

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HEXÂNICO DE BULBO DE *Costus arabicus*

In vitro EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND MODULATING THE ETHANOL AND HEXANE EXTRACTS OF *Costus arabicus* BULB

Saulo Relison TINTINO¹; Glaucia Morgana de Melo GUEDES¹; Francisco Assis Bezerra CUNHA¹; Karla Katiúcia Alves dos SANTOS¹; Edinardo Fagner Ferreira MATIAS¹; Maria Flaviana Bezerra MORAIS-BRAGA¹; Jaqueline Cosmo ANDRADE¹; Elba S. SOUZA¹; Maria Audilene FREITAS¹; Liscássia Beatriz Batista ALENCAR¹; José Galberto Martins COSTA²; Henrique Douglas Melo COUTINHO¹

1. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato, CE, Brasil. saulorelison@gmail.com ; 2. Laboratório de Pesquisa com Produtos Naturais - URCA, Crato, CE, Brasil.

RESUMO: Neste estudo, extratos etanólicos e hexânicos de bulbo de *Costus arabicus* foram utilizados com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da resistência de antibacterianos e antifúngicos contra cepas bacterianas de *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e cepas fúngicas de *Candida Albicans*, *Candida Krusei*, *Candida Tropicalis*. A atividade antibacteriana e modulatória foi determinada por microdiluição. A inibição do crescimento das bactérias e fungos testados com extrato foi ≥ 1024 . A atividade de alguns antibióticos e antifúngicos foi reforçada sinergicamente quando estes extratos foram associados em concentrações sub-inibitórias com antimicrobianos. Portanto, sugerimos que os extratos etanólicos e hexânicos de bulbo de *Costus arabicus* podem ser utilizados como fonte de produtos naturais com o objetivo de modificar a resistência desses microorganismos aos antimicrobianos.

PALAVRAS-CHAVE: *Costus arabicus*. Produtos naturais. Atividade antibacteriana. Atividade antifúngica. Modulação.

INTRODUÇÃO

Muitas plantas têm sido objeto de intensas pesquisas devido ao seu potencial como fontes de drogas comerciais ou como compostos guia no desenvolvimento das drogas (CORDELL et al., 1991). Há um crescente interesse na influência de compostos biologicamente ativos isolados de plantas no tratamento de doenças causadas por microorganismos (AUSTIN; KRISTINSSON; ANDERSON, 1999).

Escherichia coli é uma das principais causas de doenças infecciosas humanas. São conhecidas por produzir enterotoxinas cujas propriedades e seu papel nas doenças diarreicas tem sido amplamente investigado. A atividade das citotoxinas na infecção humana já foi identificado (KONOWALCHUK et al., 1997, 1978; SCOTLAND et al., 1980), principalmente em infecções do trato urinário (HUNGHERS et al., 1982). Uma explicação para a cronicidade de algumas infecções oportunistas envolvendo o patógeno *Pseudomonas aeruginosa* é que este organismo é perito em formar biofilmes em que as bactérias estão protegidos contra as defesas do hospedeiro e antibióticos (COSTERTON et al., 1999). Bactérias do gênero *Staphylococcus* são

distribuídas na natureza, assim como na microbiota normal da mucosa da pele dos pássaros. Algumas espécies de *Staphylococcus* são frequentemente reconhecidas como agentes etiológicos de infecções oportunistas em muitos animais e humanos (NOSTRO et al., 2004; COUTINHO et al., 2009).

Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos (ARAÚJO et al., 2004). Candidíase ou candidose é a infecção frequentemente causada por fungos oportunistas, onde as espécies comumente implicados no quadro clínico desta patogenia são: *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. O espectro da candidíase é muito extenso, indo desde manifestações leves, como a colonização de mucosas até quadros sistêmicos, com a invasão de vários órgãos (COUTINHO, 2009).

Com a utilização inadequada alguns antimicrobianos estão perdendo muito rapidamente sua eficácia, o que torna necessário o desenvolvimento de novos medicamentos e técnicas eficazes de manejo. Assim as perspectivas para uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta.

Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam remediar este problema, como o controle do uso destes compostos potencialmente prejudiciais (VARGAS et al., 2004). Nos últimos anos, tem havido grande interesse científico em química e estudos farmacológicos das propriedades biológicas de plantas medicinais (COUTINHO et al., 2008).

Diversas plantas têm sido avaliadas não apenas para demonstrar seu potencial antimicrobiano de forma direta, mas também como fontes de substâncias com potencial de serem agentes capazes de modificar a ação antibiótica (GIBBONS, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). A família Costaceae é constituída por quatro gêneros: *Costus*, *Dimerocostus*, *Monocostus* e *Tapeinocheilas*, que estão distribuídos em áreas tropicais e subtropicais. *Costus* é o gênero com maior número de espécies, apresentando 175 espécies (SPECHT et al., 2001). Raízes e caules de plantas desse gênero são utilizadas pelos tradicionais medicina como diurético e contra a diabetes, gonorréia, sífilis, nefrite e outros problemas de saúde (LANS et al. 2001; MOSIHUZZAMAN et al., 1994).

Esse estudo teve o objetivo de avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana e moduladora de extratos etanólico e hexânico de bulbo de *Costus arabicus* frente cepas de bactérias e de fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Material bacteriano e fúngico

As cepas bacterianas utilizadas foram: *E. coli* (EC-ATCC10536 e EC27) e *S. aureus* (SA-ATCC25923 e SA358) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA ATCC15442 e PA 03). Todas as cepas foram mantidas em *slants* com *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Antes do ensaio as células foram cultivadas por 24h em

infusão cérebro coração (BHI, Difco Laboratories Ltda.). As linhagens fúngicas utilizadas foram: *Candida albicans* 40006; *Candida tropicalis* 40042; *Candida krusei* 2538. Todas as cepas foram mantidas em *slants* com *Heart Infusion Agar* (HIA; Difco Ltda) e antes dos ensaios as células foram cultivadas por 24 horas à 37°C em infusão de cérebro e coração (BHI, Difco Laboratories Ltda).

Material vegetal

Bulbo de *Costus Arabicus* foi coletado no município de Crato, Ceará, Brasil 07°14'19" de latitude sul, 39°24'54,6" de longitude oeste. Este material vegetal representa uma possível nova espécie biológica. Devido este fato, esta identificação está em processo no Jardim Botânico Instituto do Rio de Janeiro, Brasil, sob supervisão do Dr. João Marcelo A. Braga. Um voucher desta planta foi depositado com o número 1267 no Herbário Dárdano de Andrade Lima.

Preparação dos extratos etanólicos e hexânicos de bulbo de *Costus arabicus*

Para a produção dos extratos foram utilizadas 272g e 284g de bulbo de *Costus arabicus* que ficaram submersos, respectivamente, em etanol e hexano por 72h à temperatura ambiente. Após esse período foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo à vácuo (modelo Q-344B-Quimis, Brasil), utilizando um banho de água quente (modelo Q-214M2 - Quimis, Brasil), obtendo-se rendimentos dos extratos brutos apresentados na Tabela 1. A solução utilizada nos testes foi preparada sob uma concentração de 100mg/mL, dissolvidos em 1mL de DMSO, depois foi diluída em água destilada até uma concentração de 1024µg/mL.

Tabela 1: Massa e rendimento dos extratos etanólicos e hexânicos brutos (g).

Espécie Biológica	Solvente	Massa (Bulbo)	Extrato Bruto/ Rendimento
<i>Costus arabicus</i>	Etanol (EEBC)	272	1,42
	Hexano (EHBC)	284	0,5

EEBC – Extrato Etanólico de *Costus arabicus*; EHBC – Extrato Hexânico de *Costus arabicus*.

Drogas

Os antibióticos testados foram os aminoglicosídeos seguintes: amicacina, gentamicina e neomicina (Sigma Co., St. Louis, EUA). Os antifúngicos usados anfotericina B (Sigma Co., St. Louis, EUA), mebendazol (Lasa - Pharmaceutical Industries LTDA,

Brasil), nistatina (Laboratório Teuto Brasileiro S/A, Brasil) e Metronidazol (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brasil). Todos as soluções foram preparados seguindo as recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS (NCCLS2003).

Concentração Inibitória Mínima e Modulação de drogas antimicrobianas e antifúngicas

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em 10% BHI pelo método de microdiluição, usando uma suspensão de 10^5 UFC/mL, utilizado um inóculo de 100µL e uma quantidade de 100µL do extrato, a qual foi diluída de maneira seriada variando em 1024-2µg/mL (JAVADPOUR., et al 1996). CIM é definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento microbiano for observado. O teste de contração mínima inibitória foi realizado utilizando as bactérias padrões e a modulação com as bactérias multiresistentes, os mesmos fungos foram utilizados no CIM e na modulação. Para a avaliação dos extratos como modificadores da resistência microbiana, o (CIM) dos antibióticos e antifúngicos foi determinado na presença e na ausência do produto, o qual estava em concentração subinibitória (CIM / 8). As concentrações adicionadas das drogas antimicrobianas usadas nesse ensaio variaram de 1024-0,5µg/mL, para o antifúngico, já para o antibiótico a concentração

utilizada variou de 5000-2,5µg/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 ° C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com pode ser visto na Tabela 2, os extratos etanólico e hexânico não apresentaram atividade antibacteriana clinicamente relevante contra as cepas testadas (CIM \geq 1024µg/mL), que é consistente com outros relatos (PRABUSEENIVASAN et al., 2006), entretanto, quando combinados em uma concentração subinibitória com os antibióticos descobrimos que tanto o extrato etanólico quanto o extrato hexânico foram eficazes contra *S. aureus*. Aminoglicosídeos em associação com os extratos tiveram o CIM rebaixado: Gentamicina 7 vezes, Amicacina 4 vezes e Neomicina 2 vezes com EEBC e 5 vezes com EHBC (Tabela 3). A mesma eficácia não foi comprovada com *E. coli* e *P. aeruginosa*, o CIM da solução dos extratos associados aos antibióticos se equivaliam ao do controle dos antibióticos.

Tabela 2: Atividade antibacteriana e moduladora de EEBC contra as cepas de *E. coli*, *S. aerus* e *P. aeruginosa*.

Extrato/antibiótico	<i>E. coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>P.aerug</i>	
	Alone	+EEBC	Alone	+EEBC	Alone	+EEBC
EEBC	≥ 1024	-	≥ 1024	-	≥ 1024	-
Gentamicina	2,44	2,44	312,5	2,44	1250	1250
Amicacina	9,76	9,76	156,2	19,53	625	625
Neomicina	9,76	9,76	78,12	78, 125	625	625

EEBC – Extrato etanólico de Bulbo de *Costus arabicus*

Tabela 3: Atividade antibacteriana e moduladora de EHBC contra as cepas de *E. coli*, *S. aerus* e *P. aeruginosa*.

Extrato/antibiótico	<i>E. coli</i>		<i>S.aureus</i>		<i>P.aerug</i>	
	alone	+EHBC	Alone	+EHRC	Alone	+EHBC
EHBC	≥ 1024	-	≥ 1024	-	≥ 1024	-
Gentamicina	2,44	2,44	312,5	2,44	1250	1250
Amicacina	9,76	9,76	156,2	9,76	625	625
Neomicina	9,76	9,76	78,12	2.44	625	625

EHBC – Extrato hexânico de Bulbo de *Costus arabicus*

Estudos sobre atividade antimicrobiana de produtos naturais de plantas dessa mesma espécie tem sido relatados, Saraswathi et al., (2010) demonstrou em seu estudo a atividade antimicrobiana de extrato de *Costus igenus*. Entretanto, confirmando os nossos achados *Costus Psisonis* também não apresentou atividade antibacteriana contra *S. aerus* e *E. coli* (BRASILEIRO et al., 2006). Estudos da atividade

moduladora e antibacteriana das folhas *Costus arabicus*, foi verificado por Cunha et al., (2011), onde ele obteve resultados semelhantes aos nossos com CIM ≥ 1024 µg/mL e atividade moduladora sobre aminoglicosídeos.

Em se tratando dos fungos, nenhum extrato apresentou atividade antifúngica, mas como pode ser visto na Tabela 4 e 5, quando testado com *Candida albicans* o extrato EEBC em associação

com Anfotericina B potencializou o seu efeito, caracterizando um sinergismo reduzindo seu CIM para 2µg/ml. Com *Candida krusei* os extratos EHBC e EEBC potencializaram o efeito do

Mebendazol, já quando associados à Nistatina apresentaram antagonismo. Nenhum efeito modulatório foi observada com relação à Nistatina e Benzoilmetronidazol.

Tabela 4. Atividade antifúngica e moduladora de EEBC contra as cepas de *C. albicans*, *C.krusei* and *C. tropicalis*

Extrato/Antifúngico	<i>C. albicans</i>		<i>C.krusei</i>		<i>C.tropicalis</i>	
	Alone	+EEBC	Alone	+EEHM	Alone	+EEBC
EEBC	≥1024	-	≥1024	-	≥1024	-
Anfotericina B	≥1024	2	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	128	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	64	≥1024	≥1024	≥1024
benzoilmetronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024

EEBC – Extrato etanólico de Bulbo de *Costus arabicus*

Tabela 5: Atividade antifúngica e moduladora de EHBC contra as cepas de *C. albicans*, *C.krusei* and *C. tropicalis*

Extrato/Antifúngico	<i>C. albicans</i>		<i>C.krusei</i>		<i>C.tropicalis</i>	
	Alone	+EHBC	Alone	+EHBC	Alone	+EHBC
EHBC	≥1024	-	≥1024	-	≥1024	-
Anfotericina B	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024
Mebendazol	≥1024	≥1024	≥1024	128	≥1024	≥1024
Nistatina	≥1024	≥1024	64	≥1024	≥1024	≥1024
Metronidazol	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024	≥1024

EHBC – Extrato hexânico de Bulbo de *Costus arabicus*

De acordo com SILVA., et al (2008) extrato de *Costus psionis* se apresentaram contra o crescimento micelial das espécies de *Colletotrichum* spp. Extratos de várias plantas, tais como *Himatanthus articulatus*, *Mentha longifolia*, *Malva sylvestris* e *Psidium guajava*, foram testados contra leveduras do gênero *Candida* e representam uma alternativa no tratamento da candidose. (ALVES et al., 2009;SIQUEIRA et al., 2009) No entanto, este é o primeiro relatório de atividade e de potenciação da atividade de uma droga antifúngica combinado com um extrato de *Costus arabicus*.

Esta estratégia é chamada de "shotgun ervas" ou "efeito sinérgico de vários de segmentação" e refere-se a utilização de plantas e drogas em uma abordagem usando mono ou multi-extrato de combinações, o que pode afetar não apenas um alvo único, mas vários alvos, onde os diferentes componentes terapêuticos colaborar de uma forma sinérgica-agonísticas. Esta abordagem não é apenas para combinações de extratos;

combinações entre os produtos naturais ou extratos e produtos sintéticos ou antibióticos também são possíveis (COUTINHO et al., 2008; WAGNER AND ULRICH-MERZENICH 2009).

Os dados verificados poderão incentivar pesquisas futuras sobre os aspectos antimicrobianos de produtos naturais de isolados de *Costus arabicus*. O intuito é fundamentar sua possível utilização como agente modificador da resistência de microorganismos; tendo em vista, que o bulbo desta planta apresentou eficácia contra cepas bacterianas e fúngicas responsáveis pelo aumento da morbidade da população.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. João Marcelo A. Braga pela identificação da espécie. A Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa (FUNCAP) pelo auxílio financeiros.

ABSTRACT: In this study, ethanol and hexane extracts of the bulbs from *Costus Arabicus* were assayed to antibacterial, antifungal and modulatory activity against antibacterial and antifungal drugs using bacterial and fungal strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*. The antimicrobial and modulatory activity was evaluated by microdilution method. The activity of some antimicrobial drugs was synergistically enhanced when sub-inhibitory concentrations of these extracts were associated with antimicrobial drugs. Therefore, we suggest that ethanol and hexane extracts of bulbs from *Costus Arabicus* can be used as a source of natural products in order to modify the resistance of these microorganisms to antimicrobials, demonstrating an interesting strategy to combat drug-resistant infectious agents.

KEYWORDS: *Costus Arabicus*. Natural products. Antibacterial. Antifungal activity. Modulation.

REFERÊNCIAS

- ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. *In vitro* antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 42, n. 2, p. 222-224, abr. 2009.
- AL-BAYATI FA; Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Londres, v. 8, p. 1-6, jun. 2009.
- AUSTIN, D. J.; KRISTINSSON, K. G.; ANDERSON, R. M. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. Proceedings of the **National Academy of Sciences**. Nova York, v. 2, n. 96, p. 1152-6, Fev. 1999.
- ARAÚJO, J. C. L. V.; LIMA, E. O.; CEBALLOS, B. S. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUZA, E. L. FILHO, S. L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista Patologia Tropical**, Goiás, v. 33, n. 1, p. 55-64, jun. 2004.
- BRASILEIRO, B.G.;PIZZIOLO, V. R.; RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 195-202, Jun. 2006.
- CORDELL, G. A.; BECHER, C. W.W.; PEZZUTO, J. M. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? **Journal Ethnopharmacology**, Londres, v. 32, p. 117-33, abr. 1991
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Nova York, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, May 1999.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA J. G.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.;SIQUEIRA-JÚNIOR J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, Genebra, V. 54, n. 4, p. 328-330. Ago. 2008
- COUTINHO, H. D. M. Factors Influencing the Virulence of *Candida Spp*. **West Indian Medical Journal**, Mona, v. 58, n. 2, p. 160-163. Mar. 2009
- CUNHA, F. A. B.; MATIAS, E. F. F.; BRITO, S.V.; FERREIRA, F. S.; BRAGA, J. M. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Antibacterial, Phototoxic, and Synergistic Activity of Ethanol Extracts from cf. L. **Journal of Medicinal Food**, Seul, v. 14, p. 964-968. May 2011
- GIBBONS,S.Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, Londres ,v. 21, n. 2,p. 263-777.Mar.2004.

- GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, Londres, v. 27, p. 91-93. Ago. 2006.
- HUGHES, C.; MULLER, D.; HACHER, J.; GOEBEL, W. Genetics and pathogenic role of *Escherichia coli* haemolysin. **Toxicon**, Londres, v. 20, p. 247-252. Ago. 1982.
- JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M.; LO, W. C.; BISHOP, S. M.; ALBERTY, J. B.; COWELL, S. M.; BECKER, C. L.; MCLAUGHLIN, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medical Chemical**, Londres, v. 39, p. 3107-3113. Ago. 1996.
- KONOWALCHUK, J.; DICKIE, N. S.; STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and immunity**, Londres, v. 18, p. 775-779. Dec. 1977.
- LANS, C.; HARPER, T.; GEORGES, K.; BRIDGEWATER, E. Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. **BMC Complementary Alternative Medicine**, Londres, v. 1 p.1-10. Nov. 2001
- MOSIHUZZAMAN, M.; NAHAR, N.; ALI, L.; ROKEYA, B.; KHAN, A. K.; NUR-E-ALAM, M.; NANDI, R. P. Hypoglycemic effects of three plants from eastern Himalayan belt. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Londres, v. 26, n. 3, p. 127-138. Mar. 1994.
- NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, Londres, v. 230, p. 191-195. Jan. 2004.
- SARASWATHI, R.; UPADHYAY, L.; VENKATAKRISHNAN, R.; MEERA, R.; DEVI, P. Isolation and biological evaluation of steroid from stem of *Costus igneus*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. Londres, Nova York, v. 2, n. 5, p. 444-448. Fev. 2010.
- SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. Evaluation of the antibacterial activity of *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) leaves. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, n. 2, p. 241-244. Jun. 2008.
- SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. V.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. S. V. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista brasileira de farmacognosia**. Curitiba, v. 18, n. 2. p. 2009-212. Jun. 2008.
- SILVA, M. B.; NICOLI, A.; COSTA, A. S. V.; BRASILEIRO, B. G.; JAMAL, C. M.; SILVA, C. A.; PAULA JUNIOR, T. J.; TEXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. São Paulo, v. 10, n. 3, p. 57-60. Ago. 2008.
- SIMÕES, C. C.; ARAUJO, D. B.; ARAÚJO, R. P. C. Study, in vitro and ex vivo, of the action of different concentrations of propolis extracts against microorganisms present in human saliva. **Revista Brasileira Farmacognosia**. Curitiba, v. 18, n. 1, p. 84-89. Jan. 2008.
- SEQUEIRA, B. J.; VITAL, M. J. S.; POHLIT, A. M.; PARAROLS, I. C.; CAÚPER, G. S. B. Antibacterial and antifungal activity of extracts and exudates of the Amazonian medicinal tree *Himatanthus articulatus* (Vahl) Woodson (common name: sucuba). **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 104, p. 659-66, Jun. 2009.
- SCOTLAND, S. M.; DAY, N. P.; WILLSHAW, G. A.; B. ROWE Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. **The Lancet**, Londres, v. 315. p 90. Jan. 1980.
- SPECHT, C. D.; KRESS, W. J.; STEVENSON, D. W.; DESALLE, R. A molecular phylogeny of Costaceae (Zingiberales). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Londres, v. 21, p. 333-345. Abril. 2001.

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade Antimicrobiana “in vitro” de Extrato Alcoólico de Própolis. **Ciência Rural. Santa Maria**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, Jan. 2004.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**. Londres, v. 16, p. 97–110, Mar. 2009.