

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE *Azadirachta indica* “Neem” FRENTE A CEPA PADRÃO DE *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Natália de Oliveira Bernardi¹

Marisa Meurer¹

Vinicius Pereira Arantes²

BERNARDI, N. de O.; MEURER, M.; ARANTES, V. P. Estudo da atividade antibacteriana de extratos vegetais de *Azadirachta indica* “Neem” frente a cepa padrão de *Streptococcus pyogenes* atcc 19615. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 3, p. 117-122, set./dez. 2012.

RESUMO: *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente como “Neem” é uma árvore indiana, pertencente à família *Meliaceae*. Apresenta diferentes propriedades terapêuticas, dentre elas, a atividade antibacteriana. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do extrato bruto das folhas de *A. indica* frente à cepa padrão de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Os extratos de *A. indica* foram preparados utilizando o álcool etílico 70%, acetato de etila e hexano como agentes extratores. Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos foram realizadas as técnicas de macrodiluição em tubos e microdiluição em placa empregando a técnica do *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA). Para o extrato bruto produzido com álcool etílico 70%, revelou-se capaz de inibir a cepa *S. pyogenes* na concentração de 4000 µg/mL; para o hexano e acetato de etila foi possível denotar efeitos inibitórios em 2000 µg/mL e 250 µg/mL respectivamente. Destaca-se o extrato bruto produzido com acetato de etila, por apresentar melhor atividade antibacteriana, dentre os testes.

PALAVRAS-CHAVE: *Azadirachta indica*; Microbiologia; Plantas medicinais; *Streptococcus pyogenes*.

STUDY OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF VEGETAL EXTRACTS FROM *Azadirachta indica* “Neem” IN RELATION TO THE STANDARD STRAIN OF *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

ABSTRACT: *Azadirachta indica* A. Juss, popularly known as “Neem”, is an Indian tree belonging to the *Meliaceae* family. It has several therapeutic properties, among which, the antibacterial activity. The aim of this paper was to evaluate the antibacterial activity of the crude extract from the leaves of *A. indica* in relation to the standard strain of *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. The extracts of *A. indica* were prepared using ethanol 70%, ethyl acetate and hexane as the extracting agent. In order to determine the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the extracts, the macro dilution in tubes and micro dilution on plates using the MABA (*Microplate Alamar Blue Assay*) technique were used. The results presented reveal that among the techniques used for the study, ethanol 70% was able to inhibit the *S. pyogenes* strain at concentration of 4000 µg/mL; and that hexane and ethyl acetate presented possible inhibitory effects at 2000 µg/mL and 250 µg/mL, respectively. It is important to emphasize that the crude extract produced with ethyl acetate presented the best antibacterial activity among the tests.

KEYWORDS: *Azadirachta indica*; Microbiology; Medicinal Plants; *Streptococcus pyogenes*.

Introdução

As plantas medicinais constituem recursos importantes para o tratamento de enfermidades associados a medicina popular ou “caseira” (FARIAS et al., 1994). A cura por meio de plantas e derivados constitui a base da terapêutica, atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, enquanto 50% são de origem sintética. (DI STASI, 1996; ALVES et al., 2008).

A utilização de produtos botânicos para testes na medicina humana datam de centenas de anos, desde os tempos de Galeno e outros médicos da antiguidade (SIMÕES et al., 2000). Inúmeras substâncias com atividade antibacteriana foram isoladas ao longo da história, o que permite fornecer a indústria opções para produção de novos compostos terapêuticos, mais baratos e menos tóxicos (BRASIL, 2002; DI STASI, 1996).

Os flavonoides, isoflavonoides, terpenos, terpenoides e fisalinas, são compostos isolados de plantas e com atividade comprovada contra bactérias (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998; PIETRO et al., 2000; CANTRELL et al., 2001; JANÚRIO et al., 2002). A ocorrência de micror-

ganismos resistentes aos antimicrobianos, tem sido motivo de preocupação, pois a velocidade de isolados resistentes é maior que o isolamento de compostos ativos (CHATTOPADHYAY, 2009; PEREIRA, 2009).

Azadirachta indica é uma árvore milenar nativa da Índia, conhecida popularmente por “Neem”, utilizada há séculos no Oriente como planta medicinal para o tratamento de infecções virais. O “Neem” cresce bem em países tropicais e subtropicais, pertence a família *Meliaceae*, pode atingir cerca de 30 metros de altura e 80 cm de largura, a planta apresenta grande quantidade de folhas sempre verdes, imparipenadas, coloração verde-claro, raízes profundas e pivotante, flores pequenas e brancas, bissexuadas, inflorescências com 25 cm de comprimento, frutos lisos, glabros, elipsóides (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; EL-MAHMOOD; OGBONNA, 2010).

O “Neem” possui várias substâncias ativas (SUBAPRIYA; BHUVANESWARI; NAGINI, 2005). Mais de 135 compostos foram isolados e a *Azadirachtina* é o composto mais estudado e mais ativo (ARROTEIA; KEMMELMEIER; MACHINSKI, 2007; KOONA; BUDIDA, 2011).

Nos países asiáticos a planta era conhecida como

¹Acadêmicos do programa de iniciação científica (PIC/PIBIC) - curso de farmácia da Universidade Paranaense-Unipar- Unidade de Paranavai, Endereço: Avenida Huberto Bruning, 360 CEP: Paranavai-Pr, Tel: 0xx44-3421-4000

²Docente do curso de farmácia da Universidade Paranaense- Unipar- Unidade de Paranavai (vinicius@unipar.br), Endereço: Avenida Senador Souza Naves, 613- CEP:87.650.000, Centro – Cruzeiro do Sul – Pr, Telefone: 0xx44- 9903-7827

“farmácia-viva” e ou “árvore-milagrosa”, tendo visto seus múltiplos usos (ATAWODI; ATAWODI, 2009). Diversas propriedades dos compostos presentes no “Neem” têm sido descritas na literatura como, antipirético, antimalárico, efeito antitumoral, antiulceroso, antidiabético, contraceptivo, atividade depressora sobre o sistema nervoso central, efeito hipotensor, atividade antioxidante, ação antifúngica e ação antibacteriana (KOONA; BUDIDA, 2011).

O estudo da resistência bacteriana geralmente é baseado em microrganismos de importância epidemiológica, tais como *Streptococcus pyogenes* que pode configurar-se como resistente a múltiplos antimicrobianos, havendo a necessidade de se buscar novas alternativas terapêuticas. Desde 1940 a penicilina tem sido o antimicrobiano de escolha para o tratamento das infecções estreptocócicas, devido seu espectro de ação, baixa frequência com que produz reações adversas e baixo custo. Porém, falhas de tratamento têm sido associadas a dosagens inadequadas da penicilina, a presença de amostras de *S. pyogenes* tolerantes e capazes de invadir células epiteliais, onde permanecem protegidos da ação de agentes antimicrobianos, a coexistência de bactérias produtoras de beta-lactamases na faringe e amígdalas podem provocar a degradação da penicilina e permitir a sobrevivência do *S. pyogenes* na área infectada (SCALABRIN et al., 2003).

O gênero *Streptococcus* é constituído por cocos gram-positivos com 0,6 a 1,0 µm de diâmetro, imóveis, não esporulados, apresentam-se normalmente aos pares ou formando cadeias, possuem uma enorme distribuição pelo ambiente, colonizam e infectam os seres humanos, promovendo uma variedade de infecções agudas e crônicas, dentre elas a faringite, piodermites, erisipela, fasciite necrosante (KONEMAN et al., 2001).

S.pyogenes ou estreptococo beta-hemolítico do grupo A de Lancefield é a espécie bacteriana mais associada à etiologia de infecções primárias da faringe e amígdalas. Estas infecções podem ocorrer em qualquer faixa etária, porém são comuns em crianças e adolescentes com idade variando entre 5 e 15 anos, com período de incubação em torno de 12 a 24 horas. O paciente pode apresentar febre alta e dor à deglutição, com mal-estar geral, anorexia e astenia, sintomas que principalmente em crianças podem ser acompanhados por náuseas, vômitos e dor abdominal (SCALABRIN et al., 2003).

No Brasil, a investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana aumentou significativamente nos últimos anos, tendo visto que a utilização inadequada dos fármacos disponíveis no mercado está levando a perda de sua eficácia, o que torna necessário o desenvolvimento de novos medicamentos associado a pesquisa de extratos vegetais com ação antibacteriana.

O objetivo do trabalho foi: Determinar o MIC de extratos vegetais de *A.indica* frente a cepa padrão de *S.pyogenes* ATCC 19615, comparando as técnicas de macrodiluição em tubos e microdiluição em placa de 96 weels.

Material e Método

Preparo do material vegetal

O material foi colhido entre os meses de Abril e Junho de 2012 no Horto de Plantas Medicinais e Toxicológicas

da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara-SP. As folhas de *A.indica* foram transferidas para sacos plásticos, transportadas até o laboratório de Microbiologia da Unipar (Paranavaí-Pr). O material vegetal foi imerso em solução de hipoclorito de sódio a 0,01% por tempo de 45 min. A secagem foi realizada em estufa a temperatura de 40°C por 72 horas, após este período a droga vegetal foi triturada em moimho e armazenada até o momento do uso.

Preparo do extrato vegetal

Os extratos foram preparados utilizando 100g de folhas secas trituradas de *A. indica* para 1000 ml do agente extrator. Para obtenção do extrato, a massa recém pesada foi transferida para o aparelho de turbólise e submetido a agitação por tempo de 10 e descanso de 5 minutos, o ciclo foi repetido por 3 vezes. Após a extração, o produto da turbólise foi filtrado e acondicionado em frasco âmbar até o momento de uso. O álcool etílico 70%, Hexano (PA) e Acetato de etila (PA), foram empregados como agentes extratores.

Cepa Padrão

A cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 Newprov® empregada neste estudo, foi adquirida comercialmente através da Universidade Paranaense-Unipar.

Determinação da atividade antibacteriana

Para determinação da MIC uma suspensão bacteriana de *S.pyogenes* ATCC 19615 foi preparada empregando solução fisiológica estéril (NaCl 9,0 g/L), estabilidade e turbidez comparada a escala número 1 de Mac-Farland. A suspensão microbiana padrão, foi analisada quanto ao crescimento e contagem em UFC/mL, apresentando 103 -104 UFC/mL do microrganismo, quando semeado em Ágar Sangue.

Macrodiluição em tubos

Para determinação do MIC foram separados (9) nove tubos de ensaio estéreis, rotulados e dispostos em estante metálica, receberam o volume de 2,5 mL de caldo Mueller-Hinton, nos tubos de 1 a 9 respectivamente, adicionou-se ao primeiro tubo 2,5mL do extrato padronizado na concentração de 4000µg/mL, a diluição do tubo inicial totaliza-se portanto na concentração final em 2000 µg/mL. A partir deste momento procedeu-se diluição seriada com volume de transferência de 2,5mL do tubo 1(um) até o tubo 6 (seis) até atingir concentração de 62,5 µg/mL e descartado 2,5mL. O tubo de número 7 (sete) recebeu apenas caldo Mueller-Hinton, caracterizando o controle de meio, o oitavo tubo foi considerado controle do extrato e o 9 (nono) tubo foi rotulado como controle antibacteriano padrão, recebendo penicilina na concentração de 1,0mg/mL (Sigma®).Na sequência foi adicionado 0,05% do volume da suspensão bacteriana padronizada em cada tubo teste (1 a 6 e 9). O microrganismo foi incubado a 37 ±2°C por 24 horas e após este período a leitura foi realizada.

Para determinação da atividade antibacteriana, o MIC foi considerado como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano em tubos e a sua correspon-

dente leitura em placas de cultura empregando Agar Mueller-Hinton.

Microdiluição em placa

O trabalho foi realizado em triplicata utilizando o método de microdiluição em microplaca contendo 96 poços, seguindo de perto recomendações padronizadas por Franzblau (1998) e adaptações segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para a realização da técnica de microdiluição pela metodologia do MABA, foi utilizada placa estéril de 96 orifícios. Nas colunas de 1 e 12 em linhas de A a H foram adicionados 200 µL de água destilada estéril, perfazendo a necessidade de evitar provável evaporação dos compostos a serem testados.

Os orifícios presentes nas linhas de A a D da coluna 11 receberam 200 µL de caldo Mueller-Hinton, os orifícios correspondentes de E a H da coluna 11 receberam 100 µL de caldo Mueller-Hinton. Os orifícios correspondentes da linha A de colunas de 2 a 10 receberam 150 µL de meio caldo Mueller-Hinton e os de linha B a H referentes a coluna 2 a 10, receberam 100 µL de caldo Mueller-Hinton.

Foram então adicionados os extratos diluídos a serem testados. Todos os extratos foram diluídos para que estivessem na concentração inicial de 16.000 µg/ml. A linha A e B da microplaca e colunas de 2 a 10, procede-se nova diluição e os extratos partem da diluição de 4.000 µg/ml (linha A); 4.000 µg/ml (linha B); 2.000 µg/ml (linha C); 1.000 µg/ml (linha D); 500 µg/ml (linha E); 250 µg/ml (linha F); 125 µg/ml (linha G); 62,5 µg/ml (linha H).

Os orifícios de coluna 2 a 10 da linha A receberam 50 µL da diluição de 16.000 µg/ml. Os orifícios de linhas B referentes às colunas de 2 a 9 receberam 100 µL de extrato e a coluna 10 a droga padrão (Penicilina 10mg/ml). Após a homogeneização da linha B, procede à diluição de linha B a H de colunas de 2 a 10, ao final desprezar volume de 100 µL.

Ao final ser adicionado a suspensão bacilar diluída 1:25 referente a escala n.1 de MacFarland realizada após protocolo de obtenção da suspensão bacilar. Os orifícios de colunas de 2 a 10 e linhas de B a H receberam volume de 100 µL de suspensão bacilar, os orifícios das linhas E a H, referentes à coluna 11 receberam 100 µL da suspensão bacilar, com o intuito de ser controle positivo para bactérias.

As placas então foram seladas com filme de polietileno e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, no período de 24/48 horas de incubação os orifícios A -11 e E -11, receberam 25 µL de solução reveladora de Alamar Blue na proporção 1:1 e solução de Tween 80 a 10% para a cepa de *S.pyogenes*. As placas então foram reincubadas por 24 horas a 37°C. A presença de cor rósea indica crescimento microbiano e a presença de coloração azul, indica ausência de crescimento microbiano, para as cores intermediárias as placas foram reincubadas por mais 24 horas. Os extratos apresentados neste trabalho foram submetidos frente as três cepas padrão e testados em triplicata.

Resultados

Os testes foram realizados em triplicata, destinando maior padrão de confiabilidade entre os resultados. Os extratos de *A. indica* foram testados contra cepa padrão de

S.pyogenes ATCC 19615, empregando as técnicas de macrodiluição e MABA, conforme descrição no item material e métodos.

Tabela 1: Atividade antibacteriana do extrato vegetal de *A. indica* produzido com agente extrator Etanol (PA) e resultados comparados entre macrodiluição e microdiluição em placa

Microrganismo	Diluições em µg/mL	MIC Macrodiluição	MIC Microdiluição
Cepa padrão <i>S.pyogenes</i> ATCC 19615	4000	Inibição	Inibição
	2000	Crescimento	Crescimento
	1000	Crescimento	Crescimento
	500	Crescimento	Crescimento
	250	Crescimento	Crescimento
	125	Crescimento	Crescimento
	62,5	Crescimento	Crescimento

* Crescimento= Atividade antibacteriana não observada; Inibição = atividade antibacteriana observada.

Tabela 2: Atividade antibacteriana do extrato vegetal de *A. indica* produzido com agente extrator: Acetato de etila (PA) e resultados comparados entre macrodiluição e microdiluição em placa

Microrganismo	Diluições em µg/mL	MIC Macrodiluição	MIC Microdiluição
Cepa padrão <i>S.pyogenes</i> ATCC 19615	4000	Inibição	Inibição
	2000	Inibição	Inibição
	1000	Inibição	Inibição
	500	Inibição	Inibição
	250	Crescimento	Crescimento
	125	Crescimento	Crescimento
	62,5	Crescimento	Crescimento

* Crescimento= Atividade antibacteriana não observada; Inibição = atividade antibacteriana observada.

Tabela 3: Atividade antibacteriana do extrato vegetal de *A. indica* produzido com agente extrator: Hexano (PA) e resultados comparados entre macrodiluição e microdiluição em placa

Microrganismo	Diluições em µg/mL	MIC Macrodiluição	MIC Microdiluição
Cepa padrão <i>S.pyogenes</i> ATCC 19615	4000	Inibição	Inibição
	2000	Inibição	Inibição

1000	Crescimento	Crescimento
500	Crescimento	Crescimento
250	Crescimento	Crescimento
125	Crescimento	Crescimento
62,5	Crescimento	Crescimento

* Crescimento= Atividade antibacteriana não observada; Inibição = atividade antibacteriana observada.

As frações obtidas com hexano, acetato de etila e etanol, em função da diferença de polaridade, apresentaram MICs diferentes quando testados contra o mesmo agente nas mesmas condições. Para a fração do extrato produzido com acetato de etila, foi possível evidenciar efeito inibitório na concentração 500 µg/mL, foi inibitório para o teste de macrodiluição e microdiluição. Para o extrato produzido com hexano, foi possível evidenciar efeito inibitório na concentração de 2000 µg/mL.

Discussão

Desde os tempos mais remotos, as plantas desempenham importante papel na medicina caseira e funcionam como um verdadeiro laboratório para a pesquisa de novos medicamentos. Neste contexto caracteriza-se a presença do “Neem” como uma planta milenar, nativa da Índia e apresentando relevância dentre as propriedades medicinais e inseticidas (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005; CORDEIRO et al., 2006).

Na busca por novas alternativas terapêuticas, as plantas, por sintetizarem substâncias com atividade antibacteriana, como compostos fenólicos, taninos, terpenos, cumarinas, isoflavonoides, glicosídeos e substâncias oleosas (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998), passaram a despertar o interesse da indústria farmacêutica.

Segundo Biswas et al. (2002), *A. indica* sintetiza compostos que podem ser divididos em dois grupos: isoprenoides e não-isoprenoides. O primeiro inclui diterpenoides, triterpenoides e terpenoides e o segundo inclui proteínas, carboidratos, os compostos sulfurosos, os polifenólicos (como os flavonoides e seus glicosídeos), compostos alifáticos e os taninos. Os triterpenoides e limonoides incluem a Azadiractina principal composto responsável pela ação antibacteriana atribuída a planta (PANTOJA, 2007).

Diante do aparecimento de cepas resistentes de *S. pyogenes* aos antimicrobianos disponíveis no mercado, a pesquisa de novas substâncias com atividade antibacteriana se tornou de grande relevância para a quimioterapia futura deste microrganismo (NASCIMENTO et al., 2000).

Para o *S. pyogenes* o extrato em acetato de etila apresentou uma boa atividade antibacteriana, a técnica do MABA é rápida, de grande reprodutibilidade e apresenta menos erros de leitura devido ao princípio colorimétrico (FLANZBLAU et al., 1998; TELES; MOSCA, 2000). Vários relatos na literatura descrevem a atividade antibacteriana dos extratos de *A. indica* frente a bactérias Gram-positivas.

Chattopadhyay et al. (2009) em seu estudo destacou forte atividade inibitória contra *S. aureus* dos extratos aquosos e etanólicos produzidos por meio das folhas de *A. indica*. Alves et al. (2009) verificou em seu estudo atividade anti-

bacteriana dos extratos de *A. indica* contra cepas *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*.

Alguns estudos relataram atividade antibacteriana de extratos de *A. indica* frente a cepas da espécie *Streptococcus sp.* No estudo realizado por (SUBRAMANIAN; SISWOMIHARDJO; SUNRINTYAS, 2005), extratos produzidos a partir de folhas da planta demonstraram tal atividade contra *S. mutans* presentes na cavidade oral de humanos. Atawodi, Atawodi (2009) relataram em seu trabalho a atividade de extratos de tronco do *A. Indica* frente à mesma cepa. No estudo realizado por Gajanan (2012), a *A. indica* destacou-se por apresentar boa atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. pyogenes* quando produzido com clorofórmio como agente extrator. Entretanto, não foram encontrados na literatura pesquisada estudos avaliando atividade antibacteriana de extratos *A. indica* extraída com etanol, acetato de etila e hexano frente à cepa de *S. pyogenes*.

Para Alves et al. (2009), destacam-se efeitos antibacterianos frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *S. aureus*, *Escherichia coli*. Os efeitos foram observados empregando extratos etanólicos impregnados em discos de difusão e cloranfenicol como controle de droga, na concentração de 1,0mg/mL. Foram evidenciados comparativos entre diferentes concentrações de etanol e efeito correspondente empregando extratos de “neem.”

Para Biswas et al. (2002) o “Neem” apresenta diferentes efeitos, inclusive antibacteriano. Em seus estudos destaca-se atividade dos extratos da planta frente a microrganismos gram-positivos e negativos, *Mycobacterium tuberculosis*, espécies de *Klebsiella sp* e outros patógenos comuns aos seres humanos. Nos estudos de Darães et al. (2005) verificaram suscetibilidade de *Candida albicans* frente a extratos aquosos e alcoólicos de “Neem”. Destaca-se como interessante que substâncias com caráter de polaridades diferentes possam ser extraídas do “Neem”.

Destaca-se o efeito antibacteriano apresentado pelo extrato proveniente do acetato de etila frente a cepa de *S. pyogenes* ATCC 19615, tendo visto que resultado foi expressivo, apresentado resultado de 125µg/mL, faixa de corte muito responsiva sabendo que avaliações internacionais recomendam MIC de no mínimo 250 µg/mL para extratos brutos.

Para os extratos de hexano e etanol, os MICs foram menos expressivos. Para hexano o MIC foi de 250 µg/mL e para etanol de 500 µg/mL, respectivamente. Cabe destacar que o MIC apresentado pelo hexano ainda encontra-se na faixa de corte. Sabe-se que cepas de *S. pyogenes* ATCC 19615 são apresentadas em pleno desenvolvendo de resistência, principalmente quando isoladas de ambientes hospitalares e clínicas.

Conclusão

Conclui-se que os extratos testados apresentam efeito antibacteriano, porém o melhor MIC confere ao extrato bruto produzido com acetato de etila, o mesmo revelou-se mais eficaz frente a cepa padrão de *S. pyogenes* ATCC 19615 na concentração de 500µg/mL. Para os extratos de hexano e álcool etílico 70%, os MICs são menos expressivos em função da elevada concentração de extrato bruto para promover efeitos de inibição semelhante aquele apresentado pelo ace-

tato de etila. Sabe-se que o *S.pyogenes* é um microrganismo muito comum e sua constante evolução de resistência reafirmam a pesquisa de novas alternativas terapêuticas, acreditamos que outros testes com substâncias puras deverão ser realizados para determinação de MIC envolvendo extrato de *A.indica*.

Referências

ALVES, E. G. e al. A. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de *Miconia fallax* pelo método da microdiluição em caldo. **Revista da Sociedade de Química**, nov. 2008.

ALVES, D. P. et al. Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of neem (*Azadirachta indica* A. juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts. **Revista Bras. de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p 510-515, 2009.

ARROTEIA, C. C.; KEMMELMEIER, C.; MACHINSKI, J. M. Efeito dos extratos aquoso e oleoso de Nim [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] na produção de patulina em maçãs contaminadas por *Penicillium expansum*. **Cienc. Rural**, v. 37, n. 6, p. 1518-1523, 2007.

ATAWODI, S. E.; ATAWODI, J. C. *Azadirachta indica* (neem): a plant of multiple biological and pharmacological activities. **Rev. Phytochem.** v. 8, p. 601–620, 2009.

BISWAS, K. et al. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v. 82, n.11, p. 1336-1345, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose**. Brasília, 2002, 64 p. (Cadernos de Atenção Básica no 6. série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 148).

CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. G.; FISCHER, N. H. Antimycobacterial plant terpenoids. **Planta Med.** v. 67, p. 1-10, 2001.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quim. Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CHATTOPADHYAY, R. R. et al. A avaliação comparativa do potencial antibacteriano de algumas plantas utilizadas na medicina tradicional indiana para o tratamento de infecções microbianas. **Braz. arco. biol. Tecnologia**, v. 52, n. 5, p. 1123-1128, 2009.

CORDEIRO, C. H. G. et al. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Bras. Ciências Farmac.** v. 42, n. 3, p. 395-404, 2006.

DARÃES, G. V. et al. Suscetibilidade de *Candida albicans*

a extratos de *Azadirachta indica* (nim). **Braz. Oral. Res.** São Paulo, v. 4, p-12-17, 2005.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo inter-disciplinar. São Paulo: Unesp, 1996. 230 p.

EL-MAHMOOD, A. M.; OGBONNA, O. B.; RAJI, M. The antibacterial activity of *Azadirachta indica* (neem) seeds extracts against bacterial pathogens associated with eye and ear infections. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 14, p. 1414-1421, 2010.

FARIAS, M. R. et al. Espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12., 1994. Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: O Simpósio, 1994. p.125.

FRANZBLAU, S. G. et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the Microplate Alamar Blue Assay. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, n. 2, p. 362-366, 1998.

GAJANAN, M. Antibacterial Activity Of *Azadirachta indica* A. Juss. Leaves Extracts Against Skin Pathogens. **International Journal of Recent Trends in Science And Technology**, v. 2, n. 3, p. 33-35, 2012.

JANUÁRIO, A. H. et al. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. **Phytother. Res.** v. 16, n. 5, p. 445-448, 2002.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KOONA, S.; BUDIDA, S. Antibacterial potential of the extracts of the leaves of *Azadirachta indica* Linn. **Not. Sci. Biol.** v. 3, n. 1, p. 65-69, 2011.

NASCIMENTO, G. G. H. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. **Braz. Jour. of Microb.** v. 31, p. 247-256, 2000.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos usos. **Acta Farm. Bonarense**, v. 24, n.1, p.139-148, 2005.

PANTOJA, Y. L. et al. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. **Bioquímica**, v. 32, n. 4, p. 117-125, 2007.

PEREIRA, C. A. et al. Ação antimicrobiana *In Vitro* de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L. e *Pimpinella anisum* L. **Inst. Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 102-108, 2009.

PIETRO, R. C. L. R. et al. In vitro antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 335-338, 2000.

SCALABRIN, R. et al. Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.** v. 69, n. 6, p. 814-818, 2003.

SIMÕES, O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre; Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000.

SUBAPRIYA, R.; BHUVANESWAR, V.; NAGINI, S. Ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract induces apoptosis in the hamster buccal pouch carcinogenesis model by modulation of bcl-2, bim, caspase 8 and caspase 3. **Asian. Pacific. Journal. of Cancer. Prevention**, v. 6, p. 515-520, 2005.

SUBRAMANIAN, S. K.; SISWOMIHARDJO, W.; SUNRINTYAS, S. The effect of different concentrations of Neem (*Azadirachta indica*) leaves extract on the inhibition of *Streptococcus mutans* (In vitro). **Maj. Ked. Gigi. (Dent. J.)**, v. 38. n. 4, p. 176–179, 2005.

TELLES, M. A. S.; MOSCA, A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima da isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 59, n.1-2, p. 16-19, 2000.