



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JULIANA VITAL DOMINGOS SILVA

**EXTRATO DE *Cedrela odorata* L. COMO MODIFICADOR DE RESISTÊNCIA  
MICROBIANA DE CEPAS MULTIRRESSITENTES DE *Staphylococcus aureus***

Recife  
2020

JULIANA VITAL DOMINGOS SILVA

**EXTRATO DE *Cedrela odorata* L. COMO MODIFICADOR DE RESISTÊNCIA MICROBIANA DE CEPAS MULTIRRESSITENTES DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Área de concentração:** Fármacos e medicamentos.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.

**Coorientador:** Prof. Dr. Allan Jonathan Chernichiarro Correia.

Recife

2020

Catálogo na fonte  
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

S586e Silva, Juliana Vital Domingos  
Extrato de *Cedrela Odorata* L. como modificador de resistência microbiana de cepas multirresistentes de *staphylococcus aureus* / Juliana Vital Domingos Silva. – 2020.  
92 f.: fig.; tab.

Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.  
Inclui referências.

1. Plantas medicinais. 2. Compostos Fitoquímicos. 3. Sinergismo Farmacológico. 4. *Cedrela odorata* L. 5. Checkerboard. I. Amorim, Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2020 -167)

JULIANA VITAL DOMINGOS SILVA

**Extrato de *Cedrela odorata* L. como modificador de resistência microbiana de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 17/07/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Presidente)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ivone Antônia de Souza (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Este trabalho é dedicado ao meu filho, **João Vitor Vital Domingos da Silva** que me motiva a continuar na busca constante pelo meu crescimento e a minha mãe **Maria Lúcia Vital da Silva** e meu pai **Antônio Domingos da Silva** por tudo que sou hoje e meu esposo **Alúcio José da Silva Júnior** pelo apoio incondicional em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo em minha vida. A Ele toda honra e glória seja dada.

À minha mãe, **Maria Lúcia Vital da Silva**, pelo apoio em todos os momentos, cuidando do meu filho enquanto estive na UFPE e enquanto eu estudava. Pela educação, amor, companheirismo e motivações nos momentos de fragilidade e tudo que fez e faz por mim ao longo da minha vida. Todo esse resultado dedico a ela, pois sem ela não conseguiria ter chegado até aqui.

Ao meu pai, **Antônio Domingos da Silva**, por toda dedicação, amor, carinho de pai. Essa conquista também é sua, meu pai!

A meu esposo **Alúcio José da Silva Júnior**. companheiro, amigo que incondicionalmente me ajudou nesse projeto

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Elba Lúcia Cavalcanti** por ter me acolhido tão bem e acreditado em mim, por todo o apoio, amizade, compreensão, carinho, broncas e aprendizado compartilhado que me fizeram crescer como profissional e pessoa.

Ao meu Coorientador Dr. **Allan Jonathan Chernichiarro Correia**, por todo apoio e ensinamentos para realização desse trabalho.

Ao meu colega de laboratório e amigo **Jamildo Filho** que esteve comigo em todas as fases do experimento sempre me apoiando tecnicamente e emocionalmente.

Aos meus colegas do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT), **Jeniffer, Ana Klarissa, Dayvid Batista, Décio, Vinícius, Jorge Veras, Patrícia Neri, Bruno, Ítalo**.

Meu agradecimento especial á Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Danielle Macêdo** pela sua total disponibilidade, por abrir as portas do LAM (Laboratório de Análises Microbiológicas do departamento Ciências Farmacêuticas / UFPE).

Também meu agradecimento especial a mestra **Ianca Karine**, que esteve comigo em todas as etapas do ensaio microbiológico, que saiu do departamento juntamente comigo vários dias, na madrugada, realizando experimento.

À Professora **Cláudia** por disponibilizar o equipamento HPTLC do Laboratório de Biofísica Química para realização das análises.

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e todas as pessoas que o compõem.

A **Alexandre** e a comunidade do Carão pela receptividade e pelo auxílio na coleta das plantas utilizadas nesta pesquisa.

A **Nerilin e Rilvam** por toda gentileza e empenho para resolução das minhas demandas na secretaria da pós graduação.

A Farmacêutica Dr<sup>a</sup> **Lúcia Reis** por todo apoio que me deu para concluir essa etapa da minha vida.

A Dr<sup>a</sup> **Kelly Galindo**, farmacêutica, por todo apoio e incentivo dado para que eu pudesse vencer essa etapa.

A **Finha Oliveira** pelo apoio dado nessa etapa da minha vida.

Aos meus irmãos **Tiago e Felipe** e aos meus amigos que torceram por mim. E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para essa conquista.

## RESUMO

A resistência microbiana é uma ameaça para o tratamento de infecções. O uso de plantas medicinais contra processos infecciosos conduz a pesquisas na busca pela obtenção de novos agentes com propriedade antimicrobiana, como metabólitos secundários extraídos dos vegetais, os quais podem atuar modificando a resistência microbiana. Pesquisas combinando extratos de ervas ou óleos essenciais com antimicrobianos comerciais têm se mostrado como uma alternativa para combater as espécies multirresistentes e possibilitar a reintrodução na terapêutica de fármacos já conhecidos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a modificação de resistência de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* associando diferentes antimicrobianos (eritromicina, benzilpenicilina, ampicilina, levofloxacina) ao extrato de *Cedrela odorata* L. Foram obtidos extratos brutos hidroetanólicos da casca e folha do vegetal em estudo, que também foram submetidos a uma coluna filtrante, no qual a eluição foi realizada com solventes de polaridades crescentes para obtenção das frações do extrato. Foi realizada a análise fitoquímica por *High-Performance Thin-layer Chromatography* (HPTLC), doseamento de compostos fenólicos totais, taninos e flavonoides, atividade antioxidante pelo método DPPH (Difenil-1-picril-hidrazila) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Os extratos mais promissores foram selecionados e submetidos ao método de “*checkerboard*” para avaliar as interações com os antimicrobianos das diferentes classes. Através da análise fitoquímica, detectou-se a presença de compostos fenólicos, cumarinas, mono, sesqui e diterpenos, derivados antracênicos, triterpenos e esteroides, e naftoquinonas, contudo não foram encontrados alcaloides em nenhum dos extratos. A fração metanólica ( $CE_{50} = 18,24 \pm 1,07 \mu\text{g/mL}$ ) e o extrato bruto das cascas ( $CE_{50} = 18,41 \pm 1,38 \mu\text{g/mL}$ ) apresentaram boa atividade antioxidante. As frações acetato de etila e tolueno da casca apresentaram melhores resultados antimicrobianos com CIM de  $500 \mu\text{g/mL}$ , caracterizando uma ação moderada frente à cepa de *S. aureus* (LAMUFPE406.6) sendo esses extratos combinados aos antibióticos selecionados, através do método *checkerboard*, apresentando Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) menor que 0,5 para associações eritromicina/fração acetato e benzilpenicilina/fração acetato e na combinação levofloxacina/fração tolueno apresentando efeito sinérgico. Os extratos da casca de *Cedrela odorata* L. apresentam uma atividade promissora no combate

de infecções por *Staphylococcus aureus* resistentes aos antibióticos usuais e consolida novas estratégias terapêuticas, que possibilitam a identificação de constituintes que associados com fármacos, buscam potencializar o efeito antimicrobiano, conseqüentemente, modificando da resistência de microrganismos.

**Palavras chave:** Plantas medicinais. Compostos Fitoquímicos. Sinergismo Farmacológico. *Cedrela odorata* L. *Checkerboard*.

## ABSTRACT

Microbial resistance is a threat to the treatment of infections. The use of medicinal plants against infectious processes leads to research in the search for new agents with antimicrobial properties, such as secondary metabolites extracted from vegetables, which can act to modify microbial resistance. Research combining extracts of herbs or essential oils with commercial antimicrobials has been shown as an alternative to combat multidrug-resistant species and to enable reintroduction in the treatment of drugs already known. The objective of this work was to evaluate the resistance modification of multi-resistant strains of *Staphylococcus aureus* by associating different antimicrobials (erythromycin, benzylpenicillin, ampicillin, levofloxacin) to the *Cedrela odorata* L. extract. Crude hydroethanolic extracts from the peel and leaf of the study plant were obtained they were also submitted to a filter column, in which the elution was carried out with solvents of increasing polarity to obtain the fractions of the extract. Phytochemical analysis was performed by High-Performance Thin-layer Chromatography (HPTLC), determination of total phenolic compounds, tannins and flavonoids, antioxidant activity by the DPPH method (Diphenyl – 1 – picryl – hydrazil) and determination of Minimum Inhibitory Concentration (CIM) . The most promising extracts were selected and submitted to the “checkerboard” method to assess interactions with antimicrobials from different classes. Through phytochemical analysis, the presence of phenolic compounds, coumarins, mono, sesqui and diterpenes, anthracenic derivatives, triterpenes and steroids, and naphthoquinones was detected, however, no alkaloids were found in any of the extracts. The methanolic fraction ( $EC_{50} = 18.24 + 1.07 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) and the crude shell extract ( $EC_{50} = 18.41 + 1.38 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) showed good antioxidant activity. The ethyl acetate and toluene fractions of the bark showed better antimicrobial results with MIC of  $500 \mu\text{g} / \text{mL}$ , characterizing a moderate action against the strain of *S. aureus* (LAMUFPE406.6), these extracts being combined with the selected antibiotics, through the checkerboard method, presenting Fractional Inhibitory Concentration Index (ICIF) less than 0.5 for combinations of erythromycin / acetate fraction and benzylpenicillin / acetate fraction and in the combination levofloxacin / toluene fraction showing synergistic effect. The bark extracts of *Cedrela odorata* L. have a promising activity in the fight against infections by *Staphylococcus aureus* resistant to the usual antibiotics and consolidate new therapeutic strategies, which

allow the identification of constituents that associated with drugs, seek to potentiate the antimicrobial effect, consequently, modifying resistance of microorganisms.

**Keywords:** Medicinal plants. Phytochemicals. Drug Synergism. *Cedrela odorata* L. Checkerboard.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Cedrela odorata</i> L., comunidade do Carão, município de Altinho, Pernambuco.....	27
Figura 2 –	Núcleo Fundamental dos Flavonoides.....	30
Figura 3 –	Estrutura do tanino hidrolisável (a) e condensado (b).....	31
Figura 4 –	Estrutura Química do Alcalóide da Montanina.....	32
Figura 5 –	Exemplo de terpenos e suas estruturas.....	33
Figura 6 –	Montagem da Coluna Filtrante com topo-sólido com o extrato incorporado à Sílicagel.....	43
Figura 7 –	Aspecto macroscópico do extrato bruto seco das cascas (a) e folhas (b) de <i>Cedrela odorata</i> L.....	54
Figura 8 –	Placas cromatográficas monoterpene, sesqui e diterpenos, dos extratos de folha e casca de <i>Cedrela odorata</i> L. revelada com vanilina sulfúrica na luz visível.....	57
Figura 9 –	Placas cromatográficas triterpenos e esteroides, dos extratos de casca de <i>Cedrela odorata</i> L revelada com Lieberman-Burchard a 360nm.....	57
Figura 10 –	Placa da combinação entre a fração acetato de etila da casca de <i>Cedrela odorata</i> L e eritromicina frente a Isolado de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistente (LAMUFPE406.6) pelo método de <i>Checkerboard</i> .....	70
Figura 11 –	Placa da combinação entre a fração tolueno da casca de <i>Cedrela odorata</i> L e benzilpenicilina frente a isolado de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistente (LAMUFPE406.6) pelo método de <i>Checkerboard</i> .....	71
Figura 12 –	Placa da combinação entre a fração tolueno da casca de <i>Cedrela odorata</i> L e Levofloxacina frente a Isolado de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistente (LAMUFPE406.6) pelo método de <i>Checkerboard</i> .....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sistemas de eluição, padrões e reveladores utilizados para evidenciar os principais grupos de metabólitos secundários segundo Wagner e Bladt (1996).....	44
Tabela 2 –	Cepas da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas da UFPE utilizadas na pesquisa e suas respectivas fontes.....	49
Tabela 3 –	Antimicrobianos usados na pesquisa e suas Classes terapêuticas.....	50
Tabela 4 –	Extratos brutos e frações da casca e folha de <i>Cedrela odorata</i> L.....	50
Tabela 5 –	Pesos e rendimentos das frações das cascas de <i>Cedrela odorata</i> L.....	55
Tabela 6 –	Caracterização fitoquímica do extrato bruto e frações de casca e folha de <i>Cedrela odorata</i> L. por HPTLC utilizando sistema eluente e reveladores específicos.....	56
Tabela 7 –	Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides expressos em média $\pm$ desvio padrão, das frações e extratos brutos das cascas e folhas de <i>Cedrela odorata</i> L.....	59
Tabela 8 –	Atividades antioxidantes expressas em média $\pm$ desvio padrão, das frações e extratos brutos das cascas e folhas de <i>Cedrela odorata</i> L.....	62
Tabela 9 –	Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos e CE <sub>50</sub> expressos em média $\pm$ desvio padrão, das frações e extratos brutos das cascas e folhas de <i>Cedrela odorata</i> L.....	64
Tabela 10 –	Concentrações Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antibióticos selecionados para pesquisa frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> da coleção do Laboratório Análises Microbiológicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE.....	65

Tabela 11 – Concentrações Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos hidroalcoólicos de <i>Cedrela odorata</i> L. frente as cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> de isolados clínicos multirresistentes da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – LAM do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE.....	67
Tabela 12 – Interação entre as frações acetato de etila e tolueno da casca de <i>Cedrela odorata</i> L com eritromicina, benzilpenicilina, levofloxacina e ampicilina utilizando método <i>Checkerboard</i> frente a Isolados <i>Staphylococcus aureus</i> LAMUFPE406.6da coleção de do Laboratório de Análises Microbiológicas – LAM/UFPE.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CE50	Concentração Efetiva 50
CIF	Concentração Inibitória Fracionaria
ICFI	Índice da Concentração Inibitória Fracionaria
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	Difenil-1-picril-hidrazila
EAT	Equivalente de Ácido Tânico
ER	Equivalente de Rutina
FIC	<i>Fraction Inhibitory Concentration</i>
FICI	<i>Fraction Inhibitory Concentration Index</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HPTLC	<i>High-Performance Thin-Layer Chromatography</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
LAM	Laboratório de Análises Microbiológicas
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
ORSA	<i>Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
PBP	<i>Penicillin Binding Protein</i>
VRSA	<i>Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
3.1	PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	21
3.2	BIOMA DA CAATINGA.....	25
3.3	<i>Cedrela odorata</i> L.....	26
3.4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA...	28
3.5	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	33
3.6	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	35
3.7	SINERGISMO E MÉTODO <i>CHECKBOARD</i> .....	38
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>42</b>
4.1	COLETAS DO MATERIAL VEGETAL.....	42
4.2	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS...	42
4.3	FRACIONAMENTOS (COLUNA FILTRANTE).....	43
4.4	ANÁLISE FITOQUÍMICA POR HPTLC ( <i>HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY</i> ).....	43
4.5	DOSEAMENTO DE CONTEÚDO FENÓLICO, TANINOS E FLAVONOIDES.....	44
<b>4.5.1</b>	<b>Determinação do conteúdo fenólico total.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5.2</b>	<b>Determinação do conteúdo de taninos.....</b>	<b>45</b>
<b>4.5.3</b>	<b>Determinação do conteúdo de flavonoides.....</b>	<b>46</b>
4.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	47
4.7	TESTES DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E <i>CHECKERBOARD</i> .....	48
<b>4.7.1</b>	<b>Agentes Antimicrobianos.....</b>	<b>48</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Preparação da Suspensão Bacteriana.....</b>	<b>50</b>
<b>4.7.3</b>	<b>Teste para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....</b>	<b>51</b>

4.7.4	<b>Checkerboard</b> .....	51
4.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	53
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	54
5.2	ANÁLISE FITOQUÍMICA POR HPTLC ( <i>HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY</i> ).....	55
5.3	DOSEAMENTO DE CONTEÚDO FENÓLICO, TANINOS E FLAVONOIDES.....	58
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	61
5.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	64
5.5.1	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b> .....	64
5.5.2	<b>Checkerboard</b> .....	69
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	75
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

O emprego dos produtos naturais com finalidades terapêuticas pela humanidade é antigo. O homem, há muito tempo traz uma série de descobertas sobre o ambiente onde vive, possibilitando trocar informações diretamente com o meio, garantindo assim sua sobrevivência (ARGENTA, 2011). A busca e o uso de plantas com propriedades terapêuticas são atividades que acompanham a evolução da humanidade e são utilizadas nas várias práticas da fitoterapia (RIBEIRO, 2014).

No Brasil, são conhecidas cerca de 43.020 espécies vegetais distribuídas em zonas biogeográficas (biomas), como, Pantanal, Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica. Este cenário, associado à diversidade cultural resultante da miscigenação de povos indígenas, africanos e europeus, os quais tinham modos diferentes de utilizarem as plantas medicinais disponíveis (JORGE *et al*, 2004), torna o país rico para este tipo de estudo com plantas medicinais. Várias pesquisas foram realizadas e obtiveram resultados importantes referentes à atividade terapêutica de espécies vegetais que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (DESMARCHELIE *et al*, 1999; JORGE *et al*, 2004; HANAZAKI, 2006; LIMA *et al*, 2013; RIBEIRO, 2014; ALBUQUERQUE; DUARTE *et al*, 2016).

Enfermidades causadas por micro-organismos como bactérias e fungos ainda são um grande desafio para a ciência (ARGENTA, 2011). O tratamento se dá pela administração de drogas antimicrobianas com atividade para determinado micro-organismo, porém o uso indiscriminado desses agentes tem propiciado o aparecimento de diversos isolados clínicos com resistência (COHEN, 1992; NASCIMENTO, 2000).

Apesar da grande variedade de antibióticos existente no arsenal terapêutico desenvolvido nos últimos tempos pela indústria farmacêutica, assim como pela indústria química, tem sido observado o aumento de micro-organismos resistentes aos antibióticos presentes no mercado, o que estimula a procura por novas fontes de substâncias dotadas de atividades antimicrobianas (RIBEIRO, 2008). Atualmente, diversas pesquisas acontecem com o objetivo de diminuir ou até mesmo cessar a resistência de bactérias aos antimicrobianos, neste contexto realizando associação de derivados plantas medicinais a antimicrobianos.

Segundo Padilha *et al* (2010) a resistência aos antimicrobianos é um desafio para saúde pública mundial. Essa resistência microbiana se desenvolve como uma

habilidade da população bacteriana de se adaptar. A utilização em excesso e de forma indiscriminada de fármacos antimicrobianos seguiu-se do surgimento de bactérias resistentes. A resistência microbiana está associada ao uso destes antibióticos com redução de sua eficácia e possibilidade de cura durante o tratamento de doenças causadas por bactérias geralmente comuns (CHENG *et al*, 2016). O crescimento da resistência ao arsenal terapêutico usado no tratamento dessas doenças resulta numa menor eficácia dos antibacterianos, antiparasitários, medicamentos antivirais e antifúngicos tornando o tratamento de pacientes difícil, caro ou até mesmo impossível (WHO, 2003).

Com uma estrutura química diferente dos antibióticos derivados de micro-organismos, os antimicrobianos de origem vegetais podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, bloqueando ou ativando reações e síntese enzimática ou até mesmo modificando a estrutura de membranas (MICHELIN *et al*, 2005). Devido ao alto número de mortes, a inativação de antibióticos por patógenos como *Staphylococcus aureus* ainda representa um grande desafio (CASSINI *et al*, 2018; FRIENDRICH, 2019).

*Cedrela odorata* L., conhecida popularmente como “cedro”, é uma planta utilizada em pesquisas científicas, em razão de ser empregada na medicina popular como recurso no tratamento de várias doenças. A literatura aponta o gênero *Cedrela* com atividade antimalárica, antileishmanial, antimicrobiana, antitripanosomal e hipoglicêmica (GÓMEZ MALDONADO, 2014; GIORDANI *et al*, 2015). A casca do “cedro” é utilizada por moradores de algumas regiões da Amazônia, no tratamento da diabetes, malária, doenças gastrointestinais e cicatrização de feridas (BIESKI, 2014 *apud* GIORDANI *et al*, 2015). Já as folhas são menos citadas

Atualmente, pesquisas científicas buscam identificar novos compostos que possibilitem a combinação entre extrato de plantas e antibióticos já existentes, com objetivo de inibir os mecanismos da resistência bacteriana, refletindo diretamente em novas estratégias terapêuticas (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; BARRETO *et al*, 2014).

## 2 OBJETIVOS

Com a finalidade de aprofundamento dos estudos sobre fontes de material vegetal com propriedade de modulação de antimicrobianos frente a isolados de *Staphylococcus aureus*, o presente trabalho teve os seguintes objetivos.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a modificação de resistência microbiana *in vitro*, de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* frente a antimicrobianos de diferentes classes associados a extratos de folhas ou cascas de *Cedrela odorata L.*

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Coletar, autenticar e processar as amostras da espécie *Cedrela odorata L.*, para obtenção dos extratos;
- b) Obter os extratos secos brutos hidroetanólicos de folhas e casca espécie vegetal estudada;
- c) Obter as frações em diferentes solventes dos extratos hidroetanólicos de folhas e casca da espécie vegetal estudada;
- d) Conhecer o perfil fitoquímico do extrato bruto e frações das folhas e casca de *Cedrela odorata L.*;
- e) Analisar a capacidade antioxidante dos extratos brutos das espécies estudadas sobre a remoção de radicais livres induzidos por 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH);
- f) Determinar a CIM do extrato bruto, frações de *Cedrela Odorata L.* e antimicrobianos (eritromicina, benzilpenicilina, ampicilina, levofloxacina) frente cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*;

g) Realizar protocolo de modulação por *Checkerboard* frente à cepa de *Staphylococcus aureus* multirresistente para a qual o extrato de *Cedrela odorata L.* apresentou melhor CIM;

h) Avaliar a capacidade do extrato de *Cedrela odorata L.* de modificar a resistência microbiana de cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* frente aos antibióticos testados nas respectivas associações.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PLANTAS MEDICINAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers, um dos tratados médicos mais antigos e importantes do mundo, onde lista mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (VILELA, 1977; PINTO *et al*, 2002).

Evidências arqueológicas mostram que o uso de drogas era amplo em culturas antigas. A civilização grega, com seus filósofos, contribuiu para construção da história natural. Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, se destacou por adotar a natureza como guia na escolha dos remédios. Teofrasto (372 a.C.), aprendiz de Aristóteles, escreveu vários livros sobre a história das plantas e registrou a utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, que apresenta como princípio ativo a morfina. As grandes navegações trouxeram a descoberta de novos continentes, deixando para o mundo moderno um amplo arsenal terapêutico de origem vegetal até hoje imprescindível à medicina (PINTO *et al*, 2002).

As plantas medicinais são elementos que constituem parte da biodiversidade e são utilizadas desde os primórdios da civilização por vários povos e de diversas maneiras, sendo considerada uma das práticas mais utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças, servindo como importante fonte de compostos biologicamente ativos (ANDRADE *et al*, 2007; FIRMO, 2011). As referências históricas exibem uma íntima relação entre o homem e os recursos naturais, sobretudo, pelo vínculo entre o saber popular adquirido através de experiências exitosas ou frustrações (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; ARÇARI *et al*, 2009), e na disseminação do conhecimento transmitido de geração para geração (LIMA *et al*, 2013).

O uso de plantas ou partes específicas destas com potencial medicinal para prevenir, aliviar ou curar processos patológicos, tem-se destacado como prática terapêutica respeitada, e se fazendo parte integrante de sistemas médicos no mundo (ARÇARI *et al*, 2009; BETTEGA *et al*, 2011; BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Mesmo com o grande avanço da medicina e da síntese de novos fármacos, os recursos naturais ainda hoje contribuem para a manutenção da saúde e alívio das enfermidades em países em desenvolvimento (SOUZA; FELFILI, 2006; FIRMO, 2011). Apesar da aparente hegemonia dos fármacos industrializados, o uso das plantas ainda se apresenta como forma de tratamento primário na saúde, especialmente nas populações com baixa renda, pois espécies vegetais são de fácil aquisição e baixo custo. A Organização Mundial de Saúde, OMS, reconhece que boa parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional na atenção primária, considerando-se que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e cerca de 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (BRASIL, 2006).

O conhecimento popular sobre o uso e a eficácia de plantas com propriedades farmacológicas contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, por conta das propriedades medicinais que possuem, apesar de não terem muitas vezes seus constituintes químicos totalmente conhecidos (MACIEL; PINTO; VIEGA JUNIOR, 2002). Esta cultura medicinal, de certa forma, desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, entre elas a botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas contribuem para a aquisição de mais informações e conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL; PINTO; VIEGA JUNIOR, 2002).

A busca por novos produtos, de origem vegetal, tem se tornado alvo das pesquisas científicas, muitas vezes atrelada aos conceitos de desenvolvimento sustentável (DIOUF; STEVANOVIC; BOUTIN, 2009; FIRMO, 2011). Atualmente 30% dos medicamentos disponíveis no mercado são derivados diretamente ou indiretamente de produtos naturais principalmente de plantas. A maior desses vegetais, antes de serem transformados em medicamentos, foram utilizados por grupos tradicionais durante séculos em virtude de suas propriedades curativas (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

O interesse pelos medicamentos derivados de plantas, também conhecidos como fitoterápicos ou fitomedicamentos, tem aumentado significativamente em todo mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, e em alguns países da Europa e nos Estados Unidos (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008; ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

A escolha de espécies de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico aplicada ao estudo de plantas medicinais, juntamente com a etnofarmacologia, visa a exploração científica interdisciplinar de agentes biologicamente ativos, tradicionalmente usados ou observados por determinado agrupamento humano (MACIEL; PINTO; VIEGA JUNIOR, 2002). Neste tipo de seleção de espécies vegetais, há uma maior probabilidade de descoberta de novas substâncias bioativas.

O estudo do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus componentes, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos tem sido objeto de pesquisa, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais. Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de serem utilizados como agentes medicinais (HAVSTEEN, 1983). No Brasil, vários estudos foram executados e trouxeram informações importantes sobre o assunto, não se restringindo apenas a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (PEREIRA *et al*, 2004).

O uso de plantas medicinais contra processos infecciosos conduz a várias pesquisas na busca pela obtenção de novos compostos com propriedade antimicrobiana. Várias bactérias que causam prejuízos a saúde apresentam resistências aos antimicrobianos. Inúmeras medidas tecnológicas são propostas para solucionar esse problema sendo uma delas a busca por novos antimicrobianos a partir de espécies vegetais.

Pesquisas comprovam a capacidade antibacteriana de plantas medicinais. Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana em 17 espécies vegetais nativas do Brasil, os resultados dessa pesquisa revelaram que o extrato de *Pterodon emarginatus* (Sucupira) apresentou atividade antimicrobiana contra *Proteus mirabilis*, e os de *Ocotea odorífera* (Sassafrás) e *Schinus terebinthifolia* (aroeira) apresentaram ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Ainda neste estudo extratos da espécie *Hymenaea courbaril* (Jatobá), demonstrou eficácia atividade frente à cepa de *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* e o de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Copaíba) demonstrou atividade contra *Proteus mirabilis*, e *Shigella sonnei*. Enquanto o extrato de *Bixa orellana* L (Urucum) mostrou ação contra *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus*.

Um outro estudo realizado por Pinho *et al* (2011) em identificou a aroeira e barbatimão, bastante utilizada como cicatrizante e anti-inflamatório, com um potencial antimicrobiano em diferentes concentrações tanto para as cepas de bactérias gram-positivas quanto para gram-negativas corroborando com outros resultados na literatura, concluindo que o uso das folhas e cascas de aroeira e também o barbatimão podem constituir-se numa alternativa sustentável, viável e acessível contra infecções bacterianas.

Pesquisas comprovaram que extratos hidroalcoólicos da folha e do caule da goiabeira (*Psidium guajava* L.) têm atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas: *Salmonella, spp., Shigella spp, Escherichia coli, Proteus spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* (ABDELRAHIM, 2002). Em um estudo de bioprospecção realizado por Almeida *et al* (2012) foi verificada a atividade antimicrobiana de espécie nativas e exóticas da Caatinga e Mata Atlântica, dentre essas: *Amburana cearensis, Anacardium occidentale, Anadenanthera colubrina, Erythrina velutina, Maytenus rígida, Mimosa tenuiflora* e *Myracrodruon urundeuva*.

A atividade antimicrobiana do extrato da casca do caule de *Anacardium occidentale* diante de bactérias gram-positivas é descrito no trabalho de Melo et al. (2006), onde há destaque *Streptococcus mutans. Erythrina velutina* (Willd), tem sua atividade antimicrobiana pouco relatada, no entanto, em um trabalho desenvolvido por Virtuoso *et al* (2005), o extrato bruto do pó da casca dessa planta apresentou ação antibacteriana sobre duas bactérias gram-positivas, entre elas *Staphylococcus aureus*, porém essa atividade não foi demonstrada o que possa estar relacionado ao tipo de extrato que foi utilizado.

Estudos com uso de plantas medicinais pode destinar-se ao isolamento do produto bioativo do vegetal que apresente atividade farmacológica relevante, e utilizá-lo como fármaco. Uma vez estabelecido a síntese química desse composto, preconiza-se, em geral a interrupção do processo de extração, passando a obtê-lo sinteticamente ficando sua origem natural na história como exemplo nesse contexto a atropina (ZUNAZZI; MAYORGA, 2010). Algumas plantas medicinais são usadas como matéria prima para preparações farmacêuticas, podendo ser usadas inteiras ou como extrato padronizado. Ambas as abordagens no âmbito do uso das plantas medicinais podem resultar em interessantes resultados econômicos para terapia com produtos naturais (ZUNAZZI; MAYORGA, 2010; ARGENTA, 2011).

Embora muitas pesquisas busquem isolar os componentes ativos das plantas, o efeito de um fitoterápico normalmente se dá pela ação sinérgica entre os compostos (MACIEL; PINTO; VIEGA JUNIOR, 2002). Por isso, diferente de drogas convencionais, a medicina natural consiste em uma complexa preparação farmacêutica que pode ser administrada na forma de extrato (CAPASSO *et al*, 2003). Sendo uma das mais ricas do planeta, a biodiversidade brasileira contém muitas plantas com propriedades farmacológicas, entre elas: anti-inflamatórias e antimicrobianas (CAPASSO *et al*, 2003).

Pesquisas envolvendo combinação entre produtos vegetais e drogas antimicrobianas estão sendo realizadas. Estudos já comprovaram que a associação de plantas medicinais, seus compostos derivados e drogas antimicrobianas convencionais podem exercer ação indiferente, diminuir ou até mesmo aumentar o efeito da droga sobre os micro-organismos (NASCIMENTO, 2000).

### 3.2 BIOMA CAATINGA

A vegetação do semiárido possui uma grande variação fisionômica e florística relacionada em virtude da heterogeneidade do clima, solo e relevo. Dentre os principais tipos de vegetação dessa região pode-se citar cerrado, caatinga, florestas e brejos. Pode-se destacar a caatinga como o mais importante ecossistema dessa região (DE GUTIÉRREZ *et al*, 2010).

A caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro. É o ecossistema predominante no Nordeste. Abrange áreas de partes dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005). A caatinga é dominada por um dos poucos tipos de vegetação cuja distribuição é totalmente restrita ao Brasil (HUECK, 1966; FERRI, 1980), possuindo a vegetação mais heterogênea dentre os biomas brasileiros (RIZZINI, 1997). Esta região é marcada por forte sazonalidade de chuvas, concentrada num curto período do ano (3-5 meses) e bastante irregular. Nessa região predomina altas temperaturas anuais.

A caatinga possui a maior parte de seu território uma vegetação xerófila, de fisionomia e florística bastante diversificada. As espécies que a caracterizam são, em geral, lenhosas, herbáceas, sendo algumas com espinhos, além das *cactáceas* e *bromeliáceas* (RAMALHO *et al*, 2009). Pesquisas realizadas em alguns estados do

nordeste mostram que a vegetação da caatinga possui diversas utilidades, além de apresentarem uma grande importância biológica; essa formação vegetal abrange um considerável potencial econômico, onde diversas espécies que podem ser empregadas como forrageiras, alimentícias, madeiras e de para fins medicinais (RAMALHO *et al*, 2009; DE GUTIÉRREZ *et al*, 2010).

Existe uma ampla literatura regional sobre o uso das plantas na medicina popular (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002). Esses vegetais medicinais conseguem sobreviver em condições adversas, como as da caatinga, mesmo após longos períodos de estiagem, e produzem um número maior de metabólitos secundários (SILVA; PAULA JÚNIOR; TEIXEIRA, 2008). Em Pernambuco, foi realizado levantamento em quatro municípios, no qual enumerou mais de 400 plantas com propriedades medicinais (VICTOR, 1990). Em um estudo etnobotânico em uma área de caatinga em Pernambuco, Albuquerque e Andrade (2002) apontaram 36 famílias botânicas com espécies utilizadas com fins terapêuticos pela população.

### 3.3 *Cedrela odorata* L.

*Cedrela* é um gênero de plantas da família botânica *Meliaceae*. É composto por seis espécies de porte arbóreo, distribuídas desde o sul do México até o norte da Argentina (CITRON, 1990). *Cedrela odorata* L., é nativa da região tropical da América, existente no Brasil, sobretudo encontrada no bioma da caatinga. Popularmente conhecida como cedro, cedro rosa, cedro vermelho, cedro-mogno ou cedro-mogno cheiroso, ocorre em todo o Brasil em todos os biomas, com exceção do cerrado. Árvore que pode chegar a 25–35m de altura, com tronco de 90–150 cm de diâmetro, apresenta folhas do tipo paripinadas, flores de cor amarelo pálido e frutos tipo cápsula. A madeira do “cedro” é uma das melhores do país, apropriada para laminados, móveis, lambris, compensados e para tabuado em geral e é considerada nobre por possuir boa resistência mecânica e ser moderadamente resistente ao ataque de pragas (PASSOS *et al*, 2008).

*Cedrela odorata* L., é amplamente distribuída em diversas regiões do Brasil, inclusive no Nordeste. No Brasil, é mais conhecida como “cedro” (CAMPOS, 1991; LEITE; LLERAS, 1993; GÓMEZ-MALDONADO, 2014). Segundo Giordani *et al* (2015), a espécie vegetal em estudo é uma planta que vem ganhando destaque em

pesquisas científicas, em razão de ser empregada na medicina popular como recurso no tratamento de várias doenças. Dentro da medicina tradicional, uma infusão de casca é usada no tratamento de feridas, febre, bronquite, doenças gastrointestinais diarreia, anti-inflamatória, vômitos e hemorragia (RASHED, 2013). Na África, a decocção da casca é utilizada no tratamento da malária (KIPASSA, 2008).

A casca do “cedro” é utilizada por moradores de algumas regiões da Amazônia, no tratamento da diabetes, malária, doenças gastrointestinais e cicatrização de feridas (BIESKI, 2014 *apud* GIORDANI *et al*, 2015). Além de outros registros na literatura apontarem atividade antileishmanial, antimicrobiana, antitripanosomal e hipoglicêmica (GÓMEZ-MALDONADO, 2014; GIORDANI *et al*, 2015). Rengifo (2010), em sua pesquisa, observou atividade antimicrobiana de *Cedrela odorata* L contra bactérias gram-positivas. Gómez-Maldonado (2014) também concluiu em seu estudo, que extrato metanólico da casca de *Cedrela Odorata* L. é bactericida para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* e que, extratos hexânicos, também apresentaram bons resultados contra gênero *Staphylococcus*.

Figura 1 – *Cedrela odorata* L., comunidade do Carão, município de Altinho, Pernambuco



Fonte: O autor.

Mariscal-Lucero *et al* (2015) em seus estudos fitoquímicos com extratos das folhas de *C. odorata* L, verificaram a presença de fenóis como flavonoides, protocianidinas, taninos condensados, e terpenos como limonoide. Relatos na literatura citam que esses terpenos apresentam atividade inseticida, antituberculose e contra febre (VEIGA JÚNIOR *et al*, 2005). Um estudo encontrou concentrações variáveis mostrando diferenças marcantes entre indivíduos de acordo com a origem. Este mesmo trabalho sugere que a composição dos metabólitos secundários avaliados em *C. odorata* L, sobretudo fenóis estão diretamente envolvidos na resistência a insetos em muitas plantas (MARISCAL-LUCERO *et al*, 2015). Rocha, Barata e Pereira (2015), encontraram em extrato do pó do caule de *C. odorata* L. como substâncias majoritárias sesquiterpenos elegendo este vegetal como potencial candidato a ser utilizado como fitoterápico antioxidante.

### 3.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O metabolismo realizado pelos organismos vivos é definido como o conjunto de reações químicas para sintetizar moléculas orgânicas complexas a partir de moléculas simples (GARCÍA; CARRIL, 2009). Tais estruturas complexas têm como finalidades o fornecimento de energia ao organismo, a garantia da continuidade do estado organizado e a reação biológica aos estímulos do meio ambiente (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os metabólitos secundários são estruturas complexas, de baixo peso molecular e se encontram em baixas quantidades, variando sua concentração nos diversos grupos de plantas. Por um bom tempo, acreditava-se que esses metabólitos eram produtos da excreção vegetal, porém apresentam funções ecológicas específicas nas plantas levando ao interesse de muitos pesquisadores também, devido às diversas propriedades farmacológicas que possuem (DA CRUZ MONTEIR; BRANDELLI, 2017). Representam grande importância na indústria farmacêutica, alimentar e agrônômica (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Os principais grupos de metabólitos secundários estão representados pelos alcaloides, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, quinonas, taninos, saponinas e terpenos (CARDOSO *et al*, 2010).

Vários metabólitos secundários têm sido validados quanto ao efeito biológico e farmacológico e à segurança do uso desses compostos bioativos na elaboração e

desenvolvimento de novos produtos de interesse farmacêutico (BERG; LUBERT, 2008; FUMAGALI, 2008; PEREIRA; CARDOSO, 2012). Os compostos secundários de plantas são classificados de acordo com a sua rota biosintética (FUMAGALI, 2008), e dividem-se em três grandes classes: os compostos fenólicos, terpenos e os alcaloides.

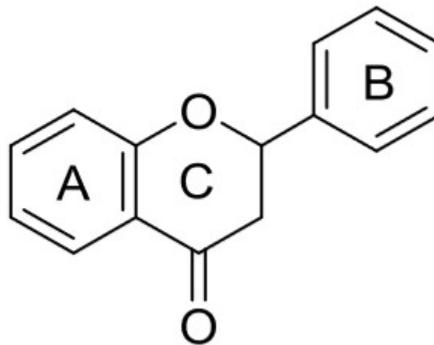
Os principais grupos de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, extraídos de plantas abrangem: lectinas e polipeptídios (TERRAS *et al*, 1993; ZHANG; LEWIS, 1997), terpenóides e óleos essenciais (TORSSEL, 1983); alcaloides (FESSENDEN; FESSENDEN, 1982); cumarinas (SOUZA, 2005). Substâncias fenólicas e polifenóis: fenóis simples, quinonas, ácidos fenólicos (MAIYO *et al*, 2010); flavonoides, flavonas, flavonóis (FESSENDEN; FESSENDEN, 1982) e taninos (SCALBERT, 1991). Saponinas também tem atividade antimicrobiana importante (VERDI, 2005).

Os compostos fenólicos apresentam uma estrutura química de anéis aromáticos e hidroxilas substituídas (SIMÕES, 2017). A função dos compostos fenólicos está relacionada com a produção das ligninas que são comuns a todas as plantas superiores, e funcionam como atrativos aos seres humanos devido ao odor, sabor e coloração agradáveis, mas também para outros animais, os quais são atraídos para polinização ou dispersão de sementes. Essa classe de compostos é importante para proteger as plantas contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; FUMAGALI, 2008). Há inclusive certas espécies vegetais que desenvolveram compostos fenólicos para inibir o crescimento de outras plantas competidoras (ação alelopática) produzindo fitoalexinas (FUMAGALI, 2008). Tais compostos ainda apresentam extensas atividades biológicas como antioxidantes, antiinflamatórios, vasodilatadores, anticancerígenos e podem prevenir algumas doenças (SIMÕES, 2017). Os compostos fenólicos constituem ainda o grupo de produtos do metabolismo vegetal que mais se destaca por sua atividade antioxidante, apresentam em sua estrutura um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (MALACRIDA; MOTTA, 2005; BATISTA, 2013). São divididos em duas classes, os flavonoides que apresentam estrutura básica definida e a do não-flavonoides que são heterogêneos, esse último grupo é composto pelos ácidos fenólicos (ácido benzoico, ácido hidróxinâmico e seus derivados), pelas ligninas, lignanas, estilbenos e taninos hidrolisáveis (PORTO, 2014).

Os flavonoides são derivados da via dos fenilpropanoides com algumas variações nas formas estruturais, porém a maioria apresenta um núcleo principal com 15 carbonos, formado por duas fenilas ligadas por uma cadeia de 3 carbonos. Nos compostos tricíclicos (figura 2), as unidades da estrutura fundamental são chamadas de núcleos A, B e C (SIMÕES, 2017).

Muitos flavonoides lipofílicos podem também levar à total ruptura de membranas microbianas (CHABOT *et al*, 1992). Delineações dos possíveis mecanismos de ação das flavonas e flavonoides levam a conflitos de ideias de vários pesquisadores, uma vez que muitos autores encontraram, também, efeitos opostos, isto é, quanto maior a hidroxilação, maior seria a atividade antimicrobiana (SATO *et al*, 1997; HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Figura 2 – Núcleo Fundamental dos Flavonoides



Fonte: SANTOS; RODRIGUES, 2017.

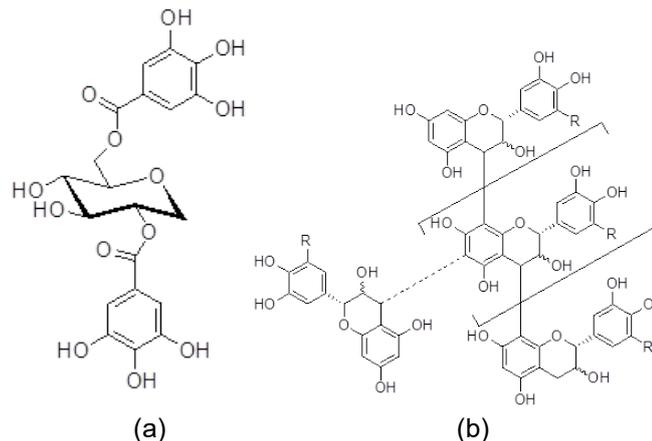
Os compostos tânicos são abundantes no reino vegetal e são descritos como um grupo de substâncias fenólicas poliméricas, capazes de precipitar proteína de uma solução, propriedade conhecida como adstringência e responsáveis pelo sabor adstringente de muitos frutos e outros produtos vegetais (BRUNETON, 1991; CASTEJON, 2011; BATISTA, 2013). São compostos fenólicos, e, portanto, são altamente reativos quimicamente e possui habilidade de formar pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares (MONTEIRO *et al*, 2005; CASTEJON, 2011).

Pesquisas relataram que os taninos são eficientes frente a determinados microrganismos, assim como possui atividade carcinogênica, contudo, apresentam elevada toxicidade hepática (MONTEIRO *et al*, 2005; BATISTA, 2013). Em um estudo de revisão das propriedades antimicrobianas dos taninos, Scalbert, (1991) reuniu 33 trabalhos que documentavam a atividade antimicrobiana contra fungos e

bactérias. Um exemplo, a elagitanino, tem como uma de suas ações moleculares, complexar-se com proteínas e polissacarídeos, através de pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e ligações covalentes (COWAN, 1999). Desta forma, leva à inativação de adesinas microbianas, inibição de enzimas bacterianas, ou à formação de complexos com os substratos dessas enzimas, modificando a estrutura e função, atuando, também, sobre as membranas celulares dos microrganismos, alterando seu metabolismo, sobretudo com a interrupção do sistema de transporte de proteínas celulares (HASLAM, 1996; STERN *et al*, 1996).

Os taninos também podem complexar com íons metálicos, reduzindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (SCALBERT, 1991).

Figura 3 – Estrutura do tanino hidrolisável (a) e condensado (b)

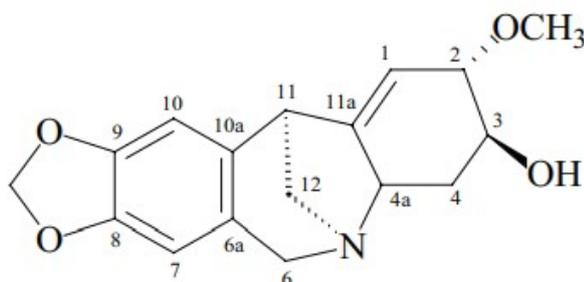


Fonte: Sociedade brasileira de Farmacognosia. Disponível em: [sbfgnosia.org.br](http://sbfgnosia.org.br). Acesso em: 18 jan. 2020.

O papel dos alcaloides nos vegetais ainda não é totalmente conhecido, no entanto, segundo um estudo realizado por Croteau, Kutchan e Lewis (2000), estão surgindo algumas respostas baseadas na função eco-química desses metabólitos, uma vez que são tóxicos para insetos e atuam como repelentes para herbívoros, esse grupo constitui uma das formas de defesa química das plantas. Além disso, aos alcaloides não são distribuídos de maneira uniforme no reino vegetal e são mais específicos para alguns gêneros e espécies de plantas (FUMAGALI, 2008). Esta distribuição restrita dos compostos secundários constitui a base da quimiotaxonomia e ecologia química (FUMAGALI, 2008). Castilhos *et al* (2007), revelaram um grande

potencial antimicrobiano do alcaloide montanina sobre isolados de *Micrococcus luteus* e *Candida albicans*.

Figura 4 – Estrutura Química do Alcaloide da Montanina

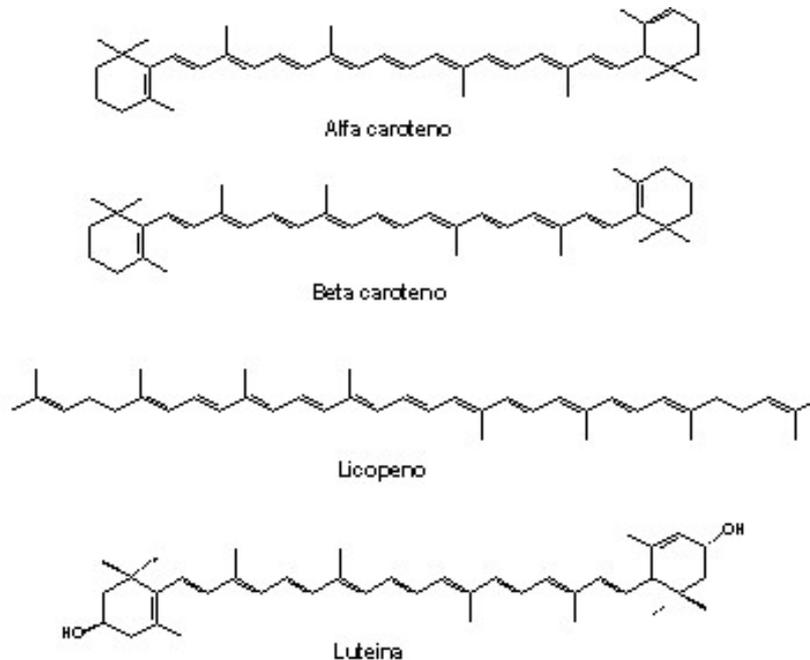


Fonte: CASTILHOS, 2007.

Óleos essenciais, cuja seu composto majoritário são terpenos, foram relatados apresentando atividades biológicas antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (ALCÂNTARA *et al*, 2010; TOSCAN; 2010; SARTO *et al*, 2014). Os terpenos são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma enorme variedade estrutural (JAKIEMIU, 2010). Esses metabólitos são formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos; quando submetidos a altas temperaturas, se decompõem em isoprenos, podendo referir-se, a todos os terpenos como isoprenoides (JAKIEMIU, 2010).

Alguns estudos mostram que monoterpenos apresentam efeitos que promovem lesão à membrana celular bacteriana (GIBBONS, 2004). Alguns mecanismos de ação antimicrobianos atribuídos aos terpenos correspondem ao bloqueio de síntese de membrana, perda de materiais celulares e íons, inibição da respiração celular e interrupção do crescimento bacteriano (SILVA *et al*, 2008; TOSCAN, 2010). Estudos de microscopia eletrônica de *Escherichia coli* revelaram que alguns óleos causam perda de material celular e coagulação de constituintes citoplasmáticos após exposição ao óleo de *Melaleuca alternifolia*, por exemplo (GUSTAFSON *et al*, 1998). Os limonóides são tetranotriterpenos e fazem parte dos maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida, cujas principais fontes são vegetais da família *Meliceae* e *Rutaceae*, tendo sido descritas atividades biológicas contra febre, tuberculose, reumatismo e ação inseticida (VEIGA JÚNIOR *et al*, 2005, FAIELA, 2007).

Figura 5 – Exemplo de terpenos e suas estruturas



Fonte: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: [ufrgs.br](http://ufrgs.br).  
Acesso em: 26 mar. 2020.

Outro grupo de metabólitos são as cumarinas, provenientes do metabolismo da fenilalanina, são isoladas principalmente de plantas verdes, mas podem ser produzidas também por microrganismos, como fungos e bactérias (HOULT; PAYÁ, 1996; MONTAGNER, 2007), possuem propriedades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária e citotóxica a esse grupo de metabólitos (MONTAGNER, 2007).

Agentes antimicrobianos isolados de plantas podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomo, ou até mesmo modificando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984).

### 3.5 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Resistência microbiana aos antibióticos é uma adaptação e pode ser definida como um conjunto de mecanismos de adaptação das bactérias contra os efeitos nocivos ou letais aos quais estejam sendo expostas (LIVERMORE, 1995). A descoberta de drogas eficazes contra micro-organismos havia eliminado a infecções, mas o uso indiscriminado destas substâncias levou ao surgimento de patógenos

multirresistentes. Este crescente número de casos resulta numa menor eficácia dos antibacterianos, antiparasitários, medicamentos antivirais e antifúngicos tornando o tratamento de pacientes difícil, caro ou mesmo impossível (WHO, 2003).

Por décadas, a resistência microbiana tem sido uma ameaça crescente para o tratamento eficaz de uma série de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos (SHELDON, 2005). O crescente número de cepas bacterianas cada vez mais resistentes à quimioterapia disponível, aumenta o tempo de internação, aumenta os custos com medicamentos caros de difícil acesso e aumenta a morbidade e mortalidade na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e nos serviços de saúde em geral (VARELA, 2005; OLIVEIRA, 2009). As infecções hospitalares estão cada vez mais frequente e relevantes devido a sua alta capacidade de promover morbidade e mortalidade, destacando-se dentre elas as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* (LIMA *et al*, 2015).

No Brasil entre 5 e 15% dos pacientes hospitalizados e 25 a 35% dos pacientes admitidos em UTI's adquirem infecção hospitalar, sendo ela a quarta causa de mortalidade (ABEGG; SILVA, 2011).

O desenvolvimento da resistência a antibióticos pode ser natural (intrínseca) ou adquirida e isso pode ser transmitido dentro da mesma ou de diferentes espécies de bactérias. A resistência natural é alcançada pela espontânea mutação do gene e a resistência adquirida é através da transferência de fragmentos de DNA como transposons ou plasmídeo de um micro-organismo para outro (TAVARES, 2000; SHELDON, 2005; SILVA, 2012). As bactérias podem adquirir resistência aos antibióticos por alteração do sítio de ação do antimicrobiano, resultando em redução da eficiência da ligação com medicamento, por destruição direta ou modificação do antibiótico por enzimas produzidas pelo micro-organismo ou efluxo de antibiótico do meio intracelular para o meio extracelular através das bombas de efluxo (SHELDON, 2005; SILVA, 2012).

Um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana conhecidos é a produção de betalactamases, que são enzimas que catalisam a hidrólise do anel betalactâmico, inativando o antimicrobiano, impedindo assim que a substância atue contra as enzimas responsáveis pela síntese de parede celular bacteriana (LIVERMORE, 1995; OLIVEIRA, 2010).

Apesar da imensa variedade de antibióticos desenvolvidos nos últimos tempos pela indústria farmacêutica, assim como pela indústria química, tem sido

observado o aumento de microrganismos resistentes aos antibióticos presentes no mercado, o que estimula a procura por novas fontes de substâncias dotadas de atividades antimicrobianas (RIBEIRO, 2008; PADILHA *et al*, 2010; TINTINO *et al*, 2013).

Na procura por novas substâncias contra micro-organismos patogênicos, as plantas medicinais têm sido fonte de muitos medicamentos aplicados na prática clínica e uma forte alternativa terapêutica. O uso de plantas e seus derivados, como agente antimicrobiano pode ser uma opção considerável, tendo em vista a baixa possibilidade de resistência uma vez que estas substâncias são misturas complexas, tornando mais difícil a adaptabilidade microbiana (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

Uma estratégia empregada para superar os mecanismos de resistência é o uso da combinação de drogas (SEHELDON, 2005; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

### 3.6 *Staphylococcus aureus*

A denominação *Staphylococcus aureus* tem origem do grego *staphylé*, que significa “cacho de uvas”, por apresentarem um padrão de crescimento similar a um cacho de uvas, mas também podem aparecer como células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas. São bactérias gram-positivas, imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase-positivos, a maioria com diâmetro compreendido entre 0,5 a 1µm e, crescem em meio contendo cloreto de sódio, em temperatura entre 18 a 40°C (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). É um patógeno humano reconhecido, sendo um agente etiológico de um amplo espectro de infecções de origem comunitária e nosocomial. Possui uma gama de determinantes de virulência, que engloba componentes da parede celular e uma grande variedade de exoproteínas que contribuem para sua capacidade de colonizar e causar doenças em mamíferos (BRASIL, 2006).

Trata-se de uma bactéria capaz de integrar-se à microbiota normal do hospedeiro, que estabelece um estado de portador crônico, numa frequência superior à que determinam as infecções (RICARDO, 2004). Aproximadamente 30% da população humana é colonizada com *S. aureus*, ao mesmo tempo que este micro-organismo é a principal causa de bacteremia e endocardite infecciosa (IE),

bem como infecções osteoarticulares, infecções cutâneas e moles, infecções pleuropulmonares, formação de abscessos metastáticos na pele, nos tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro (KALMEIJER, 2000; KONEMAN *et al*, 2006; COATES; MORAN; HORSBURGH, 2014; LIMA *et al*, 2015). *Staphylococcus aureus* também é capaz de produzir um mucopolissacarídeo extracelular amorfo (slime), que possibilita a agregação bacteriana, levando à formação de biofilmes que favorece a colonização dessa bactéria em diversas superfícies tanto no hospedeiro, como também no ambiente. Essas colonizações podem contribuir para transmissão desse micro-organismo (CHRISTENSEN; SIMPSON; BISNO, 1982).

*Staphylococcus aureus* é frequentemente citado como um dos principais patógenos causadores de infecção nosocomial, pois este micro-organismo tem capacidade de sobreviver e se multiplicar nos mais variados ambientes. Dispõe de um conjunto de mecanismos de virulência e de grande versatilidade de estratégia patogênica. Esta bactéria desenvolveu esses mecanismos como estratégias para esquivar-se do sistema imunológico humano, incluindo várias proteínas de superfície, enzimas e toxinas que lesam a membrana por ação citolítica. Esses mecanismos podem causar desde infecções mais simples como espinhas, furúnculos e impetigo até infecções mais graves como meningite, pericardite, bacteremia e síndrome do choque tóxico (SANTOS *et al*, 2007).

Entre os de fatores de virulência possíveis de *S. aureus* estão: as proteínas de superfície que promovem a colonização de tecidos; as invasinas (leucocidina, cinases, hialuronidase) que promovem expansão bacteriana no tecido; fatores de superfície (microcápsula, proteína A) que inibem a fagocitose; propriedades bioquímicas (carotenóides, catalase) que aumentam sua sobrevivência nos fagócitos; componentes imunológicos (proteína A, fatores coagulantes, como estafilocinase e coagulase); toxinas destruidoras de membrana (hemolisinas, leucotoxina, leucocidina) que lizem as membranas eucarióticas; exotoxinas (SE A-G, TSST-1: toxina promotora da síndrome do choque tóxico) que danificam tecidos ; e resistência intrínseca ou adquirida a antibióticos (GUTIÉRREZ, 2011).

O desenvolvimento da doença estafilocócica está intimamente relacionado à resistência do hospedeiro e à virulência do microrganismo. A pele intacta e as mucosas atuam como barreiras à infecção estafilocócica e seu defeito como resultado de trauma, cirurgia e queimadura aumenta o risco de infecção. *S. aureus* é uma causa comum de infecções cutâneas piogênicas e outras condições, como

osteomielite, artrite séptica, infecções profundas, abscessos, pneumonia, empiema, endocardite, pericardite, meningite e doenças mediadas por suas toxinas, incluindo intoxicação alimentar, escarlatina, síndrome de pele escaldada e síndrome do choque tóxico (SANTOS *et al*, 2007).

A maioria das infecções por *S. aureus* ocorre em pessoas com sistema imunológico comprometido, geralmente pacientes que estão em hospitais e centros médicos e geralmente são resistentes à terapia (SANTOS *et al*, 2007).

Na década de 1940, grande parte dos isolados de *Staphylococcus aureus* eram sensíveis à penicilina. Com a entrada da penicilina para uso clínico, *S. aureus* passou a desenvolver resistência aos antibióticos betalactâmicos através da produção da betalactamase (penicilinase), enzima capaz de hidrolizar o anel  $\beta$ -lactâmico da penicilina, tornando-a inativa (SANTOS *et al*, 2007). Estas cepas apresentam como principal mecanismo a modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), sintetizadas pelo gene *mecA* (AARESTRUP *et al*, 2001).

No fim dos anos 50, surgiram cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a praticamente todos os antibióticos de uso parenteral utilizados na época, abrangendo a eritromicina e a tetraciclina. A introdução das penicilinas resistentes a penicilinas, na década de 60, possibilitou um progresso na terapia anti estafilocócica. Com a introdução de penicilinas semi-sintéticas no arsenal terapêutico, como a meticilina empregada no tratamento de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*, surgiram cepas resistentes à meticilina denominadas MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), cujo perfil de resistência abrange outros antibióticos betalactâmicos. Os antibióticos betalactâmicos se ligam a Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBPs), as quais participam da síntese da parede celular, impedindo desta forma sua constituição, resultando em lise bacteriana. O MRSA desenvolveu uma nova PBP, a PBP2a, que é plenamente funcional, mas não apresenta afinidade por  $\beta$ lactâmicos. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, que é carregado em um elemento genético móvel denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec*) (ROSSI; ANDREAZZI, 2005; FERREIRA; ÁVILA, 2001).

Após o surgimento das Infecções causadas pelas cepas MRSA, a vancomicina, glicopeptídeo eficiente no tratamento dessas infecções, foi bastante utilizada na terapia contra *S. aureus* apesar de apresentar efeitos nefrotóxicos e ototóxicos (MARINHO, 2005; SANTOS *et al*, 2007), Em 1997, foi descrita, uma cepa

desse gram-positivo com resistência a vancomicina chamado VRSA (Vancomycin Resistent *Staphylococcus aureus*) (HIRAMATSU, 1997).

Cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de hemoculturas de pacientes de unidade de terapia intensiva em todo o mundo são cada vez mais resistentes a um maior número de agentes antimicrobianos (LOWY, 2003). Cerca de 90-95% das linhagens de *Staphylococcus aureus* em todo o mundo são resistentes a penicilina (KUMAR, 2009; COOMBS *et al*, 2013).

Em 1946, nos Estados Unidos da América, cerca de 5% de estafilococos isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à penicilina. Em 1949, esta resistência já podia ser notada em 29% das cepas isoladas em hospitais norte-americanos, já em 1950 atingia 50% e em 1959 quase que a totalidade das cepas se apresentava resistente chegando a cerca de 80% (TAVARES, 2000).

No Brasil entre 5 e 15% dos pacientes hospitalizados e 25 a 35% dos pacientes admitidos em UTI's adquirem infecção hospitalar, sendo ela a quarta causa de mortalidade (ABEGG; SILVA, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde, pacientes com infecções causadas por isolados de *S. aureus* MRSA possuem cerca de 64% de chances a mais de morrerem, quando comparamos com infecções por isolados sensíveis (OMS, 2020), uma vez que há uma limitação da escolha terapêutica.

### 3.7 SINERGISMO E MÉTODO *CHECKERBOARD*

Inúmeros antibióticos têm sido efetivos no tratamento de doenças causadas por micro-organismos, porém o aumento da resistência a essas drogas resultou no surgimento de novas e o retorno de antigas doenças infecciosas. Uma estratégia atualmente utilizada para vencer esses mecanismos de resistência é o uso de associações de fármacos, como exemplo beta-lactâmicos, juntamente com inibidores de betalactamase (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008). Essas combinações vêm sendo utilizadas também entre produtos naturais, antibióticos e substâncias isoladas com o objetivo de alterar a ação dos antibióticos, seja revertendo a resistência ou aumentando a atividade destas drogas (COUTINHO *et al*, 2008). Várias pesquisas revelam que plantas ou seus derivados associados a antimicrobianos convencionais já apresentam resultado eficaz no combate a resistência em fungos e bactérias (NASCIMENTO, 2000; TINTINO *et al*, 2013).

Agentes Modificadores de Resistência são substâncias que potencializam a atividade de um determinado antibiótico sobre cepas resistentes a esse agente antimicrobiano. Estas substâncias modulam ou mesmo reverterem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes isolados) que modificam a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo, por exemplo (GIBBONS, 2004). A redução da quantidade de antibiótico dentro da célula bacteriana pode ser decorrente da redução da permeabilidade do fármaco a membrana bacteriana ou pelo efluxo do acumulado da droga dentro da célula. Estudos mostram óleos essenciais como timol e carvacrol como permeabilizadores de membrana (GARCÍA-GARCÍA; PALOU-GARCÍA, 2008).

Propriedades antimicrobianas de compostos de origem vegetal e seus derivados possibilitam sinergismos com drogas antimicrobianas convencionais. Pesquisas com essas associações têm se tornado mais frequentes (BETONI *et al*, 2006). Interações sinérgicas de associações de antibióticos com extratos de plantas medicinais sobre linhagens microbianas resistentes pode ser uma nova estratégia para tratamento de infecções, possibilitando o uso de drogas antimicrobianas quando, de forma isolada, não apresentaria eficácia sobre determinadas linhagens bacterianas (KUMAR *et al*, 2009). Estudos de combinação com produtos naturais de plantas e drogas sintéticas são limitados a poucos relatos, porém os resultados apresentados são, muitas vezes, positivos.

Alguns parâmetros e conceitos são determinados para melhor avaliar esta modulação dos agentes antimicrobianos: o efeito sinérgico é uma interação positiva, no qual o efeito combinado dos antimicrobianos é significativamente maior que seus efeitos independentes quando utilizados de forma separada; já o efeito antagônico é oposto ao sinérgico, pois trata-se de uma interação negativa, no qual o efeito combinado dos fármacos é significativamente menor que os seus efeitos independentes quando testados separadamente e, quando não há interação significativa entre os antimicrobianos testados, este efeito deve ser descrito como indiferente (LORIAN, 2005).

A interpretação dos parâmetros de combinação entre os antimicrobianos é feita através de um cálculo, o Índice de Concentração Inibitória Fracionaria (ICIF), mas apesar da fórmula ser um consenso, os parâmetros para análise desta interação não são padronizados na literatura, tanto em relação aos efeitos que

podem ser sinérgico, parcialmente sinérgico, indiferente ou antagônico, quanto aos valores de referência para interpretar o ICIF (WHITE *et al*, 1996; OSBURNE *et al*, 2006; AN *et al*, 2011; SARAIVA *et al*, 2013; OLIVEIRA *et al*, 2016). O Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) é igual a soma da Concentração Inibitória Fracionada da substância A (CIFA), mais a Concentração Inibitória Fracionada da substância B (CIFB). A Concentração Inibitória Fracionada de uma substância é calculada pela razão da CIM da substância em combinação com outra, pela CIM da substância sozinha, sem a combinação. Abaixo se exemplifica a fórmula e parâmetros de comparação da interação dos antimicrobianos:

$$\text{ICIF} = \text{CIFA} + \text{CIFB}$$

CIFA= CIM na combinação/ CIM sozinho

CIFB= CIMB na combinação/ CIMB sozinho

O ICIF menor ou igual a 0,5 corresponde a um efeito sinérgico; ICIF entre 0,5 e 0,75 corresponde a um efeito parcialmente sinérgico; enquanto que um ICIF entre 0,75 - 4,0 correspondem à indiferença e um ICIF maior que 4,0 correspondem a antagonismo (HALL; MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983; FERNÁNDEZ-CUENCA *et al*, 2003; MOULAY *et al*, 2014).

O *Checkerboard* é a técnica mais utilizada para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro* (RAND *et al*, 1993; MARQUES *et al*, 1997; LORIAN, 2005; PETERSEN *et al*, 2006; TONG *et al*, 2006). Isso se deve principalmente ao fato de possuir uma fácil interpretação, cujo cálculo e resultados são simples (LORIAN, 2005).

O termo *Checkerboard* se refere ao padrão de diluição dos antimicrobianos distribuídos na placa de microtitulação, assemelhando-se a um tabuleiro de xadrez. Na vertical, cada poço contém uma diferente concentração diluída do antibiótico de forma decrescente (poços identificados da A – H). Na horizontal, um segundo antimicrobiano se adiciona a cada poço da microplaca, da esquerda para a direita de forma crescente (LORIAN, 2005). Cada poço possui concentrações diferentes de cada um dos dois antimicrobianos testados em um mesmo volume final (DOUGHERTY; YOTTER; MATTHEWS, 1977; LORIAN, 2005). Através deste método é possível testar várias combinações em diferentes concentrações das drogas para uma mesma amostra, além de utilizar pequenas quantidades de cada

droga testada. Dentre as limitações do método, pode-se citar apenas a determinação da atividade inibitória e não a atividade bactericida da combinação (LORIAN, 2005).

## 4 METODOLOGIA

A metodologia do presente trabalho apresenta a descrição do critério de escolha das plantas como também os ensaios fitoquímicos e microbiológicos utilizados para a realização do trabalho.

### 4.1 COLETAS DO MATERIAL VEGETAL

A coleta foi realizada em junho de 2018, em uma área de Caatinga do Estado de Pernambuco, na comunidade do Carão (08°35'13,5"S e 36°05'34,6"W), localizada na zona rural de Altinho, município do agreste central pernambucano, distante 163,1 km do Recife, com uma área de 454,486 km<sup>2</sup> e clima semi-árido quente.

Foram realizadas coletas mínimas de três exemplares que foram misturadas com o intuito de minimizar efeitos idiossincráticos (ARAÚJO *et al*, 2008).

### 4.2 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

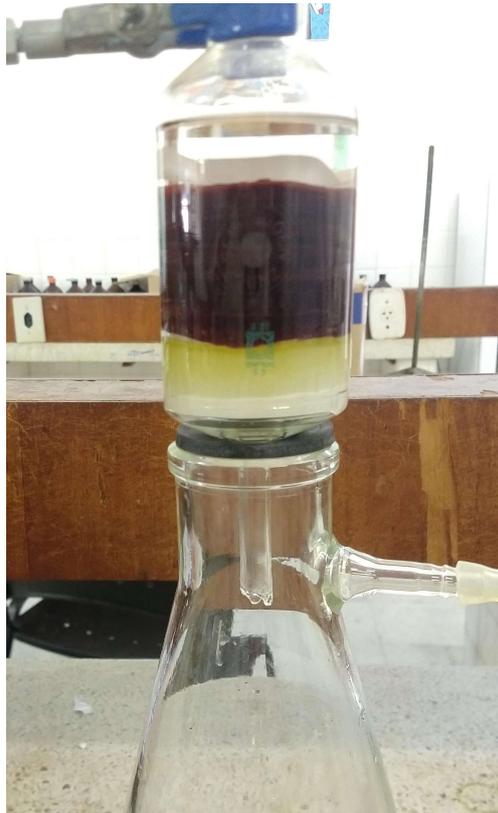
As amostras coletadas foram reduzidas a partes menores com a finalidade de aumentar a superfície de contato e evitar a contaminação do material, e foram submetidas a exposição a temperatura ambiente por 3 semanas para desidratação. Após secagem, as amostras foram pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye (Adamo 340) e padronizadas em tamises, obtendo granulometria de 20 Mesh (1,2 mm), e em seguida foram acondicionadas em sacos de papel até a preparação dos extratos.

Após este processo, as amostras foram submetidas à extração por maceração de 48 horas cada na proporção de 1:10 (m/v) com etanol 80%. O líquido extrator foi renovado por duas vezes totalizando o número de três macerações. Em seguida, os extratos foram filtrados e submetidos à evaporação sob pressão reduzida, à temperatura de 40±5° C, até total secura. A espécie foi identificada e depositada no herbário UFP - Geraldo Mariz sob o número UFP54186.

#### 4.3 FRACIONAMENTOS (COLUNA FILTRANTE)

O extrato bruto foi incorporado a Silicagel 60 (230 – 400 mesh - Merck) e submetido a uma coluna filtrante. A eluição foi realizada com solventes de polaridades crescentes, iniciando com hexano seguido de tolueno, acetato de etila e metanol.

Figura 6 – Montagem da Coluna Filtrante com topo-sólido com o extrato incorporado à Silicagel



Fonte: O autor.

#### 4.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR HPTLC (*HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY*)

Para bioprospecção das amostras da pesquisa, foram utilizados os módulos do equipamento CAMAG. A fase estacionária foi placa de alumínio com gel de sílica pré-revestida (10 cm x 10 cm) da E. Merck (Darmstadt, Alemanha). As amostras das frações foram aplicadas na placa com bandas de 9,5 mm de largura, com distância de 8mm do fundo e 20 mm do lado, tendo espaço entre as aplicações de 12 mm, com taxa de aplicação constante de 150 mL / sob um fluxo de gás N<sub>2</sub>. Após a

aplicação, as amostras foram submetidas ao sistema de eluição correspondente ao grupo de metabólico em pesquisa e após eluição, realizou-se revelação com o revelador específico para o grupo em pesquisa (tabela 1) e posteriormente executou-se a leitura utilizando o foto-documentador para fotografar as placas em alta resolução e aplicar as revelações físicas com luz ultravioleta com comprimento de onda 254 e 644.

Tabela 1 – Sistemas de eluição, padrões e reveladores utilizados para evidenciar os principais grupos de metabólitos secundários segundo Wagner e Bladt (1996)

<b>GRUPO</b>	<b>SISTEMA ELUENTE</b>	<b>PADRÃO</b>	<b>REVELADOR</b>
<b>Alcaloides gerais</b>	Tolueno:acetato de etila (70:20:10)	Quinina Yoimbina	Dragendorff
<b>Compostos fenólicos</b>	Acetato de etila; ácido fórmico; água (90:5:5)	Quercetina Ácido gálico	NEU
<b>Cumarinas</b>	Tolueno: éter (1:1 saturado com ácido acético 10%)	Cumarina	KOH etanólico 10%
<b>Derivados antracênicos</b>	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	Aloína	KOH etanólico 10%
<b>Mono, sesqui e diterpenos</b>	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Timol Carvacrol	Vanilina sulfúrica
<b>Naftoquinonas</b>	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Lapachol	KOH etanólico 10%
<b>Triterpenos e Esteroides</b>	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	Sigmasterol	Lieberman-Burchard

Fonte: O autor.

#### 4.5 DOSEAMENTO DE CONTEÚDO FENÓLICO, TANINOS E FLAVONOIDES

##### 4.5.1 Determinação do conteúdo fenólico total

Para realização do ensaio de determinação do conteúdo fenólico foram realizadas três pesagens para cada extrato (bruto e suas frações) e para cada pesagem o ensaio foi realizado em triplicata.

Para determinação do conteúdo fenólico total, foi utilizada a metodologia descrita por Amorim *et al* (2008). O extrato seco foi diluído em metanol P.A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata.

Foi adicionada uma alíquota de 0,2 mL (200 µL) do extrato diluído a um tubo de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu (solução aquosa 10%), 1 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%) e completado o volume com água destilada para 10 mL. Após a preparação desta solução, agitou-se adequadamente, permanecendo em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância da mistura foi aferida a 760 nm contra um branco preparado com água destilada.

Como padrão foi utilizado o ácido tânico, preparando-se uma curva de calibração em tubos de ensaio com alíquotas de 0.050, 0.100, 0.150, 0.200, 0.250, 0.500, 0.750 e 1 mL da solução padrão de ácido tânico a 1 mg/mL, em água destilada. Posteriormente, foram adicionados 500µL da solução de Folin-Ciocalteu e 1 mL da solução de carbonato de sódio em cada tubo de ensaio. O volume final foi completado para 10 mL com água destilada. As concentrações finais obtidas do ácido tânico foram 0.5; 1.0; 1.5; 2.0; 2.5; 5.0; 7.5; 10.0 µg/mL, respectivamente. A cor azul produzida pela reação possui uma absorção máxima a 760nm e é proporcional à taxa de compostos fenólicos. O teor de fenóis totais foi expresso como miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg TAE/g) (AMORIM *et. al.*, 2008).

#### **4.5.2 Determinação do conteúdo de taninos**

Para realização do ensaio de determinação do conteúdo de taninos foram realizadas três pesagens para cada extrato (bruto e suas frações) e para cada pesagem o ensaio foi realizado em triplicata.

A determinação do teor de taninos foi realizada segundo protocolo desenvolvido por Amorim *et. al* (2008) adaptado para as espécies. O extrato seco foi diluído em metanol P.A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata.

Posteriormente, foram pesados 1 g de caseína e transferidos para erlenmeyer 50mL, acrescentando 6mL da amostra diluída e 12mL de água destilada, em triplicata. Após três horas de reação sob agitação, filtrou-se a solução em balão

volumétrico e completado o volume para 25 mL com água destilada. Foi retirada uma alíquota de 1mL e quantificados os fenóis residuais pelo método Folin-Ciocalteu. O teor de taninos foi calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais. Como padrão foi utilizado o ácido tânico, a curva de calibração foi preparada conforme descrito no item 4.4.

#### **4.5.3 Determinação do conteúdo de flavonoides**

Para realização do ensaio de determinação do conteúdo de flavonoides foram realizadas três pesagens para cada extrato (bruto e suas frações) e para cada pesagem o ensaio foi realizado em triplicata.

A quantificação dos teores de flavonóides foi baseada na metodologia descrita por Peixoto Sobrinho *et al* (2008). O método é fundamentado na reação do íon alumínio ( $Al^{3+}$ ) com moléculas de flavonóides da amostra, estabelecendo o complexo estável flavonóide- $Al^{3+}$ , de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoides. Esta reação promove um deslocamento batocrômico e uma intensificação de suas absorções, podendo ser quantificado sem sofrer influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra.

O extrato seco foi diluído em metanol P.A numa concentração de 1mg/mL em balão volumétrico de 50 mL, em triplicata. Para quantificar os flavonoides, uma alíquota de 0,2 mL (200  $\mu$ L) do extrato diluído foi transferida para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 0,120 mL (120  $\mu$ L) de ácido acético glacial, 2 mL da solução de piridina (20%, v/v em metanol P.A), 0,5 mL (500  $\mu$ L) do reagente cloreto de alumínio (5%, p/v em água destilada) e completado o volume para 10 mL com água destilada em cada tubo. Após a preparação desta solução, agitou-se adequadamente, permanecendo em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. Após esse período, a absorbância da mistura foi medida a 420nm contra um branco preparado com água destilada.

Preparou-se a curva de calibração com alíquotas de 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 mL da solução de rutina (0,1 mg/mL em metanol), em tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 120  $\mu$ L da solução de ácido acético, 2 mL da solução de piridina, 0,5 mL do reagente cloreto de alumínio. O volume final foi completado para 10 mL com água destilada. As concentrações finais de rutina foram de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0  $\mu$ g/mL, respectivamente. O teor de

flavonoides totais foi expresso como miligramas equivalente de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

#### 4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade sequestradora de radicais livres foi determinada medindo a capacidade de um composto para remover os radicais livres do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), conforme descrito por Araújo *et al* (2012).

O ensaio foi realizado em triplicata. O extrato seco foi diluído em metanol P.A numa concentração de 0,5 mg/mL em triplicata. Alíquotas de 100 a 2500  $\mu$ L de cada extrato ou padrão foram transferidos para tubos de ensaio, aferindo-se o volume final para 5 mL com metanol P.A. As concentrações finais dos extratos ou padrão foram de 10-100 $\mu$ g/mL. A 0,5 mL das concentrações dos extratos solubilizados em metanol adicionou-se 3 mL da solução de DPPH a 40  $\mu$ g/mL (ou 3 mL de metanol para fazer o branco) em cada tubo, em duplicata. As soluções foram agitadas cuidadosamente e deixadas em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz, a temperatura ambiente. A absorbância da mistura foi medida a 517nm, contra um branco preparado com metanol. A solução do controle negativo consiste na utilização da solução de DPPH a 40  $\mu$ g/mL.

A porcentagem de atividade antioxidante das diferentes concentrações pode ser calculada, o resultado corresponderá à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. No entanto, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), também chamada de concentração inibitória ( $CI_{50}$ ). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua  $CE_{50}$  e maior é a sua atividade antioxidante (SOUZA *et al*, 2007). Para obter o valor da  $CE_{50}$ , a concentração do padrão ou das amostras positivas deve ser usada como a variável independente ( $\mu$ g / mL) e a porcentagem dos restantes DPPH (% DPPH<sub>REM</sub>) são usadas como variável dependente para produzir uma curva exponencial de primeira ordem e uma equação para calcular a concentração eficaz (SOUZA *et al*, 2007):

$$\text{DPPH}_{\text{REM}} (\%) = ([\text{DPPH}]_{T=t} / [\text{DPPH}]_{T=0}) \times 100$$

Onde, baseado nos estudos de Souza *et al* (2007):

1.  $[\text{DPPH}]_{T=t}$ : é a concentração de DPPH depois da reação com o extrato;
2.  $[\text{DPPH}]_{T=0}$ : é a concentração inicial de DPPH, isto é, 40  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (100  $\text{mmol} / \text{mL}$ )

#### 4.7 TESTES DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E *CHECKERBOARD*

##### 4.7.1 Agentes Antimicrobianos

Para realização dos testes quantitativos para determinação da CIM frente aos antibióticos, extrato bruto e frações da casca e folha da *Cedrela odorata* L, empregou-se o método de microdiluição em caldo, baseado na técnica preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) no ano de 2016, no documento M7-A6. em placa esterilizada de microtitulação com 96 poços, de fundo chato com tampa.

Foram utilizadas sete cepas de *Staphylococcus aureus* de origem clínica, multirresistentes pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Análises Microbiológicas (LAM), do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco (tabela 2).

Tabela 2 – Cepas da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas da UFPE utilizadas na pesquisa e suas respectivas fontes

<b>Isolado de <i>Staphylococcus aureus</i>/Coleção LAM</b>	<b>Local do isolamento</b>
LAMUFPE1052.5	Osso
LAMUFPE1051.5	Osso
LAMUFPE219.6	Ferida operatória
LAMUFPE223.6	Secreção de Fístula
LAMUFPE221.6	Músculo
LAMUFPE406.6	Sangue
ATCC 29213	Controle

Fonte: O autor.

Os extratos brutos e as respectivas frações da casca e folha de *Cedrela odorata* L foram pesados analiticamente e solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) previamente esterilizado. Foi preparado para cada substância teste, extratos e antimicrobianos, uma solução mãe 100 vezes maior que a concentração inicial para o teste para posterior diluição até a concentração inicial do teste.

Para cada cepa, a determinação da CIM foi realizada em triplicata. As concentrações iniciais dos extratos de *Cedrela odorata* L e antimicrobianos para o teste de determinação da CIM foram respectivamente 2000 µg/mL e 400 µg/mL.

Foram utilizados na pesquisa quatro antimicrobianos de três classes diferentes como descrito na tabela 3 e oito extratos, sendo quatro da casca e quatro da folha como apresentado na tabela 4.

Tabela 3 – Antimicrobianos usados na pesquisa e suas classes terapêuticas

Antimicrobianos	Classe
Benzilpenicilina	Penicilina
Eritromicina	Macrolídeo
Ampicilina	Betalactâmico
Levofloxacina	Quinolona

Fonte: O autor.

Tabela 4 – Extratos brutos e frações da casca e folha de *Cedrela odorata* L.

Extratos	Fração
<b>Casca</b> <i>Cedrela odorata</i> L.	Fração Tolueno
	Fração Acetato de Etila
	Fração Metanol
	Extrato Bruto
<b>Folha</b> <i>Cedrela odorata</i> L.	Fração Tolueno
	Fração Acetato de Etila
	Fração Metanol
	Extrato Bruto

Fonte: O autor.

#### 4.7.2 Preparação da Suspensão Bacteriana

A preparação do inóculo foi padronizada de acordo com as recomendações do documento CLSI do ano de 2016, no documento M7-A6. As cepas de *Staphylococcus aureus* foram cultivadas em Agar Mueller Hinton por 18h e a 37°C. Após o período de incubação, as culturas foram padronizadas em 10<sup>8</sup> UFC/mL, aferidas em espectrofotômetro no comprimento de onda 530nm. Em seguida realizou-se nova diluição em salina a 10<sup>6</sup> UFC/mL.

#### 4.7.3 Teste para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A partir da solução mãe de cada extrato e antibióticos foi realizada uma nova diluição em caldo Mueller Hinton obtendo uma concentração 8000 µg/mL para os extratos e 1600 µg/mL para os antibióticos.

O teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima foi realizado e triplicata. Inicialmente foi adicionado a cada poço da placa de 100 µL de caldo Mueller Hinton. Posteriormente na coluna 1 da placa, adicionou-se 100 µL da substância teste da diluição (a uma concentração 8000 µg/mL para os extratos e 1600 µg/mL para os antibióticos), diluindo desta forma o extrato a 4000 µg/mL e 800 µg/mL para os antibióticos.

A partir da primeira coluna realizou-se diluição seriada 1:2 seguindo da coluna 1 até a coluna 10, sendo a coluna 11 o controle negativo, contendo apenas o caldo Mueller Hinton e a coluna 12 o controle positivo com a suspensão bacteriana e caldo Muller Hinton.

Após a etapa de diluição seriada da substância teste, adicionou-se 100 µL da suspensão de *Staphylococcus aureus* 10<sup>6</sup> UFC/mL. Após essa última etapa a concentração inicial, dos extratos no primeiro poço de cada linha da placa da passa a ser 2000 µL/mL e a dos antibióticos passa a ser 400 µL seguindo a sequência de diluição nos poços das colunas subsequentes.

Após concluído a diluição e inoculação, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 18h e após esse período foi adicionado 20 µL de resazurina 0,01% e reincubadas por 4 horas para verificação da viabilidade celular da bactéria.

A partir do resultado do teste, determinou-se a concentração Inibitória Mínima de cada antibiótico (benzilpenicilina, eritromicina, levofloxacina, ampicilina) e de cada extrato. O extrato e Cepa de *Staphylococcus aureus* que obtiveram menor CIM, ou seja, que tiveram o melhor resultado foi selecionado para análise *Checkerboard*.

#### 4.7.4 Checkerboard

Para realizar o método de modulação por *checkerboard* (modelo 7x7) das frações e sub-frações com os antibióticos (eritromicina, levofloxacina, benzilpenicilina, ampicilina) frente as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas e

resistentes foi utilizado o método de microdiluição em caldo para determinar CIM das frações, subfrações e os antibióticos em teste, seguindo o modelo descrito no item 4.9.3. Foi utilizada a cepa de *S. aureus* que apresentou melhor CIM frente às frações de extratos de *Cedrela odorata* L. e LAMUFPE406.

O ensaio de *Checkerboard* foi realizado em triplicata. Foi feita uma suspensão microbiana para alcançar a turbidez padrão de escala 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) e esta foi diluída até ficar em  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, todas foram aferidas em espectrofotômetro em 530nm. As substâncias testes foram preparadas suas soluções mães de acordo com suas respectivas CIM's, devendo ficar a concentração da solução mãe 4 vezes maior que a sua CIM. Em seguida 100µL de caldo Mueller-Hinton foram distribuídos ao longo de uma placa estéril de microtitulação de fundo chato e com tampa, após isto, 100µL da solução mãe da amostra A (Antibiótico em teste) foi também distribuída de forma horizontal na fileira A da placa e sendo realizada diluição seriada no sentido das fileiras A-G. A amostra B (fração ou suas subfrações) foi diluída em outra placa de microtitulação e depois transportada para a primeira placa no sentido das fileiras 8-2.

Na placa de microtitulação analisada segue o modelo 7x7, ou seja, além das combinações, a placa possui controle negativo (apenas caldo Mueller-Hinton), controle positivo (meio + suspensão), coluna com apenas a amostra A (antimicrobiano) diluída de cima pra baixo e fileira com apenas a amostra B (fração ou subfrações) diluídas da direita pra esquerda. As placas de microtitulação com as diferentes combinações das drogas, nas diferentes concentrações, foram incubadas a 36°C por 18 horas. Após o período de incubação foi aplicado um corante revelador 0,01% (resazurina), como revelador de viabilidade celular. (WHITE *et al*, 1996; OSBURNE *et al*, 2006; AN *et al*, 2011; SARAIVA *et al*, 2013; OLIVEIRA *et al*, 2016).

A interpretação do efeito sinérgico da combinação de antimicrobianos foi calculada pela somatória dos índices de concentração inibitória fracional A e B ( $\Sigma$ CIF), onde CIF (A ou B) = CIM do antibiótico A (ou B) em combinação / CIM do antibiótico A (ou B) sozinho, O ICIF menor ou igual a 0,5 corresponde a um efeito sinérgico; ICIF entre 0,5 e 0,75 corresponde a um efeito parcialmente sinérgico; enquanto que um ICIF entre 0,75 - 4,0 correspondem à indiferença e um ICIF maior que 4,0 correspondemos a antagonismo (HALL; MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983; FERNÁNDEZ-CUENCA *et al*, 2003; MOULAY *et al*, 2014).

#### 4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

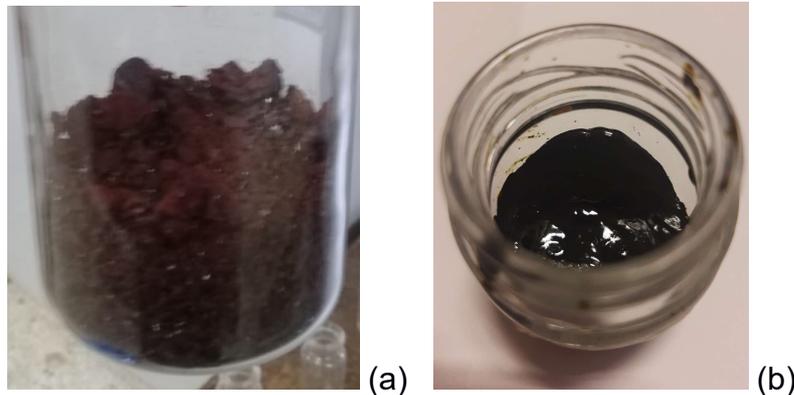
As análises estatísticas da bioprospecção fotoquímica e  $CE_{50}$  foram usadas teste de Shapiro-Wilk para confirmação da normalidade dos dados obtidos na quantificação dos teores. As concentrações eficientes ( $CE_{50}$ ) foram calculadas a partir de regressão obtida com as concentrações das amostras e das atividades antioxidantes. Os dados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão e foram analisados utilizando o teste de ANOVA seguido do teste de Tukey. O programa BioEstat 5.3 foi utilizado para realização das análises estatísticas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Após o processo de extração de casca e folha das amostras de *Cedrela odorata* L. os extratos foram submetidos a evaporação sob pressão reduzida. O extrato bruto de *Cedrela odorata* L., apresentou aspecto cristalino, seco e com pigmentação marrom escuro, enquanto o extrato bruto da folha apresentou aspecto mais úmido, viscoso e de cor escura, conforme mostra a figura 7.

Figura 7 – Aspecto macroscópico do extrato bruto seco das cascas (a) e folhas (b) de *Cedrela odorata* L.



Fonte: O autor.

O extrato bruto da casca apresentou rendimento de 16,12%, enquanto, o extrato bruto da folha apresentou rendimento de 11,92%. Os rendimentos obtidos após o fracionamento dos extratos brutos de casca e folha da espécie em estudo estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 – Pesos e rendimentos dos extratos bruto das frações das cascas e folhas de *Cedrela odorata* L.

<b>Extrato FOLHA</b>	<b>PESO (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>	<b>Extrato CASCA</b>	<b>PESO (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Bruto</b>	23,85g	11,92%	<b>Bruto</b>	32,25g	16,12%
<b>Hexano</b>	-	-	<b>Hexano</b>	-	-
<b>Tolueno</b>	0,056g	3,70%	<b>Tolueno</b>	0,96g	6,40%
<b>Acetato de Etila</b>	1,01g	6,66%	<b>Acetato de Etila</b>	0,35g	2,33%
<b>Metanol</b>	0,48g	3,20%	<b>Metanol</b>	10,98g	73,20%

(-): quantidade insuficiente para aferição por muito baixo rendimento.

Fonte: O autor.

## 5.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA POR HPTLC (*HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY*)

Os resultados foram obtidos a partir de um sistema eluente e revelador específico estabelecidos por Wagner e Bladt (1995) para cada grupo de metabólito secundário onde foi possível observar diferentes compostos fenólicos e terpenos contidos nos extratos brutos e das frações dos extratos de casca e folha de *Cedrela odorata* L., com ausência dos alcaloides em todas as frações analisadas. Os resultados obtidos nos ensaios de HPTLC estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Caracterização fitoquímica do extrato bruto e frações de casca e folha de *Cedrela odorata* L. por HPTLC utilizando sistema eluente e reveladores específicos

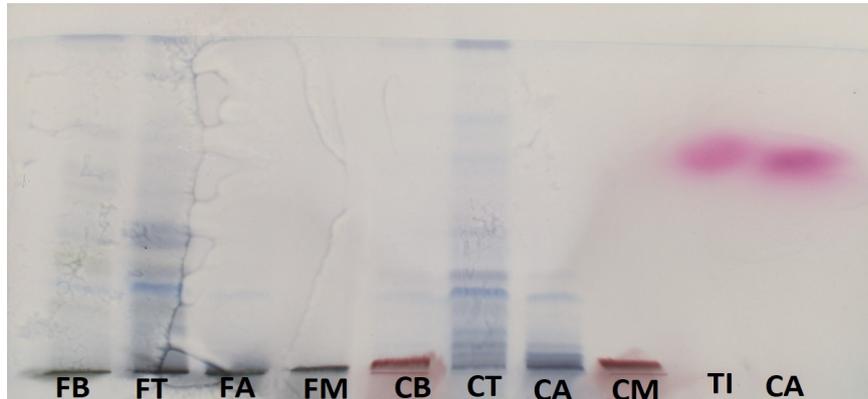
FRAÇÃO / GRUPO METABÓLICO		Compostos Fenólicos	Flavonóides	Cumarinas	Derivados Antracênicos	Mono, Sesqui e Diterpenos	Naftoquinonas	Triterpenos e Esteróides	Alcaloides
Extrato de Folha	Bruto	+	+	+	+	+	-	+	-
	Metanol	+	+	+	+	+	-	+	-
	Acetato de Etila	+	+	+	+	+	+	+	-
	Tolueno	+	+	+	+	+	-	+	-
Extrato de casca	Bruto	+	+	+	+	+	-	+	-
	Metanol	+	+	+	+	+	-	+	-
	Acetato de Etila	+	+	+	+	+	+	+	-
	Tolueno	+	+	+	+	+	-	+	-

(-) = ausência; (+) = presença.

Fonte: O autor.

Na figura 8 é apresentada uma placa característica para mono, sesqui e diterpenos e a figura 9 revela presença de triterpenos, sobretudo nas frações tolueno e acetato de etila onde esses metabólitos têm maior afinidade. Os resultados do presente estudo corroboram com os resultados de Mariscal-Lucero *et al* (2015) em que analisaram os extratos das folhas de 66 indivíduos de *C. odorata*, proveniente de lugares diferentes na região central do continente americano, detectou presença de fenóis e flavonoides, proantocianidinas e limonóides nos extratos da casca de espécie submetida ao estudo.

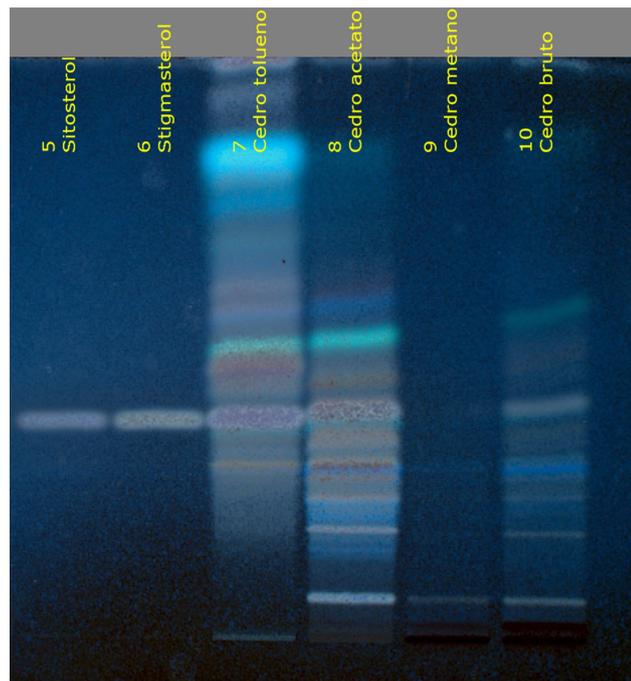
Figura 8 – Placas cromatográficas monoterpreno, sesqui e diterpenos, dos extratos de folha e casca de *Cedrela odorata* L. revelada com vanilina sulfúrica na luz visível



FB: folha bruto; FT: Folha tolueno; FA: folha acetato de Etila; FM: Folha Metanol; CB: Casca bruto; CT: Casca Tolueno; CA: Casca acetato de etila; CM: Casca Metanol; TI : Timol; CA: Carvacrol.

Fonte: O autor.

Figura 9 – Placas cromatográficas triterpenos e esteroides, dos extratos de casca de *Cedrela odorata* L. revelada com Liebermann-Burchard a 360nm



Fonte: O autor.

Os Limonóides são triterpenos, com alta capacidade de serem oxidados, conhecidos como tetranortriterpenóides ou meliacinas, pois a família *Meliaceae*, ao qual pertence *Cedrela odorata* L. é marcada pela biossíntese desse terpeno cuja atividade inseticida é bastante conhecida (JÚNIOR PEREIRA *et al*, 1993; SILVA; NUMOMURA; NUMOMURA, 2012). Em outro estudo Kipassa (2008) também identificou limonóides em extratos da casca de *C. odorata* L.

Campos (1991) identificou em seu estudo a presença de triterpenos na casca de extrato etanólico de *Cedrela odorata* L. ratificando a presença desse metabólito como característica da espécie. Os terpenos isolados no estudo citado foram:  $3\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopiranosil-24-metillenocolesterol, ácido oleanônico, sitosterol, *n*-octacosanol e um novo triterpeno treo-23,24,25-tri-hidroxitirucall-7-eno-3-ona. Nesse mesmo estudo foram identificados do óleo essencial da espécie, vários sesquiterpenóides como  $\alpha$ -copaeno,  $\beta$ -elemeno,  $\alpha$ -muuroleno, calameneno, guayazuleno, di-hidroguayazuleno, torreiol,  $\gamma$ -muuroleno e  $\alpha$ -cubebeno.

Nogueira (2018) encontrou em sua pesquisa em resíduos madeireiros de *C. odorata* L., a presença de esteroides, sesquiterpenos e triterpenos corroborando com o presente estudo. Além disso, esse autor isolou limonóides e realizou teste de atividade antifúngica do composto isolado no qual apresentou como resultado redução significativa no crescimento de *Candida albicans*, *Cryptococcus gattii*, *Cryptococcus neoformans*.

### 5.3 DOSEAMENTO DE CONTEÚDO FENÓLICO, TANINOS E FLAVONOIDES

Os resultados dos teores de fenóis totais, taninos e flavonoides encontram-se descritos na tabela 7. Os resultados expressos são as médias das replicatas acompanhadas do desvio padrão em mg/g equivalente de ácido tânico (EAT) para fenóis totais e taninos, equivalente de rutina (ER) para flavonoides.

A análise de determinação de fenóis totais nos extratos brutos e frações da casca e folha de *Cedrela odorata* L., apresentaram resultados que variaram de  $32,21 \pm 0,76$  a  $430,74 \pm 1,12$  mg/g EAT. O maior teor de fenóis totais foi encontrado no extrato bruto da casca com  $430,74 \pm 1,12$  mg/g EAT, seguido do extrato metanólico da casca com  $404,48 \pm 5,09$  mg/g EAT. Os extratos Bruto e Metanólico da casca de *C. odorata* L. também apresentaram maior teor de taninos, com resultados  $280,08 \pm 6,19$  e  $286,15 \pm 6,89$  mg/g EAT respectivamente, não havendo diferença estatística para esses dois resultados. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico.

Em relação aos flavonoides os extratos obtidos da folha obtiveram maiores teores, a fração que obteve maior teor desse metabólito foi a fração tolueno da folha de *C. odorata* L. que apresentou um teor de  $346,53 \pm 5,74$  mg/g ER. Em um trabalho sobre *Cedrela serrata* Royle, vegetal do gênero *Cedrela*, família Meliaceae,

descreve o predomínio dos flavonoides nas folhas enquanto os compostos fenólicos predominaram na casca corroborando com resultados encontrados nessa pesquisa (ALMUBAYEDH; AHMAD, 2019).

Andrade (2015), em seu estudo, descreve o teor de fenóis totais em extrato bruto alcoólico da casca de *Cedrela odorata* L  $477,78 \pm 18,28$  mg/g EAT e teor de flavonoides  $25,21 \pm 10,36$  mg/g ER. Corrêa (2018) encontrou como resultado similar no qual os fenóis totais no extrato hidroalcoólico da casca de *C. odorata*  $477,78 \pm 28,24$  mg/g EAT, e  $31,80 \pm 2,77$  mg/g ER para teor de flavonoides. Os trabalhos citados reforçam os resultados encontrados no presente estudo. Giordani *et al* (2015), revelaram a presença de compostos fenólicos no extrato da espécie no extrato hidroalcoólico e relata o potencial antioxidante da espécie.

Tabela 7 – Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos, flavonoides expressos em média  $\pm$  desvio padrão, das frações e extratos brutos das cascas e folhas de *Cedrela odorata* L.

	Extrato	FT (mg/g EAT)	TAN (mg/g EAT)	FLA (mg/g ER)/
Extrato da Folha	Folha Bruto	$82,81 \pm 1,66$ e	$48,03 \pm 2,11$ d	$330,21 \pm 5,13$ e
	Folha Metanol	$52,51 \pm 1,25$ f	$12,51 \pm 0,57$ b	$165,16 \pm 3,20$ h
	Folha Acetato de Etila	$83,20 \pm 1,02$ e	$54,51 \pm 1,37$ cd	$292,36 \pm 8,11$ g
	Folha Tolueno	$48,40 \pm 1,95$ f	$11,16 \pm 1,89$ b	$346,53 \pm 5,74$ f
Extrato da Casca	Casca Bruto	$430,74 \pm 1,12$ a	$280,08 \pm 6,19$ a	$64,70 \pm 3,68$ a
	Casca Metanol	$404,48 \pm 5,09$ d	$286,15 \pm 6,89$ a	$85,70 \pm 1,06$ d
	Casca Acetato de Etila	$97,95 \pm 2,64$ c	$61,70 \pm 4,71$ c	$99,93 \pm 3,75$ c
	Casca Tolueno	$32,21 \pm 0,76$ b	$8,03 \pm 0,13$ b	$224,59 \pm 0,72$ b

FT = Fenóis Totais, TAN = Taninos, FLA = Flavonoides, Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey),  $p < 0.05$ .

Fonte: O autor.

Várias pesquisas envolvendo plantas medicinais da Caatinga apontam a presença de compostos fenólicos em várias espécies deste bioma. Estudos apontam a relação destes metabólitos secundários com muitas das atividades terapêuticas atribuídas popularmente a estas espécies (SOUZA, 2007; GOMES *et al*, 2008;

ALENCAR *et al*, 2009). Araújo *et al* (2012) também relataram a presença de taninos e flavonoides em diversas espécies da Caatinga relacionando estes com uso popular.

Inúmeras pesquisas reafirmam a importância biológica dos compostos fenólicos e comprovam que esses metabólitos secundários apresentam atividade antioxidante, imunomoduladora, anti-inflamatória, antimicrobiana (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; ABE *et al*, 2007; CABRAL *et al*, 2009). A atividade antioxidante de compostos fenólicos ocorre, sobretudo, devido às propriedades de óxido-redução, fundamentais na absorção e neutralização de radicais livres. Estudos revelam o uso de compostos fenólicos como agente antimicrobianos, promovendo benefícios adicionais efeitos como antioxidante de modo a promover a preservação da saúde, bem como no tratamento de infecções (PEREIRA; CARDOSO, 2012; ARBOS *et al*, 2013; CETIN-KARACA; NEWMAN, 2015). Essas propriedades destacam a importância biológicas dos compostos encontrados no presente estudo.

Cabral *et al* (2009) relata uma correlação positiva entre compostos fenólicos e atividade antioxidante, além de relacionar a atividade antimicrobiana ao alto teor de compostos fenólicos. Arbos *et al* (2013) também no seu estudo concluiu que extratos provenientes dos resíduos do processamento industrial de frutos da manga (farinhas da casca e amêndoas) apresentaram teor importante de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antimicrobiana. Esses dados corroboram com os resultados obtidos nessa pesquisa visto que, as frações que apresentaram maiores concentrações de fenóis totais, extrato bruto da casca e fração metanólica da casca, foram as que exibiram melhor atividade antioxidante como exposto na figura 9.

Fenóis simples e ácidos fenólicos que apresentam em sua estrutura anéis fenólicos onde o grupo hidroxil acarretam toxicidade aos micro-organismos podendo levar a complexação e inibição de enzimas por oxidação, reações com grupos sulfidril através de interações não específicas com proteínas e acarretando como consequência deficiência de alguns substratos (SANHEUZA *et al*, 2017). Enquanto os flavonoides podem apresentar atividade antimicrobiana por apresentar habilidade de inativação de enzimas e complexação com proteínas extracelulares ou parede celular de bactérias (CHABOT *et al*, 1992).

Os taninos por apresentarem a característica de precipitar as proteínas, favorecem a atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos onde este metabólito encontra-se de forma majoritária (SANTOS; MELLO, 2004; MONTEIRO *et al*, 2005). Esses resultados diferem dos encontrados no presente estudo visto que, as frações

com maiores teores de fenóis totais e taninos (extrato bruto e fração metanólica da casca) não apresentaram melhores resultados frente às linhagens bacterianas em estudo.

#### 5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres são na maioria das vezes responsáveis por desencadear doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, doenças cardiovasculares, comprometimento do sistema imune e disfunções cerebrais e até mesmos pelo surgimento de doenças como câncer (SOUZA, 2007).

A análise de atividade antioxidante é de extrema importância na pesquisa de plantas medicinais, visto que pode ser uma estratégia no combate aos radicais, espécimes que podem promover efeitos nocivos ao organismo. Geralmente esses espécimes participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que estabelecem o encadeamento e as complicações presentes nos processos como envelhecimento, doenças inflamatórias, câncer entre outras (MELO *et al*, 2006).

A capacidade de captura de radicais livres foi determinada aferindo-se a capacidade dos extratos removerem os radicais livres do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), conforme descrito por Peixoto Sobrinho *et al* (2011) com modificações. A atividade de remoção de radicais livres foi expressa como a Concentração Eficiente capaz de capturar 50% dos radicais ( $CE_{50}$ ).

Melo *et al* (2010), em seu trabalho, desenvolveu uma classificação dos agentes antioxidantes vegetais, baseada no desempenho do extrato bruto em relação ao padrão utilizado e as plantas foram classificadas quanto à atividade em três grupos: boa atividade (plantas com  $CE_{50} < 65 \mu\text{g/mL}$ , até três vezes a concentração eficiente do controle positivo), atividade intermediária (plantas com  $65 \mu\text{g/mL} < CE_{50} < 152 \mu\text{g/mL}$ , entre três e sete vezes a concentração eficiente do controle positivo) e baixa atividade (plantas com  $CE_{50} > 152 \mu\text{g/mL}$ , maior que sete vezes a concentração eficiente do controle positivo).

A capacidade de captura do radical livre DPPH apresentada pelos extratos de *Cedrela odorata* L. está representada pela concentração eficiente 50 % ( $CE_{50}$ ) está expressa em médias  $\pm$  desvio padrão na tabela 8.

Tabela 8 – Atividades antioxidantes expressas em média  $\pm$  desvio padrão, das frações e extratos brutos das cascas e folhas de *Cedrela odorata* L.

AMOSTRA	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
Folha Bruto	186,27 $\pm$ 5,04d
Folha Metanol	566,10 $\pm$ 20,29g
Folha Acetato de Etila	256,05 $\pm$ 6,27c
Folha Tolueno	9154,98 $\pm$ 2699,92e
Casca Bruto	18,41 $\pm$ 1,38a
Casca Metanol	18,24 $\pm$ 1,07a
Casca Acetato de Etila	409,54 $\pm$ 26,09f
Casca Tolueno	1410,25 $\pm$ 41,34b

CE<sub>50</sub> = Concentração Eficiente 50%, Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey),  $p < 0.05$ .

Fonte: O autor.

O extrato metanólico de casca de *Cedrela odorata* L apresentou a maior capacidade de captura do radical livre DPPH obtendo a menor CE<sub>50</sub> no valor de 18,24  $\pm$  1,07 µg/mL. Se comparado ao controle positivo, ácido ascórbico, a fração metanólica do extrato bruto mostrou-se mais eficaz na atividade testada, pois o padrão positivo apresentou uma média na CE<sub>50</sub> de 19,92 µg/mL, isto significa que o poder antioxidante da espécie pode ser comparável ao poder já conhecido do ácido ascórbico. Os resultados também mostraram que estatisticamente não há diferença entre a CE<sub>50</sub> do extrato bruto da casca, 18,41  $\pm$  1,38 µg/mL, com a fração metanólica da casca 18,24  $\pm$  1,07 µg/mL. Esse resultado corrobora com estudo de Andrade (2015) que obteve resultado da CE<sub>50</sub> de extrato bruto metanólico de *Cedrela odorata* L 13,63  $\pm$  0,96 µg/mL. Lima (2011) obteve como resultado da CE<sub>50</sub> do extrato bruto hidroalcoólico de casca de *C. odorata* L 36,54  $\pm$  1,72 µg/mL reafirmando o bom potencial antioxidante do extrato bruto da casca do vegetal em estudo. A CE<sub>50</sub> das frações acetato de etila e tolueno apresentaram valores de 409,54  $\pm$  26,09

$\mu\text{g/mL}$  e  $1410,25 \pm 41,34 \mu\text{g/mL}$  respectivamente, desta forma caracterizando baixo potencial antioxidante desses extratos.

Os resultados de  $\text{CE}_{50}$  obtidos dos extratos da folha de *Cedrela odorata* L, bruto, metanólico e acetato de etila, apresentaram baixa atividade antioxidante com resultados  $186,27 \pm 5,04$ ;  $566,10 \pm 20,29$  e  $256,05 \pm 6,27 \mu\text{g/mL}$ . Os extratos tolueno tanto de casca, com  $\text{CE}_{50}$   $1410,25 \pm 41,34 \mu\text{g/mL}$  quanto de folha, com  $\text{CE}_{50}$   $9154,98 \pm 2699,92 \mu\text{g/mL}$ , não apresentaram bons resultados de atividade antioxidante da espécie em estudo.

Espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) são extremamente nocivos ao DNA e podem oxidar compostos bioquímicos importantes com lipídios e proteínas comprometendo a fisiologia celular. O controle dos radicais livres produzidos nos organismos vivos é realizado por compostos antioxidantes, são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (BARREIRO *et al*, 2006).

Os compostos fenólicos estão inseridos nas substâncias com alto potencial antioxidante, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, taninos condensados e hidrolisáveis, ligninas e ligninas (SOARES, 2008).

A tabela 9 compara os resultados das concentrações de fenóis totais e taninos a suas respectivas  $\text{CE}_{50}$ . Os resultados obtidos revelam que o extrato bruto e metanólico de casta de *C. odorata* L. apresentam maiores concentrações de fenóis totais ( $430 \pm 1,12 \text{ mg EAT/g}$  e  $404,48 \pm 5,09 \text{ mg EAT/g}$  respectivamente) e menores valores de  $\text{CE}_{50}$ , podendo-se atribuir a boa atividade antioxidante aos compostos fenólicos do extrato.

Tabela 9 – Teores (mg/g) de fenóis totais, taninos e CE<sub>50</sub> expressos em média ± desvio padrão, das frações e extratos brutos das cascas e folhas de *Cedela odorata* L.

	FT (mg EAT/g)	TAN (mg EAT/g)	CE <sub>50</sub> (µg/mL)
Folha Bruto	82,81 ± 1,66 e	48,03 ± 2,11 d	186,27 ± 5,04 d
Folha Metanol	52,51 ± 1,25 f	12,51 ± 0,57 b	566,10 ± 20,29 g
Folha Acetato de Etila	83,20 ± 1,02 e	54,51 ± 1,37 cd	256,05 ± 6,27 c
Folha Tolueno	48,40 ± 1,95 f	11,16 ± 1,89 b	9154,98 ± 2699,92 e
Casca Bruto	430,74 ± 1,12 a	280,08 ± 6,19 a	18,41 ± 1,38 a
Casca Metanol	404,48 ± 5,09 d	286,15 ± 6,89 a	18,24 ± 1,07 a
Casca Acetato de Etila	97,95 ± 2,64 c	61,70 ± 4,71 c	409,54 ± 26,09 f
Casca Tolueno	32,21 ± 0,76 b	8,03 ± 0,13 b	1410,25 ± 41,34 b

FT = Fenóis Totais, TAN = Taninos, CE<sub>50</sub> = Concentração Eficiente 50%, Letras iguais na mesma coluna indicam não diferença estatística conforme ANOVA (seguido de Tukey), p < 0.05.

Fonte: O autor.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Neutralizando ou sequestrando radicais livres e quelando metais de transição, atuando tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários produzidos pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destes compostos (HASLAM, 1996; SOUSA, 2007).

## 5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

### 5.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os testes para determinação da Concentração Mínima Inibitória frente cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas do departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE foram realizados para os antibióticos eritromicina, benzilpenicilina, ampicilina e levofloxacina.

Os ensaios foram validados usando a cepa controle de *Staphylococcus aureus* ATCC29213 no qual apresentaram resultados dentro do intervalo da CIM estabelecido, no documento M7-A6 do *Clinical And Laboratory Standards Institute* CLSI do ano de 2016, onde o intervalo da CIM em  $\mu\text{g/mL}$  para a ampicilina está entre 0,5 e 2  $\mu\text{g/mL}$ , para levofloxacina está entre 0,06 e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e eritromicina está entre 0,25 e 1  $\mu\text{g/mL}$ , no qual a cepa controle apresentou resultado dentro dos padrões estabelecidos no documento. Os resultados do ensaio para determinação da CIM, frente aos antibióticos em estudo, estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Concentrações Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antibióticos selecionados para pesquisa frente a isolados de *Staphylococcus aureus* da coleção do Laboratório Análises Microbiológicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

Isolados/ <i>Staphylococcus aureus</i>	ANTIMICROBIANOS DO ESTUDO			
	Médias das Concentrações Inibitórias Mínimas das cepas em <i>Staphylococcus aureus</i> em $\mu\text{g/mL}$			
	Eritromicin a	Benzilpenicilin a	Levofloxacina a	Ampicilin a
LAMUFPE1052.5	400 (R)	6,25 (R)	0,78 (S)	25 (*)
LAMUFPE1051.5	400 (R)	3,12 (R)	0,78 (S)	6,25 (*)
LAMUFPE219.6	50 (R)	6,25 (R)	0,78 (S)	3,12 (*)
LAMUFPE223.6	25 (R)	6,25 (R)	0,78 (S)	12,5 (*)
LAMUFPE221.6	25 (R)	12,5 (R)	0,78 (S)	6,25 (*)
LAMUFPE406.6	400 (R)	25 (R)	6,25 (R)	12,2 (*)
ATCC29213	0,78 (S)	0,097(S)	0,097(S)	0,78(*)

(R)= Resistente (S)= Sensível (\*) = Não há intervalo para ampicilina no CLSI

Fonte: O autor.

De acordo com os resultados obtidos na determinação da CIM para cepas em teste frente a eritromicina, todas as cepas apresentaram resistência a este antibiótico uma vez que a CLSI (2018) preconiza que CIM's > 8  $\mu\text{g/mL}$  são

indicativos de resistência, CIM's entre 1 - 4 µg/mL indicam resistência intermediária e CIM's < 0,5 são referentes a sensibilidade de *S. aureus* a droga. O isolado de ATCC29213 apresentou a CIM 0,78 µg/mL, mas os outros isolados de *S. aureus* no teste foram resistentes a eritromicina com resultados da CIM superiores a 8 µg/mL como mostra na tabela 10.

A CLSI (2018) estabelece para benzilpenicilina que CIM's > 0,25 µg/mL são indicativos de resistência para *S. aureus*. Desta forma todos os isolados testados apresentaram valores da CIM superiores a 0,25 µg/mL caracterizando resistência ao referido antibiótico.

Para Levofloxacina, valores da CIM superiores a 4 µg/mL caracteriza resistência de *S. aureus* frente a este antibiótico (CLSI, 2018). Os resultados deste estudo apontam que apenas o isolado LAMUFPE406.6, com valor da CIM 6,25, apresentou resistência a Levofloxacina.

Também foram realizados a determinação da CIM dos extratos de *Cedrela odorata* L., tanto extratos da casca (bruto, metanólico, acetado de etila e tolueno) como da folha (bruto, metanólico, acetato de etila e tolueno), frente às cepas de *Staphylococcus aureus* de isolados clínicos multirresistentes da coleção de antibióticos do Laboratório de Análises Microbiológicas – LAM do departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

Tanaka *et al* (2005) em estudo classificaram extratos vegetais com boa atividade antimicrobiana quando a CIM < 100µg/mL, atividade moderada com uma CIM de 100 a 500 µg/mL, inativo para CIM > 1000µg/mL.

Utilizando a Classificação de Tanaka *et al* (005) de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, a maioria dos extratos de *Cedrela odorata* L. apresentaram inatividade frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, apresentando resultados maiores ou igual a 1000µg/mL com exceção das frações acetato de etila e tolueno da casca que apresentaram atividade moderada com CIM de 500 µg/mL como os resultados apresentados na tabela 11.

De acordo com os resultados obtidos, todos os extratos provenientes da folha apresentaram inatividade frente as cepas de *Staphylococcus aureus* com valores da CIM iguais ou maiores que 1000 µg/mL. Com relação aos extratos da casca, os extratos brutos e metanólico apresentaram-se inefetivos contra as cepas *S. aureus* do estudo, apresentando melhores resultados as frações acetato de etila e tolueno exercendo atividade moderada frente a cepa LAMUFPE406.6 com uma CIM de 500

$\mu\text{g/mL}$  exibidos na tabela 11. Os resultados corroboram com o estudo Corrêa (2018), onde não foi encontrada atividade antimicrobiana em extrato hidroalcolico bruto da casca de *Cedrela odorata* L com valor da CIM 2000  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabela 11 – Concentrações Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos extratos hidroalcolicos de *Cedrela odorata* L. frente a *Staphylococcus aureus* de isolados clínicos multirresistentes da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas – LAM do departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

CEPAS / Extratos de <i>Cedrela odorata</i> L.	Médias das CIM's dos Extratos de <i>Cedrela odorata</i> L. em $\mu\text{g/mL}$							
	EXTRATO DA CASCA <i>Cedrela odorata</i> L.				EXTRATO DA FOLHA <i>Cedrela odorata</i> L.			
	Extrato Bruto	Fração Metanol	Fração Acetato de Etila	Fração Tolueno	Extrato Bruto	Fração Metanol	Fração Acetato de Etila	Fração Tolueno
LAMUFPE1052.5	2000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	1000
LAMUFPE1051.5	2000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	1000
LAMUFPE219.6	2000	2000	1000	1000	2000	2000	2000	1000
LAMUFPE223.6	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000	1000
LAMUFPE221.6	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	1000
LAMUFPE406.6	2000	2000	500*	500*	2000	2000	1000	1000
ATCC 29213	2000	2000	2000	500	2000	2000	2000	1000

(\*) Isolado selecionado  
Fonte: O autor.

Estes resultados revelam que as frações acetato de etila e tolueno da casca de *Cedrela odorata* L, foram mais ativas contra cepa de *S. aureus* do que o extrato bruto e metanólico indicando que o fracionamento aumentou a atividade antimicrobiana nas frações citadas. Isto pode ter ocorrido devido a seleção de alguns metabólitos, proporcionada pelo fracionamento, pode também ter aumentado as concentrações destes compostos ativos e ampliado a ação antibiótica desses extratos (TAMOKOU *et al*, 2012).

Embora os extratos da casca acetato de etila e tolueno tenham apresentado atividade contra cepa multirresistente LAMUFPE406.6, estes mesmos extratos e assim como as outras frações não apresentaram nenhuma efetividade as demais bactérias em estudo, o que mostra a dificuldade que os fitocomplexos possuem para encontrar um mecanismo de ação que seja efetivo contra essas bactérias multirresistentes (MENEGOTTO; PICOLI, 2007; SANTOS *et al*, 2007), revelando a importância destes estudos, pois mesmo que estas espécies não sejam mais virulentas que as cepas sensíveis, o arsenal terapêutico para seu combate apresenta-se limitado (MENEZES *et al*, 2004).

Através deste estudo pode-se constatar que frações mais efetivas contra os isolados de *S. aureus* foram as provenientes de solventes extratores de menor polaridade, tolueno e acetato de etila, em que conseqüentemente pode-se visualizar na figura 9, uma maior intensidade na cor referente as bandas correspondentes aos esteroides e triterpenos, o que considera-se que essas frações possuem maior concentração destes fitocompostos.

Vizzotto e Pereira (2011) em um estudo testaram diferentes solventes com baixa, intermediária e alta polaridade de amora-preta para extração de compostos fenólicos e no mesmo estudo. Na referida pesquisa, o solvente hexano (de menor polaridade), ao ser utilizado, não foi capaz de extrair os compostos fenólicos. Os solventes de maior polaridade (acetona, etanol e metanol) foram mais eficientes na extração dos polifenóis. Ainda nesse mesmo estudo, foi observado a afinidade dos terpenóides pelas frações hexânicas e acetato de etila, não se mostrando presente na fração metanólica (fração de maior polaridade), ratificando a reduzida capacidade de solubilidade que esses compostos apresentam em solventes de baixa polaridade (ALCÂNTARA *et al*, 2010; HILL; CONNOLLY, 2017). Os estudos citados reafirmam os resultados encontrados na presente pesquisa.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se observar a maior concentração de triterpenos nas frações tolueno e acetato de etila do extrato da casca de *Cedrela odorata* L. (figura 9). Embora ainda não seja completamente conhecido, devido à complexidade molecular desse grupo de metabólitos, pesquisas sobre efeito dos terpenos nas membranas bacterianas isoladas sugerem sua atividade em virtude de suas propriedades lipofílicas. Alguns trabalhos sugerem mecanismo de ação antimicrobiano de óleos extraídos de espécies vegetais estão relacionadas a danos no envoltório celular microbiano com perda de material

intracelular e inibição de síntese de macromoléculas (DORMAN; DEANS, 2000; SALES; SALVADOR, 2014).

### 5.5.2 Checkerboard

De acordo com os parâmetros de Tanaka *et al* (2005), as frações acetato de etila e tolueno proveniente da casca de *Cedrela odorata* L apresentaram os melhores resultados, obtendo atividade moderada frente a isolados de *S. aureus* LAMUFPE406.6, ambos extratos com resultado da CIM 500µg/mL, desta forma, de acordo com os critérios de seleção para escolha do extrato para análise do *Checkerboard*, essas frações foram selecionadas para teste de combinação com a eritromicina, benzilpenicilina, levofloxacina, ampicilina. Os resultados dos ensaios do *Checkerboard* estão expressos na tabela 12.

Tabela 12 - Interação entre as frações acetato de etila e tolueno da casca de *Cedrela odorata* L com eritromicina, benzilpenicilina, levofloxacina e ampicilina utilizando método *Checkerboard* frente a Isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistente LAMUFPE406.6 da coleção de do Laboratório de Análises Microbiológicas – LAM/UFPE

Associação	CIM Individual (µg/mL)	CIM Combinação (µg/mL)	CIF Individual	ICIF	Interpretação
Eri x F acet	400/500	50/62,5	0,13/0,13	0,26	Sinérgico
Eri x F Tol	400/500	200/7,81	0,5/0,02	0,52	Parcialmente sinérgico
Benzil x F acet	25/500	3,13/250	0,13/0,5	0,63	Parcialmente sinérgico
Benzil x F Tol	25/500	6,25/62,50	0,25/0,13	0,38	Sinérgico
Levo x F Acet	6,25/500	3,13/125	0,5/0,25	0,75	Parcialmente sinérgico
Levo x F Tol	6,25/500	0,78/31,25	0,13/0,6	0,19	Sinérgico
Amp x F Acet	12,25/500	1,53/250	0,12/0,5	0,62	Parcialmente sinérgico
Amp x F Tol	12,25/500	12,25/7,81	1,0/0,02	1,02	Indiferente

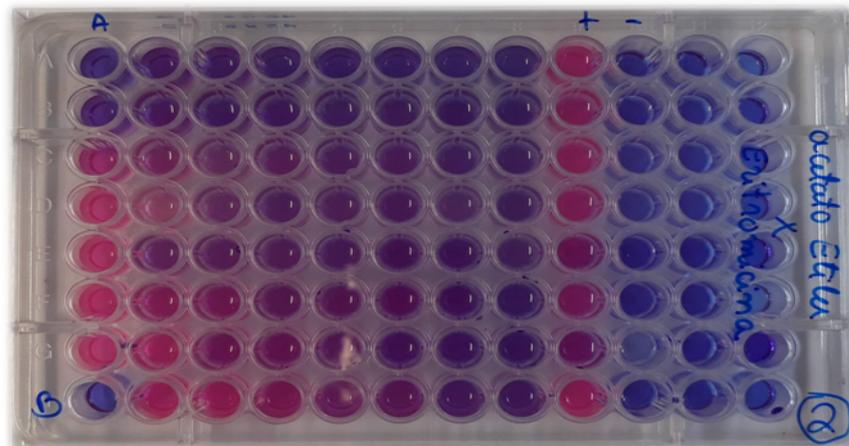
**Eri**= Eritromicina; **Benzil**= Benzilpenicilina; **Levo** = Levofloxacina; **Amp**= Ampicilina; **F Acet**= Fração acetato de etila; **F Tol**= Fração Tolueno; **CIM** = Concentração Inibitória Mínima; **CIF** = Concentração Inibitória Fracionária; **ICIF** = Índice da Concentração Inibitória Fracionária

Fonte: O autor.

Analisando os resultados das combinações entre eritromicina e fração acetato de etila não houve reversão da resistência, mas foi possível observar uma redução

em oito vezes da concentração da eritromicina em que a CIM individual inicialmente apresentava valor de 400µg/mL após a combinação com a fração acetato de etila da casca, observou-se uma redução para 50µg/mL. Esta combinação apresentou resultado de ICIF 0,26 caracterizando um efeito sinérgico entre o extrato e o antimicrobiano. Na combinação entre eritromicina e fração tolueno da casca, observou-se uma redução de 50% na Concentração Mínima Inibitória do antibiótico, onde a concentração inicial apresentava-se 400µg/mL passando após o *Checkerboard* a uma concentração de 200µg/mL. Esta combinação apresentou resultado de ICIF 0,52 caracterizando um efeito parcialmente sinérgico entre o extrato e o antimicrobiano (figura 10).

Figura 10 – Placa da combinação entre a fração acetato de etila da casca de *Cedrela odorata* L. e eritromicina frente a Isolado de *Staphylococcus aureus* multirresistente (LAMUFPE406.6) pelo método de *Checkerboard*

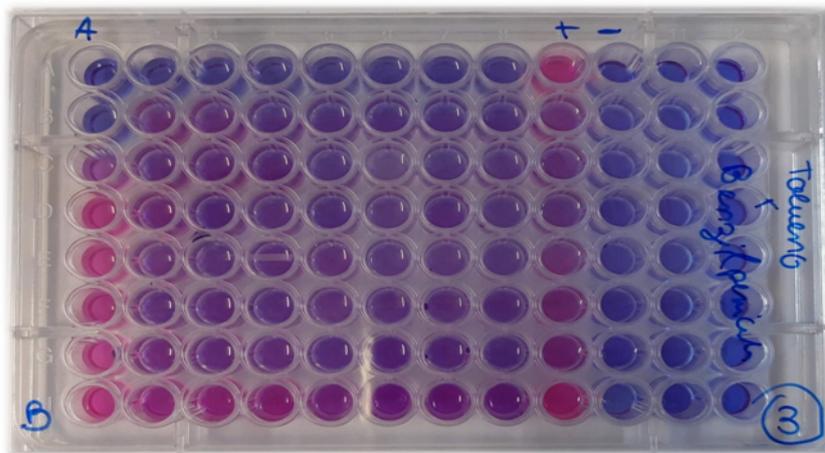


Fonte: O autor.

A eritromicina é um macrolídeo muito utilizado na prática clínica cuja resistência por cepas de *Staphylococcus aureus* vem cada vez aumentando (TAMARIZ ORTIZ, 2009). Quando utilizada em doses elevadas pode promover efeitos adversos como irritação gástrica, vômitos e colestase hepática (SILVA, 2012), dessa forma, a redução na dose efetiva da eritromicina é um fator extremamente relevante para saúde. Assim como resultados obtidos nessa pesquisa, Alencar *et al* (2015) sugerem que extratos de espécies do gênero *Spondias* também possuem potencial efeito modulador em linhagens *Staphylococcus aureus* resistentes a eritromicina reafirmando o potencial dos extratos vegetais na atividade modulatória de antimicrobianos.

Com relação à interação benzilpenicilina e fração acetato de etila observou-se uma redução de em oito vezes da concentração inicial da CIM após a combinação deste antibiótico com o referido extrato. A CIM inicial apresentava valor de 25µg/mL e após a combinação entre o antibiótico e o extrato o valor da CIM passou a 3,13 µg/mL. O resultado da ICIF dessa combinação foi 0,63 concluindo que a interação foi parcialmente sinérgica. Já a combinação entre a fração tolueno e benzilpenicilina resultou em uma redução de quatro vezes o valor da CIM inicial que se apresentava 25 µg/mL, passando após a combinação a 6,25 µg/mL, com resultado da ICIF 0,38 apresentando como conclusão dessa associação um efeito sinérgico.

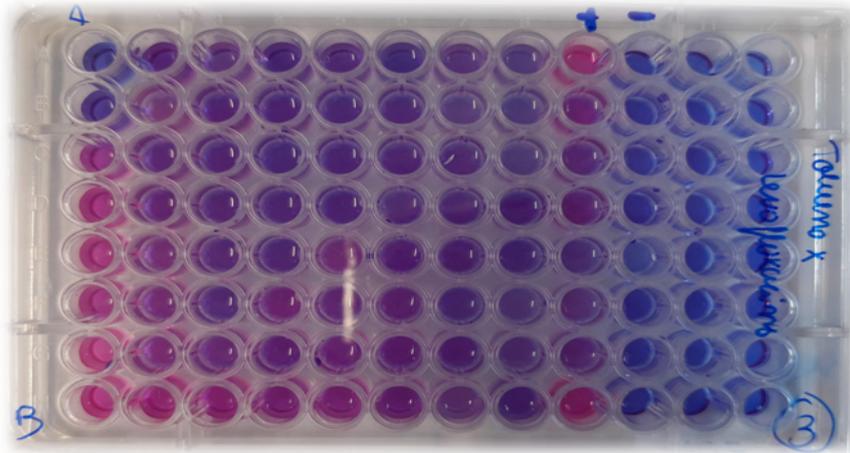
Figura 11 – Placa da combinação entre a fração tolueno da casca de *Cedrela odorata* L. e benzilpenicilina frente a Isolado de *Staphylococcus aureus* multirresistente (LAMUFPE406.6) pelo método de *Checkerboard*



Fonte: O autor.

No resultado obtido na combinação levofloxacina e fração acetato de etila da casca, observou-se uma redução de 50% no valor da CIM, passando de 6,25 µg/mL para 3,13µg/mL, com resultado da ICIF 0,75 o que mostra um efeito parcialmente sinérgico entre essas substâncias. Já na combinação entre levofloxacina e fração tolueno da casca de *C..odorata* L. observamos uma redução em oito vezes no valor da CIM passando de uma CIM inicial 6,25 µg/mL para 0,78 µg/mL, com resultado da ICIF dessa associação 0,19 que revela um efeito sinérgico entre esses compostos, onde observamos a modificação da resistência microbiana frente a este antibiótico no qual houve reversão da resistência microbiana, cujo documento CLSI 2018 refere-se como isolados de *S aureus* frente a levofloxacina com CIM menor ou igual 1 µg/mL, sensíveis a este antimicrobiano .

Figura 12 – Placa da combinação entre a fração tolueno da casca de *Cedrela odorata* e levofloxacina frente a isolado de *Staphylococcus aureus* multirresistente (LAMUFPE406.6) pelo método de *Checkerboard*



Fonte: O autor.

Na análise dos resultados da interação ampicilina e fração acetato de etila observou-se um efeito parcialmente sinérgico, visto que a ICIF apresentou resultado 0,62, porém foi possível observar uma redução na CIM da ampicilina após a interação entre os dois compostos onde o valor da antes da combinação apresentava valor de 12,25 $\mu$ g/mL e passou a uma concentração de 1,53 $\mu$ g/mL ou seja, uma redução de oito vezes no valor da CIM. Para interação entre esse mesmo antibiótico e a fração tolueno observamos um efeito indiferente onde a ICIF 1,02.

Algumas pesquisas atribuem a atividade antimicrobiana aos compostos fenólicos (CABRAL *et al*, 2009; CARDOSO *et al*, 2010; ARBOS *et al*, 2013; SANTOS; RODRIGUES, 2017) porém, no presente estudo as frações com maior teor de compostos fenólicos e taninos não apresentaram melhores atividade antimicrobiana.

Agentes modificadores de resistência microbiana atuam inibindo a resistência. Os mecanismos de ação nos quais os extratos vegetais podem atuar comprometendo o crescimento bacteriano são variados. Alguns fitocomponentes como os terpenos e esteroides, apresentam natureza hidrofóbica no qual podem interagir na membrana celular dos micro-organismos afetando todo metabolismo ou tornando a células mais permeáveis aos antimicrobianos (SARTO *et al*, 2014). Pode-se citar o trabalho de SILVA (2013) no qual detectou atividade modulatória dos diterpenos de extratos de algas marinhas frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a eritromicina. Também foi verificada atividade modulatória envolvendo

óleos essenciais no estudo de Zago *et al* (2009) onde 54% das interações sobre diferentes drogas testadas apresentaram efeito sinérgico sobre as linhagens de *S. aureus*.

Coutinho *et al* (2012) sugere que extratos vegetais atuam na membrana da célula microbiana contribuindo para entrada do antibiótico no compartimento interno celular. Cartaxo (2012) avaliou a atividade antimicrobiana de frações e subfrações de geopropolis e identificou atividade frente a cepas de *S. aureus* para as subfrações com menor polaridade, sugerindo esta ação aos terpenóides contidos nas amostras, que podem corroborar com o presente trabalho, devido a presença de terpenóides na fração acetato de etila e tolueno da casca de *C. odorata* L.

No presente estudo foram testados antibióticos de diferentes classes, apesar de atuarem sob diferentes mecanismos de ação, três dos quatro antibióticos testados combinados aos extratos da casca da espécie em estudo apresentaram efeito sinérgico. Estas frações extraídas de solvente de menor polaridade e apresentavam-se quimicamente semelhante, de acordo com a triagem fotoquímica realizada nesse estudo.

Os extratos com melhor atividade antimicrobiana não foram os que apresentaram como resultado maior teor de fenóis totais e taninos, o que sugere que estes metabólicos não foram os principais responsáveis pela atividade modulatória.

Na análise fotoquímica por HPTLC é possível observar uma maior intensidade de cor nas faixas referente a terpenos nas frações tolueno e acetato de etila provenientes da casca, o que pode-se considerar uma maior concentração destes compostos nas frações de menor polaridade e desta forma possibilita supor uma relação do efeito sinérgico aos terpenos destas frações.

Como característica comum a diferentes classes de antibióticos pode-se sugerir a atividade sobre a membrana celular da linhagem bacteriana em estudo aumentando a permeabilidade do antimicrobiano para o interior celular bacterianos e promovendo comprometimento da estrutura bioquímica bacteriana levando a redução da concentração da CIM sob esses micro-organismos (DORMAN; DEANS, 2000; SALES; SALVADOR, 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo reafirmam que a busca por produtos naturais com atividade antimicrobiana e efeitos sinérgicos com drogas usuais na prática clínica é uma área promissora da pesquisa fitomedicinal, uma vez que esses compostos podem apresentar-se como modificadores da atividade

antibiótica, podendo alterar a susceptibilidade microbiana a antibióticos (COSTA *et al*, 2008). Desta forma, a ideia de que esta abordagem é exclusiva para combinações entre compostos isolados pode ser repensada, pois também combinações de óleos essenciais e extratos complexos podem apresentar sinergia com agentes antimicrobianos (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Pesquisas para estudo do efeito sinérgico são extremamente relevantes, pois a combinação entre dois ou mais compostos é importante pelas seguintes razões: (1) para prevenir ou reprimir o surgimento de cepas resistentes, (2) para diminuir a dose-toxicidade relacionada, (3) para atingir o amplo espectro de atividade (ELIOPOULUS; MOELLERING JUNIOR, 1991; MUROI; KUBO, 1994).

## 6 CONCLUSÃO

Os produtos naturais sempre foram fonte e alvo de pesquisa para novos antimicrobianos e possuem um papel importante, pois podem atuar como modificadores de resistência antibiótica. A modulação de drogas antimicrobianas é algo necessário frente a micro-organismos multirresistente e o uso de produtos naturais é uma boa alternativa para esta finalidade, seja pelo produto bruto, pelo isolamento de compostos ou pelo aproveitamento de amostras semi-purificadas.

O presente trabalho conseguiu trazer pontos importantes para discussão e resultados que contribuem para conhecimento científico de *Cedrela odorata* L. Através das análises fitoquímica por HPTLC, foi possível identificar presença de compostos fenólicos em todos os extratos. Diferentes compostos fenólicos e terpenos contidos nos extratos bruto e as frações dos extratos de casca e folha de *Cedrela odorata* L., com ausência de alcaloides em todas as frações analisadas. Nesse mesmo ensaio verificou-se presença de mono, sesqui, diterpenos e triterpenos, sobretudo nas frações tolueno e acetato de etila nas quais esses metabólitos têm maior afinidade.

Essa pesquisa ainda revelou que os extratos brutos e fração metanólica da casca de *Cedrela odorata* L. apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e taninos. Estas mesmas frações apresentaram melhores atividades antioxidantes, onde foi possível observar o potencial desses extratos no combate aos radicais livres.

Os melhores valores da CIM frente a isolados de *S aureus* foram encontrados nos extratos das frações acetato de etila e tolueno provenientes da casca da *Cedrela odorata* L. Com relação à interação entre os referidos extratos e os antimicrobianos, através dos resultados do ICIF obtidos no estudo, foi identificado sinergismo em três dos quatro antibióticos em teste (eritromicina em associação com a fração acetato de etila da casca, Benzilpenicilina com associação a fração tolueno da casca, e levofloxacina associado à fração tolueno da casca), no qual concluiu-se que os extratos tolueno e acetato de etila da casca de *Cedrela odorata* L., apresentam-se como agentes modificadores de resistência, potencializando a atividade dos antimicrobianos, de diferentes mecanismos de ação, atuando como agente modulador de resistência microbiana frente a isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes.

Conforme os resultados encontrados nesta pesquisa *Cedrela odorata* L trata-se de um vegetal promissor, no qual se supõe que este pode representar uma alternativa interessante nos esforços para combater a resistência bacteriana de *Staphylococcus aureus* resistentes aos antimicrobianos usuais na prática clínica, pois, pode atuar como modificador de resistência a essas drogas.

O estudo de efeito sinérgico entre produtos naturais e drogas usuais são extremamente relevantes. No presente trabalho, a combinação de antimicrobiano e extrato de *Cedrela odorata* L, pode apresentar-se como uma prevenir o surgimento de cepas resistentes, reduzir a dose efetiva do antimicrobiano e conseqüentemente diminuir a dose-toxicidade relacionada para atingir o amplo espectro de atividade.

Estudos mais detalhados e isolamento de compostos destes extratos bem como estudo de toxicidade são necessários para avanço na pesquisa para um possível uso desse vegetal na prática clínica.

## REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 45, n. 1, p. 2054-2059, 2001.
- ABDELRAHIM, S. I. Atividade antimicrobiana de *Psidiumguajava* L. **Fitoterapia**. [s.l.], v. 73, n.7-8, p. 713-715, 2002.
- ABE, L. T. *et al.* Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitislabrusca* L. e *Vitisvinifera* L. **Food Science and Technology**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- ABEGG, P. T. G. M.; SILVA, L. L. Controle de infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo. **Semina: ciências biológicas e da saúde**, [s.l.], v. 32, n. 1, p. 47-58, 2011.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 16, n. 3, p. 273-85, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 678-689, 2006.
- ALCÂNTARA, J. M. *et al.* Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 40, n. 3. p. 567-572, 2010.
- ALENCAR, N. L. *et al.* Can the Apparency Hypothesis explain the selection of medicinal plants in an area of caatinga vegetation? A chemical perspective. **Acta Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 908-909, 2009.
- ALENCAR, L. C. B. *et al.* Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 36, n. 1, não p., 2015.
- ALMEIDA, C. D. C. B. R. *et al.* Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical Biology**. [s.l.], v. 50, n. 2, p. 201-207, 2012.
- AMORIM, E. L. C. *et al.* A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.

ALMUBAYEDH, H.; AHMAD, R. Ethnopharmacology, phytochemistry, biological activities, and therapeutic applications of *Cedrela serrata* Royle: A mini review. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 112-120, 2019.

AN, J. *et al.* Antibacterial and synergy of a flavanone rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 990–993, 2011.

ANDRADE, S. F. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populonic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 109, n. 3, p. 464-471, 2007.

ANDRADE, B. de A. **Atividade fotoprotetora *in vitro* de espécies medicinais da caatinga pernambucana e incorporação em gel dermatológico**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

ARAÚJO, T. A. S. *et al.* A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 120, n. 1, p. 72-80, 2008.

ARAÚJO, T. A. S. *et al.* Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa*. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 50, n. 6, p. 754-759, 2012.

ARBOS, K. A. *et al.* Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, [s.l.], v. 60, n. 2, p. 161-165, 2013.

ARÇARI, D. P. *et al.* Efeitos antiobesidade do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) em camundongos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. **Obesidade**, [s.l.], v. 17, n. 12, p. 2127-2133, 2009.

ARGENTA, S.C. Plantas medicinais: cultura popular versus ciências. **Revista de extensão da URI**, [s.l.], v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.

BARREIRO, A. *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRETO, H. M. *et al.* Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by H.B.K. in Methicillin Resistant. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 20, n. 14, p. 7. 2014.

BATISTA, L. C. L. **Qualidade nutricional e atividade antioxidante de laranjinha pacu (*Pouteriaglomerata* (miq.) Radlk) do cerrado e do Pantanal**. Dissertação (Mestrado em Saúde). – Programa de Pós-Graduação em Saúde. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2013.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BETTEGA, P. V. C. *et al.* Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, [s.l.], v. 7, n. 1, não p., 2011.

BETONI, J. E. C. *et al.* Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on 77 Staphylococcus aureus diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 101, n. 1, p. 387-90, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica\\_nacional\\_fitoterapicos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf)>. Acesso em: 15 set. 2019.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. Barcelona: Acribia, 1991.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. de M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 2675-2685, 2012.

CABRAL, I. S. R. *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 78, n. 1, não p., 2008.

CAMPOS, A. M. Triterpenes from Cedrela odorata. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 30, n. 4, p. 1225-1229, 1991.

CAPASSO, R. *et al.* **Phytoterapy**: a quick reference to herbal medicine. Berlin: Springer, 2003.

CARDOSO, F. L. *et al.* Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 35-40, 2010.

CARTAXO, R. T. **Fracionamento bioguiado e caracterização química de compostos com atividade antimicrobiana de geoprópolis de Uruçu Nordestina: abelha indígena sem ferrão *Meliponascutellaris***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas. 2012.

CASSINI, A. *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 56-66, 2019.

CASTEJON, F. V. **Taninos e Saponinas**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

CASTILHOS, T. dos S. *et al.* Avaliação *in vitro* das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. **Revista brasileira de farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 209-214, 2007.

CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia coli. **Food Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 816. 2015.

CHABOT, S. *et al.* Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, Gigaspora margarita Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO<sub>2</sub>-enriched conditions. **New Phytologist**, [s.l.], v. 122, n. 3, p. 461-467, 1992.

CHENG, G. *et al.* Antimicrobial drugs in fighting against antimicrobial resistance. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 470, 2016.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L. Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 37, n. 1, p. 318-326. 1982.

COATES, R.; MORAN, J.; HORSBURGH, M. J. *Staphylococci*: colonizers and pathogens of human skin. **Future Microbiol**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 75-91, 2014.

COOMBS, G. W. *et al.* Australian group on antimicrobial resistance hospital-onset *Staphylococcus aureus* surveillance programme annual report, 2011. **Communicable diseases intelligence quarterly report**, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 210-218, 2013.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, [s.l.], v. 257, n. 11, p. 1050-1055. 1992.

CORRÊA, A. J. C. Contribuição do conhecimento popular para a descoberta de novos antimicrobianos. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2018.

COSTA, V. C. O. *et al.* Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.18, n. 2, p. 245-248. 2008.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Fruits to potentiate the antibiotic activity: the effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Alimentaria**, [s.l.], v. 41, n. 1, p. 67-72, 2012.

COUTINHO, H. D. M. *et al.* Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC complementary and alternative medicine**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 13, 2008.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). *In*: BUCHANAN, W. B.; GRUISSEM, R. J. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1250-1318, 2000.

CSLI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28. ed. [s.l.]: CLSI, 2018.

COWAN, M. M. Plants Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. [s.l.], v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop protection**. [s.l.], v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

DE GUTIÉRREZ, I. E. M. *et al.* **Plantas Mediciniais no Semiárido: conhecimentos populares e acadêmicos**. Salvador: EDUFBA, 2010.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, [s.l.], v. 5, n. 1, não p., 2004.

DESMARCHELIER, C. *et al.* Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

DIOUF, P. N.; STEVANOVIC, T.; BOUTIN, Y. The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts. **Industrial Crops and Products**. [s.l.], v. 30, N. 1, p. 297-303, 2009.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of applied microbiology**, [s.l.], v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DOUGHERTY, P. F.; YOTTER, D. W.; MATTHEWS, T. R. Microdilution transfer plate technique for determining in vitro synergy of antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 225-8, 1977.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multi Ciência**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-16, 2016.

ELIOPOULOS, G.; MOELLERING JUNIOR, R. C. Laboratory methods used to assess the activity of antimicrobial combinations. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co, 199, p. 432–492. 1991

FAIELA, B. G. E. **Isolamento e caracterização dos limonóides nas raízes e cascas de caule da planta trichiliaemetica (Meliaceae)**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Graduação em Farmácia. Universidade Eduardo Mondlane, Moçambique, 2007.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F. *et al.* In vitro activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinobacter baumannii*. **Chemotherapy**, [s.l.], v. 49, n. 1-2, p. 24-6, 2003.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA; S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

FERRI, M. G. **Vegetação brasileira**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1980.

FESSENDEN, R. J.; FESSENDEN, J. C. **Organic Chemistry**. 2. ed. Boston: Willard Grant Press, 1982.

FIRMO, W. C. A. Contexto histórico, uso popular, e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos Pesquisa**, São Luís, v. 18, n. 1, p. 90-95, 2011.

FRIEDRICH, A. W. Control of hospital acquired infections and antimicrobial resistance in Europe: the way to go. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, [s.l.], v. 169, n. 1, p. 25-30, 2019.

FUMAGALI, E. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

GARCÍA-GARCÍA, R. M.; PALOU-GARCÍA, E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. **Temas selectos de ingeniería de alimentos**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 41-51, 2008.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**, [s.l.], v. 2, n. 3, não p., 2009.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural products reports**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 263-277, 2004.

GIORDANI, M. A. *et al.* Hydroethanolic extract of the inner stem bark of *Cedrela odorata* has low toxicity and reduces hyperglycemia induced by an overload of sucrose and glucose. **Journal of ethnopharmacology**, [s.l.], v. 162, n. 1, p. 352-361, 2015.

GOMES, E. C. *et al.* Plantas da caatinga de uso terapêutico: levantamento etnobotânico. **Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia**, [s.l.], v. 5, n. 2, não p., 2008.

GÓMEZ-MALDONADO, C. A. **Actividad biológica de *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) e identificación de sus metabolitos secundarios**. Tese (Doutorado) – Instituto en Ciencias Biológicas-Licenciatura en Biología. UNICACH, Chiapas, México, 2014.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**. [s.l.], v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GUSTAFSON, J. E. *et al.* Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in applied microbiology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 194-198, 1998.

GUTIÉRREZ, A. G. *Staphylococcus*: y las ramificaciones de un racimo. **Infectio**, [s.l.], v. 10, n. 3, não p., 2011.

HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 427-33, 1983.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 55, n. 1, p. 481-504, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical pharmacology**, [s.l.], v. 32, n. 7, p. 1141-1148, 1983.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HILL, R. A.; CONNOLLY, J. D. Triterpenoids. **Natural Products Reports**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 90–122, 2017.

HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [s.l.], v. 40, n. 1, p. 135-136, 1997.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**. Bristol, UK, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HUECK, K. As florestas da América do Sul: Ecologia, composição e importância econômica. São Paulo: EDUNB, 1966.

JAKIEMIU, E. A. R. Study of composition and yield of *Thymus vulgaris* L. oil essential. **Semina: ciências Agrárias**. [s.l.], v. 31, n. 3, p. 683-688, 2010.

JORGE, R. M. *et al.* Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

KALMEIJER, M. D. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Is a major risk factor for surgical-site infections in orthopedic surgery. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [s.l.], v. 21, n. 5, p. 319-323, 2000.

KIPASSA, N. T. Limonoids from the stem bark of *Cedrela odorata*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 69, n. 8, p. 1782-1787, 2008.

KONEMAN, E. W. *et al.* Diagnóstico microbiológico: texto e atlas em cor. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KUMAR, A. S. *et al.* Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesiapopulnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 13-16, 2009.

LIMA, D. C. A. **Estudo comparativo da atividade antioxidante de plantas medicinais da caatinga utilizadas como antiinflamatórias**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

LIMA, E. de O. *et al.* *Schinus terebenthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 16, n. 7-8, p. 83-85, 2013.

LIMA, M. F. P. *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares–Revisão de Literatura. **Revista Uningá Review**, [s.l.], v. 21, n. 1, não p., 2015.

LIVERMORE, D. M. B-lactamase in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbial Review**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 557-584, 1995.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of clinical investigation**, [s.l.], v. 111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.

MACIEL, M. A. P.; PINTO, A. C.; VIEGA JÚNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIYO, Z. C. *et al.* Constituintes fitoquímicos e atividade antimicrobiana de extratos foliares de três espécies de plantas de amaranto. **Revista Africana de Biotecnologia**. [s.l.], v. 9, n. 21, p. 3178-3182, 2010.

MALACRIDA, C. R; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MARINHO, D. S. **Vancomicina, estudo de utilização com ênfase em suas reações adversas**. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2005.

MARISCAL-LUCERO, S. Del R. *et al.* Evaluación de fenoles y limonoides en hojas de *Cedrela odorata* (Meliaceae) de una plantación experimental establecida em Tezonapa Vera Cruz, México. **Revista de Biología Tropical**, Ciudad de México, v. 63, n. 2, p. 545-558, 2015.

MARQUES, M. B. *et al.* Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. [s.l.], v. 41, n. 5, p. 881-885, 1997.

MELO, A. F. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro de um extrato de *Anacardium occidentale* L. contra espécies de *Streptococcus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 202-205, 2006.

MELO, E. de A. *et al.* Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Food Science and Technology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

MELO, J. G. *et al.* Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**. [s.l.], v. 15, n. 1, p. 8534-8542, 2010.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s.l.], v. 39, n. 2, p. 147-150. 2007.

MENEZES, E. A. *et al.* Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edilson Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza-CE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, [s.l.], v. 36, n. 4, p. 209-12. 2004.

MICHELIN, D. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev Bras Farmacogn**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 316-20, 2005.

MONTAGNER, C. **Atividade antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas), e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOULAY, S. *et al.* Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index. **Int J Pharm Pharm Sci**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 121-124, 2014.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. Vol. 6. São Paulo: Elsevier, 2009.

MUROI, H.; KUBO, I. Bactericidal effects of anacardic acid and totarol on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, [s.l.], v. 58, n. 10, p. 1925–1926, 1994.

NASCIMENTO, G. G. F. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p. 247-256. 2000.

NOGUEIRA, P. A. D. Resíduos madeireiros de *Cedrela odorata* L. de demolição: investigação fitoquímica e atividade antifúngica. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2018. Disponível em: [https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/7021/5/Disserta%c3%a7%c3%a3o\\_PauloNogueira\\_PPGQ.pdf](https://tede.ufam.edu.br/bitstream/tede/7021/5/Disserta%c3%a7%c3%a3o_PauloNogueira_PPGQ.pdf). Acesso em: 22 ago. 2019.

OLIVEIRA, A. C. D. *et al.* Os dez anos da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e os principais entraves da cadeia produtiva de extratos vegetais e medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Fitos**. [s.l.], v. 10, n. 2, não p., 2016.

OLIVEIRA, A. O. Epidemiologia da infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva. **Revista Panamericana de Infectologia**, [s.l.], v.11, n. 2, p. 32-37, 2009.

OLIVEIRA, S. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana de novas tiazolidinas e imidazolidinas**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

OSBURNE, M. S. *et al.* In Vitro Time-kill Activities of Rifalazil, Alone and in Combination with Vancomycin, against Logarithmic and Stationary Cultures of *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Antibiotics**, [s.l.], v. 59, n. 2, p. 80–85. 2006.

PADILHA, I. Q. M. *et al.* Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir. From Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 45-47, 2010.

PASSOS, M. A. A. *et al.* Luz, substrato e temperatura na germinação de sementes de cedro-vermelho. **Notas Científicas Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 281-284, 2008.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. *et al.* Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

PEREIRA JÚNIOR, O. L. *et al.* Atividade biológica de um novo Triterpeno isolado de *Guareacannata* (Meliaceae). **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 23, n. 2-3, p. 173-176, 1993.

PEREIRA, R. S. *et al.* Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection. **Revista de Saúde Pública**. [s.l.], v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PEREIRA, R. J; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, [s.l.], v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PETERSEN, P. J. *et al.* In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 57, n. 3, p. 573-6, 2006.

PINHO, L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**. [s.l.], v. 42, n. 2, não p., 2011.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PORTO, R. G. C. L. **Influência do estágio de maturação no teor de compostos bioativos e atividade antioxidante no cajuí (*Anacardium humile* St. Hill) e castanhola (*Terminaliacatappa* L.)**. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2014.

RAMALHO, C. I. *et al.* Flora arbóreo-arbustiva em áreas de caatinga no semiárido baiano, Brasil. **RevistaCaatinga**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 182-190, 2009.

RAND, K. H. *et al.* Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 613–615, 1993.

RASHED, K. Hepatoprotective effect from *Cedrela odorata* and phytochemical profile. **Journal of Pharmaceutical and Cosmetic Sciences**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 45-52, 2013.

RENGIFO, L. S. **Contribución de La Etnomedicina plantas medicinales a la salud de La población em La Amazonía**. Lima: Instituto de Investigación para La Amazonia Peruana (IIAP), 2010.

RIBEIRO, C. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na Medicina popular da Amazônia**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

RIBEIRO, D. A. *et al.* Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Fortaleza, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014.

RICARDO, S. B. Emergência de *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente na Comunidade. **Prática Hospitalar**, [s.l.], v. 34, n. 1, p. 131-134. 2004.

RIZZINI, C. T. **Tratado de fitogeografia do Brasil**. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1997.

ROCHA, J. J. M.; BARATA, L. E. S.; PEREIRA, V. H. Estudo do extrato etanólico de *Cedrella odorata* L. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA MADEIRA, 2., 2015, Minas Gerais. **Anais [...]**. Belo Horizonte: EdUFMG, 2015. não p.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana**: interpretando o Antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005.

SANHEUZA, L. *et al.* Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **PLoS Online**. [s.l.], v. 12, n. 2, e0172273, 2017.

SALES, G. M.; SALVADOR, M. J. Óleo essencial de *Campomanesia guazumifolia* e de *Campomanesia neriiflora* (Myrtaceae): perfil químico por CG-MS e avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e do efeito na dinâmica da formação da placa bacteriana. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**. Campinas, v. 1, n. 26, p. 1, 2018. Disponível em: <https://econtents.bc.unicamp.br/eventos/index.php/pibic/article/view/523/513>. Acesso em: 25 out. 2019.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: Um estudo de revisão. **Estação Científica**. [s.l.], v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia**: da planta ao medicamento, 5. ed. Porto Alegre: Editora Universitária/UFRGS/UFSC, 2004. p. 615–656.

SARAIVA, A. M. *et al.* Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 15, n. 2, p. 199-207. 2013.

SARTO, M. P. M. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais. **Revista UNINGÁ Review**, [s.l.], v. 20, n. 1, não p., 2014.

SATO, Y. *et al.* Extraction and purification of effective antimicrobial constituents of *Terminalia chebula* RETS. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biological and pharmaceutical bulletin**, [s.l.], v. 20, n. 4, p. 401-404, 1997.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**. [s.l.], v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SHELDON, A. T. Antibiotic resistance: a survival strategy. **Clinical Laboratory Science**, [s.l.], v. 18, n. 3, p. 170, 2005.

SILVA, S. M. P. de M. **Potencial antibacteriano e modulador de resistência a drogas de extratos e constituintes de algas marinhas em *Staphylococcus aureus***. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/3653/1/arquivototal.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2019.

SILVA, A. C. O. da; ALBUQUERQUE, U. P. de. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta botânica brasílica**, [s.l.], v. 19, n. 1, p. 17-26, 2005.

SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero *Colletotrichum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

SILVA, C. de B. *et al.* Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 63-66, 2008.

SILVA, S. G.; NUNOMURA, R. de C. S.; NUNOMURA, S. M. Limonoides isolados dos frutos de *Carapaguianensis* Aublet (Meliaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 10, p. 1936-1939, 2012.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

SINGH, K. V.; SHUKLA, N. P. **Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract**. 1984. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301467312>. Acesso em: 12 set. 2019.

SOARES, M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s.l.], v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOUSA, C. M. de M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**. Goiás, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, C. M. M. *et al.* Fénois Totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-155, 2007.

SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

STERN, J. Lewis *et al.* Phlorotannin-protein interactions. **Journal of chemical ecology**, [s.l.], v. 22, n. 10, p. 1877-1899, 1996.

TAMARIZ ORTIZ, J. H. Resistência a clindamicina inducida por eritromicina em *Staphylococcus aureus* aislados de treshospitales de Lima, Perú. **Acta Médica Peruana**, Lima, v. 26, n. 1, p. 12-16, 2009.

TAMOKOU, J. D. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract, fractions and compounds from stem bark of *Albizia adianthifolia* (Mimosoideae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 12, n. 1, p. 99, 2012.

TANAKA, J. C. *et al.* Chemical constituents of *Lueheadivaricata* Mart.(Tiliaceae). **Química Nova**, [s.l.], v. 1, n. 1, não p., 2005.

TAVARES, W. B. Bactérias gran-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, v. 33, n. 3, não p., 2000.

TERRAS, F. R. G. *et al.* Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oil seed rape S. albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 103, n. 4, p. 1311-1319, 1993.

TINTINO, S. R. *et al.* Atividade moduladora de extratos etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* sobre drogas antimicrobianas. **Revista Brasileira de Biociências**, [s.l.], v. 11, n. 2, não p., 2013.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. de L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

TONG, W. *et al.* In vitro activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 28, n. 5, p. 454-6, 2006.

TORSSELL, K. B. G. **Natural product chemistry: a mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism**. Chichester, UK: Wiley, 1983.

- TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caixias do Sul, Caixias do Sul, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ucs.br/xmlui/bitstream/handle/11338/564/Dissertacao%20Cristiane%20Menegotto%20Toscan.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 out. 2019.
- VARELA, A. V. Evaluación de la resistencia a los antimicrobianos por el sistema DIRAMIC. **Revista Panamericana de Infectología**, [s.l.], v. 7, n. 4, p. 28-32, 2005.
- VERDI, L. G. Gênero *Baccharis* (*Asteraceae*): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.
- VEIGA JUNIOR, V. F. *et al.* Plantas medicinais: cura segura?. **Química nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- VICTOR, P. **Plantas medicinais: comparação da flora de quatro municípios de Pernambuco**. Monografia (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1990.
- VILELA, J. D. Mummification and medicine in ancient Egypt. **Revista paulista de medicina**, São Paulo, v. 89, n. 5-6, p. 115-124, 1977.
- VIRTUOSO, S. *et al.* Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythina velutina* Willd. *Fabaceae* (*Leguminosae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.
- VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira Fruticultura**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011.
- WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.
- WHITE, R. L. *et al.* Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 40, n. 8, p. 1914-8, 1996.
- WHO. **Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices [GACP] for medicinal plants**. Geneva: WHO, 2003.
- ZAGO, J. A. A. *et al.* Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista brasileira de farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.
- ZHANG, Y.; LEWIS, K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiology Letters**. [s.l.], v. 149, n. 1, p. 59-64, 1997.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. E. B. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.