, Wood KV, Fang XP, Zeng L, McLaughlin JL. Five novel monotetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.* 1996;59(2):100-108.
15. MacLaughlin JL, Rogers LL. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inform. J.* 1998;32(2):513-524.
16. Zani CL, Chaves PPG, Quiroz R, De Oliveira, AB, Cardoso JE, Anjos AMG, et al. Brine shrimp lethality assay as screening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomedicine* 1995;2(1):47-50.
17. Perez H, Días F, Medina JD. Chemical investigation and *in vivo* antimalarial activity of *Tabebuia achraceae* ssp. *neochrysantha*. *Int. J. Pharmacogn.* 1998;35(4):227-231.
18. Jones RN. Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest.* 2001;119 Suppl 2:S397-404.
19. Prates MV, Bloch Júnior C. Peptídeos antimicrobianos. *Biotechnology* 2001;23:30-36.
20. Arruda EAG. Infecção hospitalar por *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistente: análise epidemiológica HC-FMUSP. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.* 1998;31(5):503-504
21. Phillipson JD, O'Neil MJ. New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharm. Nord.* 1989;1:131-144.
22. Mendonza L, Wilkens M, Urzua A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 1997;58(2):85-88.

23. Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl.). Food Chem. 2004;84(4):519-525.
24. Geissman CS. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: Florkin M, Stotz EH, editors. Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents. New York: Elsevier; 1963. 265p.
25. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. Phytochemistry 1991;30(12):3875-3883.
26. Mason TL, Wasserman BP. Inactivation of red beet beta glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. Phtyochemistry 1987;26(8):2197-2202.
27. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Ag. 2005;26 (5):343-356.
28. Ya C, Gaffney TH, Haslam E. Carbohydrate-polyphenol complexation. In: Hemingway RM, Karchesy JJ, editors. Chemistry and Significance of Condensed Tannins. New York: Plenum Press; 1988. 553p.