



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

ALLAN JONATHAN CHERNICHARRO CORRÊA

CONTRIBUIÇÃO DO CONHECIMENTO POPULAR PARA A DESCOBERTA DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

RECIFE
2018

ALLAN JONATHAN CHERNICHARRO CORRÊA

CONTRIBUIÇÃO DO CONHECIMENTO POPULAR PARA A DESCOBERTA DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Co-Orientador: Prof. Dr. Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho

RECIFE

2018

.
.
Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C824c Corrêa, Allan Jonathan Chernichiarro.
 Contribuição do conhecimento popular para a descoberta de novos
 antimicrobianos / Allan Jonathan Chernichiarro Corrêa. – 2018.
 157 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientadora: Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.
 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2018.

 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Plantas medicinais. 2. Etnofarmacologia. 3. Farmacognosia. 4.
 Lippia origanoides. 5. Farmacorresistência bacteriana múltipla. I. Amorim,
 Elba Lúcia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-225)

ALLAN JONATHAN CHERNICHARRO CORRÊA

**CONTRIBUIÇÃO DO CONHECIMENTO POPULAR PARA A DESCOBERTA DE
NOVOS ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 28 / 02 / 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ivone Antônia de Souza (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sebastião José de Melo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Norma Buarque de Gusmão (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cláudia Sampaio de Andrade Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

A minha mãe, pessoa que sempre esteve perto de mim, preocupada com minhas dores de cabeça quando algo dava errado no transcorrer da tese, feliz em cada resultado novo e promissor encontrado e que ao longo da vida, me deu toda a confiança e tranquilidade para chegar onde estou hoje.

Ao meu irmão, por ser a figura masculina em minha evolução como homem, pessoa que me espelho em varias situações e a quem tenho um respeito enorme.

A minha mulher, pelo companheirismo, respeito, grande amor e dedicação em todos os momentos pessoais e profissionais.

A querida filha Giovanna, pois chegou em minha vida para dar um sentido, para me deixar mais focado em dar a ela a melhor educação e valores para que ela consiga conquistar seus objetivos de forma lícita.

Aos meus sobrinhos, Henrique, Pedro e Leozinho, que são o futuro da família e sirvo de exemplo para que lutem por tudo que desejem, pois nada na vida cairá em suas mãos sem esforço.

A todos os meus amigos, como Klayson, Neto, Leozinho, Anderson, Filipe, Vitor, Katyanne, Pericles, Isaac e todos aqueles que não citei aqui, mas que além de amar muito, sempre confiaram em mim e me elevavam a um patamar que, certamente, nunca estive.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao longo de minha vida acadêmica, sempre tive o pensamento que as coisas aconteciam comigo por sorte, porque eu sempre estive no local certo e na hora certa. Mas duas “pessoas” me fizeram entender que, na verdade, tenho muita capacidade, potencial de crescer e se quiser, basto ter mais foco nas minhas atividades.

O primeiro é Deus, pois em vários momentos de reflexão sobre desmotivações ou frustrações com situações rotineiras da vida acadêmica, Ele sempre colocou pessoas boas em minha presença, bons pensamentos e novas aspirações em minha mente.

A outra é minha orientadora, Professora Elba ou “Profa”, que é a forma carinhosa que a chamo. Certamente a pessoa humana mais importante para chegar nesta posição que estou hoje. Se fosse eleger uma palavra para definir nossa relação, escolheria CONFIANÇA! Confiança minha em ter uma orientadora que sempre esteve presente para tirar todas as dúvidas sobre o andamento do projeto e a confiança que ela teve em mim ao me aceitar para fazer parte da FAMILIA LAPRONAT, nosso querido laboratório. Ela costuma dizer que todos os alunos precisam deixar algo de útil no laboratório e espero ter contribuído, de alguma forma, para que outros alunos possam ser formados por esta profissional ética, inteligente e competente.

Preciso agradecer muito a toda equipe do Laboratório, uma família que tenho fora de casa. Todos sempre se mostraram solícitos às dúvidas que tinha, complicações com experimentos, escrita de artigos, qualificação, tese. Como não falar de Bruno e seu jeito cauteloso, Paty, sua calma e coerência que são peculiares, Jeninha e sua capacidade de solucionar qualquer problema, sempre disponível para todos, Thiago, este é um caso a parte, pois suas ideias beneficiam a todos, muito criativo e de um coração enorme, além de todos os outros que sempre estiveram presentes também, como Valerium, Tadeu, Rebeca entre outros.

Professora Kêsia, o projeto não andaria sem suas orientações, pois toda a parte microbiológica foi em seu laboratório, uma mulher que admiro muito e que sempre esteve acompanhando minha carreira acadêmica, desde quando dava meus primeiros passos na Iniciação Científica. Mas não apenas ela eu tenho a agradecer, também a todos que compõem o Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ensaio Antimicrobianos: Rosilma, que junto com Professora Kêsia, me viu crescer na vida acadêmica; Maria Cláudia e suas visões sobre método de microdiluição e Vinicius com sua prontidão para ajudar no que fosse preciso.

Professora Cláudia tem uma parcela significativa nesta etapa de minha vida, tanto com os treinamentos em aparelhos de última geração que ela abriga em seu laboratório, quanto por deixar utiliza-los. HPTLC, MPLC, HPLC são apenas exemplos de equipamentos que compõem a infra-estrutura de pesquisa que ela dispõe e sempre me deixou muito a vontade para manuseá-los. Venho aqui agradecer a todos do Laboratório de Biofísica Química por estes momentos também.

Também agradeço a Gibson por interceder em minhas amostras junto ao Professor Norberto, que gentilmente disponibilizou o seu GC-MS para que pudéssemos finalizar a parte química do projeto.

Por último, agradeço a todos que direta ou indiretamente, fazem parte deste, tão suado trabalho de conclusão do doutorado, o que inclui minha família, que é a minha base.

*“A diversidade de moléculas encontradas em plantas faz das
mesmas promissoras fontes de novos agentes antimicrobianos
ou de modificadores de resistência antibiótica”
(COUTINHO et al., 2008)*

RESUMO

A ciência vem definindo algumas estratégias, não somente para buscar por novas moléculas ativas, mas também para descobrir substâncias que ajam em conjunto com os antibióticos já disponíveis no mercado. O presente trabalho buscou estudar 22 espécies vegetais nativas da Caatinga e avaliou inicialmente a composição química e atividade antimicrobiana, para selecionar uma espécie a fim de realizar estudo de modulação com eritromicina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* multiressistentes. Foram obtidos os extratos hidroetanólicos e submetidos a triagem fitoquímica por High-Performance Thin-layer Chromatography (HPTLC); doseamento de compostos fenólicos e ensaios antimicrobianos (difusão em disco de papel e determinação de Concentração Inibitória Mínima - CIM). Com o melhor extrato foi realizado o fracionamento e as frações foram submetidas a triagem fitoquímica por HPTLC, CIM (frente a cepas de isolados clínicos), bioautografia, separação por Medium-Pressure Liquid Chromatography (MPLC), caracterização química por Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS) e método de “Checkerboard” para avaliar a interação das frações com a eritromicina. A triagem fitoquímica mostrou a presença de compostos fenólicos, derivados antracênicos e saponinas em todos os extratos. *Myracrodruon urundeuva* foi a espécie que apresentou maior teor de fenóis totais, *Anacardium occidentale* maior teor de taninos e *Erythrina velutina* maior teor de flavonoides. *Lippia origanoides* foi a espécie selecionada e sua fração acetato de etila mostrou melhor atividade que o extrato bruto frente a *S. aureus* multirresistentes. A partir desta, uma nova fração foi obtida por MPLC, a qual apresentou efeito sinérgico parcial ou indiferente com a eritromicina pelo método de “checkerboard”. Espécies vegetais, que outrora se mostravam ótimos recursos apenas como fontes de novas moléculas ativas, hoje podem contribuir na associação com antibióticos consagrados para os quais surgiram cepas resistentes e que assim poderão ser reinseridos no acervo terapêutico.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Etnofarmacologia. Farmacognosia. *Lippia origanoides*. Farmacorresistência bacteriana múltipla.

ABSTRACT

Science has been defining some strategies, not only to search for new active molecules, but also to discover what is happening in conjunction with the antibiotics already available in the market. The study investigated 22 plant species of Caatinga and evaluated the chemistry and antimicrobial activity, to mark a kind of control of the development of the modulation with erythromycin against strains of multiresistant *Staphylococcus aureus*. The hydroethanolic extracts were studied and submitted to phytochemical screening by high performance thin layer chromatography (HPTLC); Assay of phenolic compounds and antimicrobial assays (paper disk diffusion and Minimum Inhibitory Concentration dosage - MIC). With the objective of extraction and fractionation were subjected to a phytochemical screening by HPTLC, MIC (against clinical isolates), bioautography, separation by Liquid Chromatography to Medium Pressure (MPLC), chemical characterization by Gas Chromatography - Mass Spectrometry (GC-MS) and "Tray" method to evaluate the interaction of fractions with erythromycin. Phytochemical screening showed the presence of phenolic compounds, anthracene derivatives and saponins in all extracts. *Myracrodruon urundeuva* was one of the largest phosphorus theorists, *Anacardium occidentale* higher tannin content and *Erythrina velutina* higher flavonoid content. *Lippia origanoides* was a selected species and its ethyl acetate fraction, which is the most effective extractive activity against multiresistant *S. aureus*. From this, a new fraction was made by MPLC, a phenomenon of partial or synergistic effect with an erythromycin mechanism by the "checkerboard" method. Plant species, once once indebted as the sources of new active molecules, today can be considered as consecrated associations for those who have emerged and resist and are thus reinserted into the therapeutic collection.

Keywords: Medicinal plants. Ethnopharmacology. pharmacognosy. *Lippia origanoides*. Drug resistance, multiple, bacterial.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mecanismos de ação dos antibióticos	28
Figura 2 -	(A) Morfologia do <i>Staphylococcus aureus</i> em microscopia eletrônica e (B) <i>Staphylococcus aureus</i> corados pela técnica de Gram.	30
Figura 3 -	(A) Representação esquemática do teste epsilométrico (E-test) entre duas substâncias antimicrobianas. (B) Ilustração do teste epsilométrico (E-test) após a determinação de sinergismo entre duas drogas antimicrobianas.	42
Figura 4 -	Esquema de como se apresenta a placa de microtitulação no método checkerboard	43
Figura 5 -	Fluxograma da etapa 1, intitulada de “Seleção das Espécies e Bioprospecção”	47
Figura 6 -	Fluxograma da etapa 2, intitulada de “Espécie alvo”	56
Figura 7 -	(A) Visão geral do arbusto alecrim-de-caboclo (<i>Lippia origanoides</i> Kunth) e detalhe das folhas e flores (B)	56
Figura 8 -	(A) Coluna Filtrante com topo-sólido já adicionado à sílica na coluna e início da partição com o hexano (B)	57
Figura 9 -	Módulos CAMAG HPTLC (A); CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (B); CAMAG Automatic Development Chamber ADC2 (C); CAMAG TLC Visualizer (D).	58
Figura 10 -	Fluxograma da etapa 3, intitulada de “Fração alvo”	59
Figura 11 -	Cromatograma de caracterização para compostos fenólicos. Eluente: Acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5); Revelador: NEU	66
Figura 12 -	(A) curva de calibração construída com ácido tânico (0,5-10 µg/mL) usada para quantificar os fenóis totais e taninos; (b) curva de calibração construída com rutina (0,5-20,0 µg/mL) usada para quantificar os flavonoides.	67
Figura 13 -	Resultado da placa de atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos frente a <i>Mycobacterium smegmatis</i> . a) <i>Anadenanthera colubrina</i> (23,3 mm), b) <i>Maytenus rigida</i> (18,0 mm), c) <i>Myracrodruon urundeuva</i> (17 mm), d) <i>Anacardium occidentale</i> (16 mm).	73
Figura 14 -	Placas cromatográficas de compostos fenólicos, revelada com Reagente NEU (A) monoterpene, revelada com vanilina sulfurica (B) e Triterpenos e esteroides, revelado com Lieberman-Burchard (C) do extrato bruto das folhas de <i>Lippia origanoides</i> Kunth e suas frações.	84
Figura 15 -	Placa cromatográfica da fração acetato de etila de <i>Lippia origanoides</i> com sistema clorofórmio:metanol (95:5) em revelação física de lâmpada	88

uv254nm, uv365nm e revelação bioautográfica da cepa 728 de *Staphylococcus aureus* multirresistente.

- Figura 16** - Placa cromatográfica da fração acetato de etila de *Lippia origanoides* com sistema clorofórmio:metanol (90:10) em revelação física de lâmpada uv254nm, uv365nm e revelação bioautográfica da cepa 728 de *Staphylococcus aureus* multirresistente. 88
- Figura 17** - Cromatograma da evolução na Cromatografia Líquida de Média Pressão para a fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth. 89
- Figura 18** - Cromatoplasmas de cromatografia em camada delgada dos 22 tubos referentes a fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth após separação por cromatografia líquida de média pressão utilizando revelação física com lâmpada de uv254 (A) e uv365 (B). 90
- Figura 19** - Placa da combinação entre a subfração F_A da fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth e Eritromicina frente a cepa de *Staphylococcus aureus* multirresistente (UFPEDA 700) pelo método de Checkerboard 93
- Figura 20** - Placa da combinação entre a subfração F_A da fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth e Eritromicina frente a cepa *Staphylococcus aureus* multirresistente (UFPEDA 728) pelo método de Checkerboard 94
- Figura 21** - Placa da combinação entre a subfração F_A da fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth e Eritromicina frente a cepa *Staphylococcus aureus* multirresistente (UFPEDA 732) pelo método de Checkerboard 94
- Figura 22** - Estruturas químicas de compostos em destaque encontrados na subfração F_A da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas. 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Seleção de plantas pelo método etnodirigido na comunidade do Carão, Altinho-PE, citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias	49
Tabela 2 -	Sistemas de eluição, padrões e reveladores utilizados para evidenciar os principais grupos de metabólitos secundários segundo Wagner e Bladt (1996).	51
Tabela 3 -	Caracterização fitoquímica dos extratos de plantas selecionadas pelo método etnodirigido na comunidade do Carão, Altinho-PE, citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias.	64
Tabela 4 -	Matriz de comparação de similaridade fitoquímica entre as espécies citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias pela comunidade do Carão, Altinho-PE, a partir de triagem fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).	65
Tabela 5 -	Concentração de fenóis totais, taninos e flavonoides obtidos de extratos hidroalcoólico de plantas selecionadas pelo método etnodirigido na comunidade do Carão, Altinho-PE, citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias.	68
Tabela 6 -	Médias dos halos de inibição antimicrobiano (em mm) dos extratos hidroalcoólicos de plantas selecionadas pelo método etnodirigido na comunidade do Carão, Altinho-PE, citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias	72
Tabela 7 -	Concentrações inibitória mínima (µg/mL) dos extratos hidroalcoólicos de plantas citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias frente a micro-organismos Gram-positivos que mostraram halos >15mm no teste de disco	77
Tabela 8 -	Perfil de sensibilidade das cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados clínicos multirresistentes	79
Tabela 9 -	Concentrações inibitória mínima (µg/mL) dos extratos hidroalcoólicos de plantas citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados clínicos multirresistentes.	80
Tabela 10 -	Caracterização fitoquímica do extrato bruto da folha de <i>Lippia origanoides</i> Kunth e suas frações por HPTLC utilizando sistema eluente e reveladores específicos propostos por Wagner e Bladt (1995).	82
Tabela 11 -	Concentrações inibitória mínima (µg/mL) do extrato hidroalcoólicos da folha de <i>Lippia origanoides</i> e suas frações (hexano, acetato de etila e metanol) frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> isolados clínicos multirresistentes	85
Tabela 12 -	Concentrações inibitória mínima (µg/mL) das subfrações da fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Lippia origanoides</i> Kunth e	91

da Eritromicina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes.

- Tabela 13** - Interação da subfração F_A da fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth com Eritromicina utilizando método Checkerboard frente a cepas *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes 93
- Tabela 14** - Compostos identificados no cromatograma da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas 97
- Tabela 15** - Compostos identificados no cromatograma da subfração F_1 da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas 101
- Tabela 16** - Compostos identificados no cromatograma da subfração F_A da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas. 104
- Tabela 17** - Compostos identificados no cromatograma da subfração F_B da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas. 106
- Tabela 18** - Compostos identificados no cromatograma da subfração F_C da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas. 107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilo Álcool-ácido Resistente
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFU	Colony Forming Units
CIF	Concentração Inibitória Fracionaria
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsufóxido
E-TEST	Teste Epsilométrico
EAT	Equivalente de Ácido Tânico
ER	Equivalente de Rutina
GC-MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High-Performance Thin-Layer Chromatography
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionaria
MPLC	Medium-Pressure Liquid Chromatography
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
ORSA	Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus
PBP	Proteínas Ligadoras de Penicilina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVOS GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
3.1	ASPECTOS PARA SELEÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS.....	19
3.1.1	Abordagem etológica.....	19
3.1.2	Abordagem quimiossistemática.....	21
3.1.3	Ecologia química.....	22
3.1.4	Etnodirecionamento.....	24
3.2	PESQUISAS COM ANTIMICROBIANOS.....	25
3.2.1	Antibióticos.....	26
3.2.1.1	Características gerais.....	26
3.2.1.2	Classificação, estrutura química e mecanismo de ação.....	27
3.2.2	Resistência Microbiana.....	28
3.2.3	<i>Staphylococcus aureus</i> e suas principais resistências a antibióticos.....	29
3.2.4	Testes para Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	37
3.2.5	Interação entre Antimicrobianos.....	39
3.2.5.1	Método epsilométrico (E-test)	41
3.2.5.2	Método de Checkerboard.....	42
3.2.5.3	Método tempo-morte (Time-kill)	43
2.3	METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	SELEÇÃO DAS ESPÉCIES E BIOPROSPECÇÃO.....	47
4.1.1	Abordagem Etnodirigida para Seleção de Plantas Medicinais.....	47
4.1.2	Preparação e Caracterização Química dos Extratos.....	50
4.1.3	Determinação do Conteúdo Fenólico Total.....	52
4.1.4	Determinação do Conteúdo de Taninos	52
4.1.5	Determinação do Conteúdo de Flavonoides.....	53
4.1.6	Atividade Antimicrobiana.....	54
4.1.5.1	Micro-organismos Testes.....	54
4.1.5.2	Teste de Difusão em Agar (disco).	54
4.1.5.3	Teste de Microdiluição em Caldo.....	55

4.2	ESPÉCIE ALVO.....	56
4.2.1	Fracionamento (Coluna Filtrante)	57
4.2.2	Análise em HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography).....	57
4.3	FRAÇÃO ALVO.....	59
4.3.1	Bioautografia.....	59
4.3.2	MPLC (Medium-Pressure Liquid Chromatography).....	60
4.3.3	GC-MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry).....	60
4.3.4	Método de Microdiluição em caldo (Checkerboard).....	61
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
5.1	BIOPROSPECÇÃO.....	63
5.1.1	Caracterização Química dos Extratos.....	63
5.1.2	Determinação de Conteúdo Fenólico.....	66
5.1.3	Atividade Antimicrobiana.....	70
5.1.3.1	Teste de difusão em Agar (disco)	70
5.1.3.2	Concentração Inibitória Mínima – CIM	75
5.1.3.2.1	<i>Cepas sensíveis.....</i>	<i>76</i>
5.1.3.2.2	<i>Cepas <u>Staphylococcus aureus</u> multirresistentes.....</i>	<i>78</i>
5.2	ESPÉCIE ALVO	81
5.2.1	HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography).....	82
5.2.2	Concentração Inibitória Mínima (cepas <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistentes).....	85
5.3	FRAÇÃO ALVO.....	87
5.3.1	Bioautografia.....	87
5.3.2	MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography).....	89
5.3.3	Atividade Antimicrobiana e Modulatória.....	90
5.3.4	GCMS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry)	96
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	111
	REFERENCIAS.....	113
	APÊNDICE – Paper submetido para Journal of Ethnopharmacology.....	134
	ANEXO – Carta de submissao e anexos enviados à revista.....	156

1 INTRODUÇÃO

A história do uso de plantas medicinais tem mostrado que elas fazem parte da evolução humana e foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados pela humanidade. As antigas civilizações têm suas próprias referências históricas acerca das plantas medicinais e, muito antes de aparecer qualquer forma de escrita, o homem já utilizava as plantas e, entre estas, algumas como alimento e outras como remédio. O resgate do conhecimento e das práticas associadas a essas fontes vegetais são parte de uma importante estratégia articulada com a conservação da biodiversidade a descoberta de novos medicamentos e a melhoria da qualidade de vida de populações rurais do nordeste brasileiro, por exemplo.

A região Nordeste, por muito tempo esquecida por possuir grande parte de seu bioma formado por vegetação típica de clima seco, é o alvo de alguns pesquisadores interessados em avaliar os usos de plantas medicinais pelas populações locais. Essas pesquisas comprovam que esse bioma é possuidor de grande biodiversidade, com uma imensa quantidade de plantas usadas para fins medicinais e também mágico-religiosos (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; ALMEIDA et al., 2006; AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007; ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007).

Os estudos etnobotânicos têm apontado a importância de critérios culturais para selecionar espécies, em alguns casos essas classificações levam em consideração à eficácia no tratamento de doenças e a acessibilidade das plantas. Dentre as enfermidades mais comumente citadas pela população temos boqueira, bronquite, pneumonia, tuberculose, furúnculo, infecções em geral todas estas causadas por agentes infecciosos, principalmente bactérias e fungos. O tratamento se dá pela administração de drogas antimicrobianas com atividade para o micro-organismo em questão, porém o uso indiscriminado desses agentes tem desenvolvido grande resistência bacteriana (COHEN, 1992; NASCIMENTO et al., 2000).

Mesmo com algumas vantagens em utilizar este método de selecionar plantas como a riqueza experimental que possui os dados colhidos nessas comunidades, pois neles encontramos descobertas de terapia baseadas em evidências (CHOUDHARI et al., 2013), mas alguns percalços atingem os pesquisadores nesta abordagem etnodirigida: as coletas de dados superficiais ou com falhas e as interpretações equivocadas, como associação de doenças locais a doenças do sistema médico

tradicional de modo errôneo. Outra dificuldade pode ser a insuficiência no tamanho amostral impossibilitando inferências à população geral (BEIERSMANN et al., 2007; FERREIRA JÚNIOR et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2014). Neste contexto, deve-se considerar a dificuldade na interpretação das respostas do entrevistado no estudo etnobotânico e na definição das espécies à serem estudadas do ponto de vista biológico (FERREIRA JUNIOR et al., 2016).

Sabendo-se que a resposta inflamatória é a primeira defesa do organismo a um dano tecidual, proveniente de uma lesão física ou microbiana, então haverá melhora no quadro inflamatório causado por uma infecção, quando o patógeno for eliminado (COELHO-CASTELO et al., 2009; CABRAL, 2014). Isto pode ser um ponto de confusão na seleção de espécies, pois uma planta com indicação anti-inflamatória pode ter, na verdade, uma ação antimicrobiana. Consequentemente, espécies com citação anti-inflamatória também poderiam ser selecionadas para estudos de bioprospecção antimicrobiana.

Nos últimos anos, a indústria farmacêutica vem buscando novas drogas a partir do conhecimento dos recursos medicinais por comunidades tradicionais, estratégia que no Brasil, ainda é relativamente recente, devido, principalmente, à complexidade de separação e caracterização das diversas substâncias bioativas, constituindo um dos principais fatores limitantes para a descoberta de novos fármacos (GUERRA; NODARI, 2004; REIS et al., 2004).

Desde a publicação de trabalhos a partir da década de 1990, vem sendo constatado o valor de estudos etnodirigidos na investigação de compostos químicos de plantas com potencial atividade farmacológica, baseado no conhecimento popular acumulado sobre suas plantas para cura de doenças (ALBUQUERQUE; HANASAKI, 2006). Desde então, a principal estratégia das grandes companhias farmacêuticas é incentivar pesquisas com o intuito de descobrir novas drogas a partir de produtos naturais utilizados em comunidades tradicionais (SEIDL, 2002).

A busca por novas substâncias que possuam melhores atividades do que os antibióticos disponíveis no mercado ou que, ao menos, diminuam a resistência microbiana a eles são de suma importância para a saúde pública, uma vez que essas infecções são muito comuns e a cada dia que passa a quantidade de micro-organismos super resistentes aumenta e diminui mais o arsenal de antibióticos que tem-se a disposição.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química e atividade antimicrobiana de espécies vegetais nativas da Caatinga.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar as plantas do estudo que foram citadas para curar inflamações e/ou doenças causadas por fungos ou bactérias;
- Identificar os metabólitos secundários contidos nas espécies através de triagem fitoquímica por CCD (Cromatografia em Camada Delgada);
- Dosear a quantidade de fenóis totais e fenóis residuais (taninos) nos extratos das 22 espécies selecionadas;
- Dosear a quantidade de flavonoides nos extratos das 22 plantas selecionadas;
- Realizar uma triagem na atividade antimicrobiana das espécies de interesse;
- Determinar CIM dos extratos que obtiverem melhores resultados frente aos micro-organismos;
- Selecionar as melhores espécies e avaliar a atividade antimicrobiana frente a cepas isoladas clínicas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*;
- Escolher a melhor espécie de planta e fracionar seu extrato bruto;
- Realizar triagem fitoquímica com as frações obtidas;
- Avaliar a CIM das frações obtidas;
- Submeter a fração mais ativa a separação por MPLC (Medium-Pressure Liquid Chromatography);
- Caracterizar a fração e suas subfrações obtidas no MPLC;
- Determinar CIM das subfrações obtidas no MPLC;
- Realizar protocolo de modulação por Checkerboard frente aos micro-organismos resistentes a eritromicina.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ASPECTOS PARA SELEÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS

Segundo Araújo, Melo e Albuquerque (2014), o tema plantas medicinais é um dos mais estudados pelo fato de ser abordados por diversas disciplinas e áreas do conhecimento (farmácia, botânica, agronomia, etc), por tratar de um assunto vital, que é a saúde e servir como matéria prima para prospecção de produtos de interesse da área médica e farmacêutica, sendo um recurso bem difundido entre várias comunidades locais e indígenas ao redor do mundo.

No caso do Brasil, são conhecidas cerca de 43.020 espécies vegetais distribuídas em zonas biogeográficas (biomas), a exemplo da floresta amazônica, do Pantanal, do Cerrado, da Caatinga e da Mata Atlântica (BRASIL, 2018). Desta forma o Brasil torna-se um rico cenário para a estudo de plantas medicinais, ainda mais quando aliamos a esta diversidade uma enorme heterogeneidade cultural advinda especialmente da miscigenação de povos indígenas, africanos e europeus, os quais a princípio tinham modos diferenciados de utilizarem as plantas medicinais disponíveis.

Diante destes aspectos, uma das dificuldades atuais para o desenvolvimento de novos fármacos é a seleção adequada de espécies medicinais que tenham uma maior chance de sucesso na produção de novos medicamentos ou na descoberta de novas drogas, especialmente plantas endêmicas do Brasil (PINTO et al., 2002). Para esta escolha, o pesquisador dispõe de alguns modos de seleção fundamentados em critérios bem estabelecidos como a etologia, a quimiosistemática e o etnodirecionamento.

3.1.1. Abordagem etológica

Ao longo de centenas de milhares de anos da história humana, os homens também buscaram na natureza, respostas para seus próprios atos, individuais ou coletivos. Nesse sentido, a etologia humana é a ciência que procura observar o Comportamento Animal e pode muito bem ser definida como "um exercício da curiosidade humana na tentativa de compreensão da sua própria natureza animal." (DEL-CLARO, 2004). Etologia é o ramo da ciência que trata da abordagem biológica no estudo do comportamento animal e quando este estudo é dirigido aos animais de

produção ou cativeiro, nos referimos a Etologia Aplicada. Há diferentes abordagens no estudo do comportamento de animais de produção, dentre elas aquelas que buscam resolver problemas de ordem prática. Neste caso, apesar do foco ser o animal como unidade de produção, parte-se do princípio de respeito a sua história natural, tratando os problemas de forma multidisciplinar, combinando as perspectivas biológicas, econômicas e também farmacológicas (COSTA, 2018).

Com base nesses conceitos, a etologia vem sendo uma fonte de conhecimento para traçar critérios na seleção de plantas devido a zoofarmacognosia, ciência que se propõe a estudar o uso de metabólitos secundários de plantas e outras substâncias não nutricionais no combate ou controle de doenças por animais (DIAZ-CAYCEDO; PAYÁN-MADRIÑÁN; PÉREZ-ACOSTA, 2014). O termo "self-medication" se aplica na observação destes animais e a ele ainda pode ser subdividido em automedicação profilática, quando o animal se utiliza de plantas como uma forma de prevenir futuras enfermidades e ao termo automedicação terapêutica quando os animais doentes alteram o seu comportamento para medicar-se em resposta a infecção de um parasita por exemplo (ROODE; LEFEVRE; HUNTER, 2013).

Alguns estudos trabalham com a observação do comportamento animal para selecionar espécies de plantas medicinais, Krief et al., (2004) estudando chimpanzés, observaram a mudança na dieta alimentar e aspectos clínicos na busca de um novo antimalárico. O uso espontâneo de folhas de *Trichilia rubescens* por parte dos animais os fizeram escolher a espécie para estudos laboratoriais mais aprofundados e com bons resultados para a espécie. Carrai et al., (2003) estudaram e observaram a ingestão de plantas ricas em taninos por lêmures em período de lactação. A observação de 27 indivíduos, sugeriu aos autores que a ingestão destas espécies, ricas em taninos, foram associados ao aumento do peso corpóreo e a estimulação da secreção de leite, característica desse grupo de metabólito.

Desenvolver um estudo de bioprospecção a partir deste método de seleção é um desafio, pois esta abordagem etológica apresenta algumas desvantagens que dificultam a própria pesquisa, embora existam muitos exemplos de comportamentos sugestivos de automedicação. A observação torna-se muito difícil, principalmente quando estamos falando de uma automedicação profilática em que os animais estariam consumindo plantas como prevenção de alguma enfermidade ou para proteção de prole, porém mostra alguns pontos positivos também, uma vez que para

a procura de novas moléculas ou ações nunca antes descritas para uma espécie específica, haja vista que o suposto princípio ativo já estaria sendo experimentado num sistema vivo em que, dependendo da espécie observada, se assemelharia ao humano como chimpanzés, por exemplo (ROODE; LEFEVRE; HUNTER, 2013).

3.1.2 Abordagem quimiosistemática

A quimiosistemática - também conhecida como quimiotaxonomia, bioquímica sistemática ou taxonomia molecular - é um campo interdisciplinar de estudo que se utiliza do conhecimento dos constituintes químicos para entender a relação inter ou infraespecífica, do ponto de vista filogenético, de modo que a ocorrência de compostos comuns pode servir como marcadores para grupos taxonômicos em diferentes níveis, como famílias (CRAWFORD; GIANNASI, 1982).

Ao analisar alguns gêneros da família Anacardiaceae notamos que terpenos como o α pineno, β pineno e limoneno podem ser encontrados em diversas partes da planta. No caso de *Pistacia lentiscus* L, ocorre a presença de α pineno e limoneno nas suas partes aéreas (ZRIRA; ELAMRANI; BENJILALI, 2003) e em *Pistacia terebinthus* L., resultados semelhantes também foram encontrados de modo que α pineno e β pineno são os principais constituintes dos óleos obtidos de folhas e galhos desta espécie (USAI et al., 2006). No gênero *Schinus* estes compostos também estão presentes tanto nas folhas como nos frutos de *Schinus polygamus* (ERAZO et al., 2006), como no óleo de *Schinus areira* (SCRIVANTI; ZUNINO; ZYGADLO, 2003). Óleos obtidos dos frutos de manga (*Mangifera indica* L), tem como principais constituinte α -pineno (34.5%), sabinense (13.9%), β -pineno (12.6%) e limoneno (9.1%) (ANSARI et al., 2004).

Um exemplo bem conhecido é o caso do gênero *Taxus*, onde na espécie *Taxus brevifolia* é encontrado o composto paclitaxel, triterpeno poliidroxiado com atividade antineoplásica descrita por Rowinsky, Cazenave e Donehower (1990), porém para se obter 1 kg do composto, se faz necessário aproximadamente 10.000 kg da casca de *T. brevifolia*, o que corresponde, em média, a 3.000 árvores. A solução para este problema científico e ecológico se encontrou em uma outra espécie do mesmo gênero, *Taxus baccata*, que pode-se extrair de suas folhas o composto 10-desacetilbacatina-III que possui o mesmo esqueleto e funcionalidade do paclitaxel e o mesmo ainda podendo ser obtido por uma semisíntese de poucas etapas, não sendo

necessário abater as árvores devido as folhas serem uma fonte renovável (SOUZA, 2004).

Trabalhar com esta abordagem quimiosistemática já vem descobrindo as particularidades químicas de várias famílias e gêneros, mas ainda pode passar outros conhecimentos e descobertas nunca antes descritas. O apelo ecológico que este método possui, também, se torna uma vantagem importante, uma vez que o extrativismo de algumas espécies para obtenção de princípios ativos só tende a aumentar e encontrar espécie que pactuem geneticamente da mesma síntese do composto diminuiria esta extração exacerbada.

3.1.3. Ecologia química

Assim como a quimiosistemática, a ecologia química é uma área de pesquisa interdisciplinar que envolve especialmente conhecimentos de química e biologia, a qual detalha como mecanismos químicos, regulam a interação intra e interespecífica entre todos os tipos de organismos (MORI, 2013).

Um dos temas mais estudados na ecologia química é a relação das plantas com o ambiente onde elas ocorrem, especialmente a respeito da inter-relação plantas-insetos e da adaptação dos vegetais as condições climáticas e geográficas.

Alguns estudos de plantas da Caatinga, voltados especialmente as de uso medicinal, baseam-se em abordagens e teorias da ecologia química. Peixoto-Sobrinho et al. (2009), avaliou como os teores de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud. poderiam estar relacionados ao efeito de borda e a pluviosidade, em uma área de caatinga. Esta espécie tem uma importância local devido aos diversos usos medicinais, entre eles o uso como hipoglicemiantes em pessoas diabéticas (ALBUQUERQUE et al., 2007; AGRA et al., 2007). Neste estudo foi observado que de modo geral os indivíduos localizados à borda do fragmento - que recebem maior incidência luminosa - concentraram mais flavonoides do que os do interior da mata, contudo a disponibilidade de chuva parece não afetar na produção destes compostos.

Por outro lado, a disponibilidade de chuva afeta a produção de taninos em *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan, quando analisado o conteúdo destes compostos em cascas e folhas destas espécies,

onde cada uma destas espécies demonstraram diferentes estratégias adaptativas de acordo com o período de estiagem (MONTEIRO et al., 2006a).

No caso dos teores de taninos, estes não são afetados de modo significativo em indivíduos de *Spondias tuberosa* Arruda coletados em áreas que foram submetidas a diferentes influências antropogênicas, porém a ação antioxidante no sequestro de radicais livres desta espécie endêmica da Caatinga, que se destaca por sua importância alimentícia e medicinal para povos locais, foi influenciada pelo local de coleta (ARAÚJO et al., 2012).

A Caatinga e a Mata Atlântica serviram como cenários para testar hipóteses da ecologia química baseadas na defesa dos vegetais contra herbívoros, levando-se em consideração as plantas medicinais (ALENCAR et al., 2009; ALMEIDA; AMORIM; ALBUQUERQUE, 2011). Uma destas hipóteses foi proposta inicialmente por Feeny (1976), onde ele acredita que plantas "aparentes" ou plantas de ciclo de vida longo, representadas especialmente por árvores, produzem mais compostos quantitativos, como compostos fenólicos, os quais dificultam a digestão dos herbívoros. Por outro lado, plantas "não-aparentes" ou de ciclo de vida curto, especialmente ervas, investem mais na produção de metabólitos qualitativos e que são mais tóxicos mesmo em pequena quantidade, como por exemplo alcaloides.

Caso esta hipótese seja aceita, o direcionamento para a busca de determinadas classes de compostos poderia ser dado pelo tipo de ciclo de vida das espécies. Contudo, Almeida et al. (2011) concluíram em seus estudos que, apesar desta hipótese parecer lógica para algumas regiões, na Caatinga e Mata Atlântica ela não se aplica pois os compostos qualitativos foram mais comuns em árvores da Caatinga, enquanto que na Mata Atlântica não houve diferença entre os hábitos a respeito dos compostos qualitativos, sendo a Caatinga um ambiente mais propício para busca de compostos quantitativos e a Mata Atlântica para compostos qualitativos, sendo estes resultados melhor explicados por fatores ecogeográficos.

Fica evidente que entender como fatores ecológicos agem na produção de metabólitos secundários, pode ser uma alternativa muito eficiente na busca de compostos bioativos, assim como em seu maior rendimento. Contudo é necessário um delineamento experimental bem elaborado uma vez que tentar analisar fatores ambientais de modo isolado, especialmente em ambientes naturais e não controlados

como em estufas ou casas de vegetação botânicas, torna-se um desafio nesse campo de pesquisa.

3.1.4. Etnodirecionamento

Vários são os métodos utilizados para se selecionar novas moléculas oriundas de plantas para a sua melhor compreensão biológica, farmacológica e química, algumas destas, já foram citadas acima como as abordagens etológica, quimiosistemática, ecologia química, porém um dos métodos mais utilizados baseia-se em estudos etnodirigidos, que buscam informações a partir do conhecimento de diferentes povos e etnias. Consiste na busca de espécies levando em consideração o conhecimento de grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso, valorizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito de seus recursos naturais e a aplicação que fazem deles em seus sistemas de saúde e doença (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Nesta perspectiva, Choudhari et al. (2013) avaliaram a atividade anti-inflamatória de *Tectaria cicutaria* (L) Copel. Philipp, planta da família Tectariaceae, conhecida popularmente na Índia por “Kukkutnakhi”, suas folhas e rizoma são utilizadas pela comunidade para vários males, incluindo distúrbios ginecológicos e condições inflamatórias. Nos seus estudos, os autores concluíram que a exploração do conhecimento popular para avaliação de plantas se torna uma alternativa real, já que devido ao exposto, conseguiram identificar compostos anti-inflamatórios a partir desta planta.

Buscando em seus estudos investigar o potencial antimicrobiano e comparar três grupos de espécies herbáceas escolhidas por métodos de seleção diferentes, um grupo aleatório, outro escolhido pelas espécies por possuírem alguma indicação farmacológica e outro grupo selecionado pela sua ação relatada pela comunidade para infecções causadas por fungos ou bactérias, Silva et al. (2013) identificaram que as plantas que foram indicadas pela população para esta finalidade, também foram as espécies que tiveram o maior percentual de atividade.

Escolher espécies por esta abordagem vem se tornando mais comum devido a alguns fatores como: tempo e baixo custo envolvidos na coleta dessas informações (MACIEL et al., 2002). É importante também não ignorar a riqueza experimental que possui as informações colhidas nessas comunidades, afinal de contas, neles

encontramos descobertas de terapia baseadas em evidências (CHOUDHARI et al., 2013).

Contudo alguns pontos merecem destaque quando o pesquisador desejar escolher este tipo de abordagem para a seleção de espécies medicinais. Apesar de mostrar eficiência frente a outros métodos de seleção, quando se trata de plantas para fins antitumorais, a abordagem randômica têm mostrado melhores resultados como relatado por Spjut (2005) (GYLLENHAAL et al., 2012), os quais mostraram que o alvo-terapêutico abordado pode interferir nesta eficiência. Outros aspectos como insuficiência no tamanho amostral de modo que inferências possam ser realizadas em relação a população, coleta de dados superficiais ou de modo falho, os quais levam a interpretações equivocadas, como por exemplo associação de doenças locais a doenças do sistema médico tradicional de modo errôneo, necessitando o pesquisador de treinamento apropriado (ALBUQUERQUE et al., 2014).

3.2. PESQUISAS COM ANTIMICROBIANOS

Durante várias décadas, a resistência microbiana tem sido uma ameaça crescente para o tratamento eficaz de uma gama cada vez maior de infecções causadas por bactérias, parasitas, vírus e fungos. Com 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, 2014a).

Este cenário torna-se mais alarmante quando analisamos dados emitidos pela Organização Mundial de Saúde, em que as infecções causam 25% das mortes em todo o mundo e 45% nos países subdesenvolvidos. Devido a isto, os antibióticos correspondem a 12% de todas as prescrições ambulatoriais, o que gera um gasto de 15% dos 100 bilhões de dólares pagos anualmente com medicamentos (WANNMACHER, 2004; WHO, 2011). Quando foca-se em dados mais específicos como infecções causadas no trato respiratório, observamos que 6,1% das mortes no mundo são devido a essas complicações microbianas (WHO, 2014b).

Devido aos dados citados e a urgência nesta batalha contra os micro-organismos, o foco dos pesquisadores vem mudando e se adaptando a realidade encontrada para este confronto, pois aliado a pesquisa por novas drogas antimicrobianas, os estudos voltam-se para às antigas classes de antibióticos, com

ação comprovada, mas cada vez menos utilizadas por causa das resistências dos micro-organismos a elas, por isto a importância de entender um pouco mais cada uma dessas classes existentes e um dos patógenos que mais sofreram ação de todas essas mutações que os deixaram mais resistentes a estes antibióticos, o *Staphylococcus aureus*.

3.2.1 Antibióticos

Os antibacterianos são substâncias de origem natural ou sintética, seletivamente capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de invasores externos, tais como fungos ou bactérias. Geralmente, são produzidos por micro-organismos responsáveis pela síntese total ou parcial da molécula. Os antibióticos sintetizados de forma parcial são chamados de semi-sintéticos e concluídos em laboratório. A maioria dos antibacterianos usados no tratamento clínico é produzido por bactérias do gênero *Streptomyces* e outros por fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium* (WALSH, 2003; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005a; MEDLEY, 2008).

3.2.1.1 Características gerais

O mecanismo de ação de um antimicrobiano inicia quando o mesmo atinge uma concentração ideal no local da infecção, atravessar, de forma ativa ou passiva, a parede celular e apresentar afinidade pelo sítio de ligação no interior da bactéria, permanecendo tempo suficiente para exercer sua atividade inibitória. Os antibióticos podem ter ação bactericida, matando os micro-organismos de forma direta, atuando em reações vitais para a célula infectante, ou apenas inibir o crescimento bacteriano por meio de uma ação bacteriostática, mantendo as bactérias em fase estacionária. Na bacteriostase, o hospedeiro aciona defesas próprias, como a fagocitose e a produção de anticorpos no controle ao micro-organismo invasor. Neste caso a inibição pode ser reversível, pois as bactérias podem continuar a produzir toxinas ou se tornarem resistentes ao medicamento se as defesas do hospedeiro não forem eficientes (KATZUNG, 2007; LAGO, 2011; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; PANKEY; SABATH, 2013; ENGLEBERG; DIRITA; DERMODY, 2013).

Os antibióticos ideais interferem na funcionalidade das bactérias sem comprometer as células do hospedeiro. Definem-se por várias características, tais

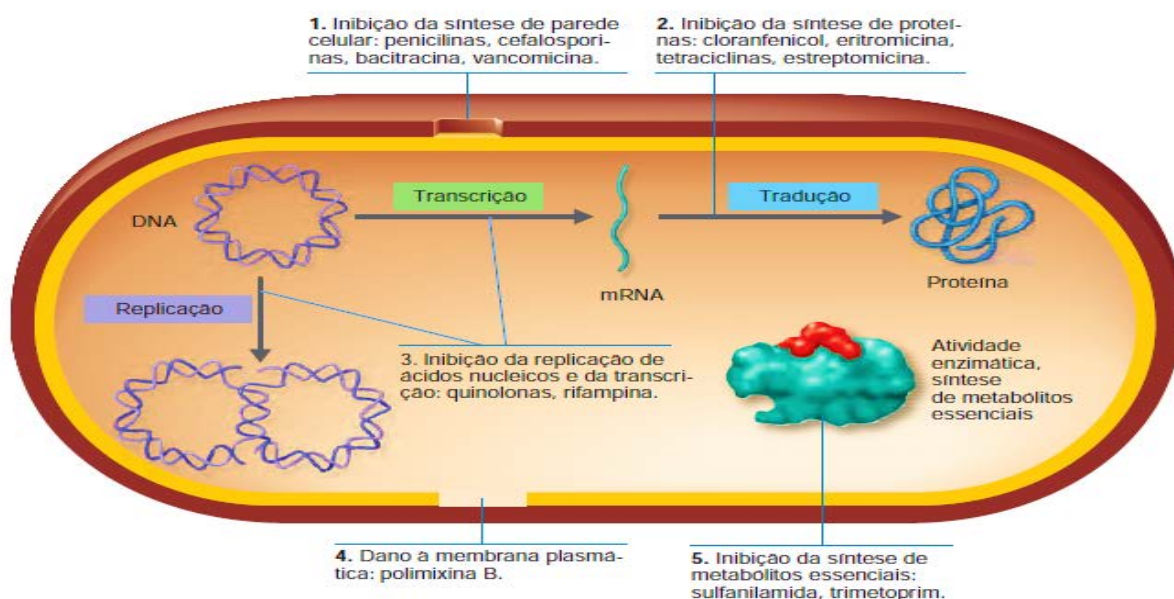
como, ação rápida e seletiva frente ao alvo, tendência bactericida, não afetam a microbiota normal, possuem baixos níveis de toxicidade, grande eficiência terapêutica, possuem poucas reações adversas, possibilitam várias vias de administração. Além disso, devem apresentar-se com boa capacidade de absorção, não importando a via, boa distribuição no local da infecção, não induzir resistências e possuir uma boa relação custo/eficácia. Contudo, dificilmente essas características conseguem ser obtidas em conjunto, devido as variações nas relações entre antibióticos e bactérias (KATZUNG, 2007; MEDLEY, 2008).

3.2.1.2 Classificação, estrutura química e mecanismo de ação

Os antibióticos naturais, juntamente com seus derivados semi-sintéticos, compreendem a maior parte dos antibióticos utilizados clinicamente e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos, estreptograminas, lincosaminas, cloranfenicol, etc. Os antibióticos de origem sintética são classificados como sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (ABRAHAM, 2003; PATRICK, 2005; PUPO et al., 2006).

De modo mais abrangente é mais comum classificar os antibióticos baseando-se no seu mecanismo de ação. Assim, são descritos em cinco principais grupos, tais como: inibidores da síntese da parede celular, inibidores da síntese ou promotores de danos à membrana plasmática, inibidores da síntese proteica nos ribossomos, inibidores da síntese de ácidos nucleicos e inibidores da síntese de metabólitos essenciais (Figura 1) (BRODY; LARNER; MINNEMAN, 1998; TENOVER, 2006; KATZUNG, 2007; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 1 – Mecanismos de ação dos antibióticos.



Fonte: Tortora, Funke e Case (2012)

3.2.2 Resistência Microbiana

A resistência bacteriana 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). 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 ele apresente atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese de parede celular bacteriana (LIVERMORE, 1995; OLIVEIRA, 2010).

No que diz respeito ao perfil de resistência bacteriana, uma nova realidade tem despertado interesse no meio científico nos últimos anos: a ocorrência de enterobactérias (*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Escherichia coli*, etc) que tornaram-se resistentes aos antibióticos de amplo espectro disponíveis através da produção de enzimas que inativam beta-lactâmicos ou carbapenêmicos (KOFTERIDIS et al., 2014; GANGCUANGCO et al., 2015; GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2015; GUO et al., 2015; VIAGGI et al., 2015; YOSHINO et al. 2015). As limitações terapêuticas no tratamento das bactérias Gram-negativas multidrogas resistentes, especialmente quando se trata das produtoras de carbapenemases, sugerem que o aumento na adesão às medidas de prevenção e programas de uso

racional de antibióticos são necessários para diminuir a transmissão e a seleção dos patógenos resistentes (PAIVA-JUNIOR, 2012).

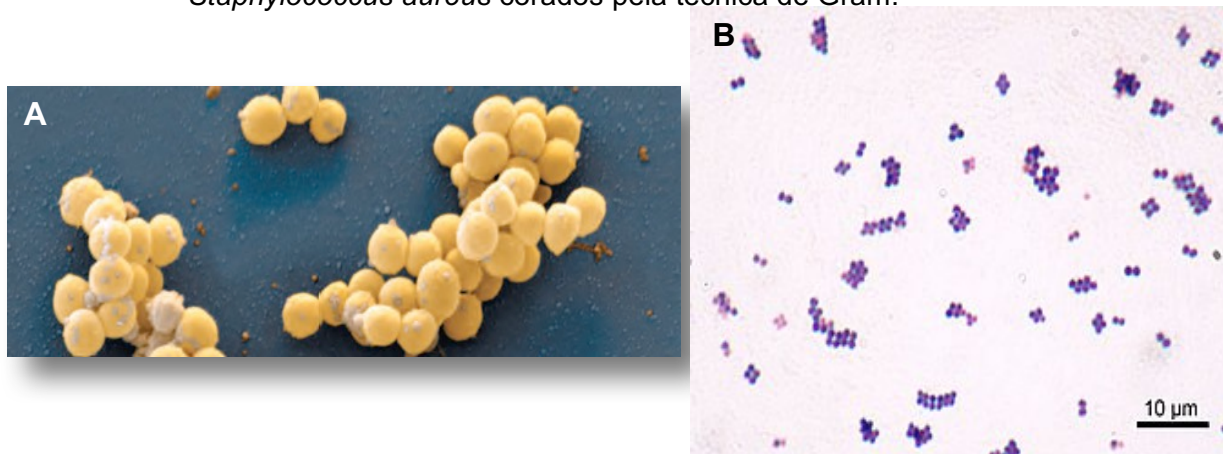
O crescente número de cepas bacterianas cada vez mais resistentes à quimioterapia disponível aumenta o tempo de internação, exige medicamentos caros de difícil acesso e aumenta a morbidade e mortalidade na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e nos serviços de saúde em geral (VARELA, 2005; OLIVEIRA, 2009). 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). Apesar dos avanços na terapia e cuidados de suporte, as UTI são muitas vezes o epicentro das infecções, principalmente por causa de sua população extremamente vulnerável e a utilização de múltiplos procedimentos invasivos (ORSINI et al., 2012).

Nesta perspectiva, a indústria farmacêutica tem incentivado pesquisas visando o desenvolvimento de novos antimicrobianos (WHO, 2014b). Até os anos 2000, as pesquisas nesta área eram realizadas utilizando-se da genômica em detrimento das advindas de produtos naturais, isto resultou em uma queda na descoberta de novos antibióticos aliado ao aumento da resistência bacteriana. Após este período, houve uma retomada, por parte da indústria, na busca de novos antimicrobianos utilizando como ferramenta produtos de origem natural (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

3.2.3 *Staphylococcus aureus* e suas principais resistências a antibióticos

A denominação *Staphylococcus aureus* deriva da palavra grega *staphylé*, que significa “cachos de uvas”, pois esses cocos Gram-positivos crescem em um padrão similar a um cacho de uvas, mas também podem aparecer como células isoladas, aos pares ou em cadeias curtas (Figura 2). São micro-organismos 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 variável de 18 a 40°C (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Figura 2 - (A) Morfologia do *Staphylococcus aureus* em microscopia eletrônica e (B) *Staphylococcus aureus* corados pela técnica de Gram.



Fonte: Tortora, Funke e Case (2012) (A) e Wikipedia.¹ (B)

As cepas de *S. aureus* crescem em meios comuns, caldo ou agar simples, pH=7, à temperatura ideal de 37°C e, após 18-24 horas de incubação as colônias formadas são arredondadas, lisas e brilhantes (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005a).

As colônias do *S. aureus* durante o crescimento produzem substâncias carotenóides, podendo variar a coloração desde o acinzentado até o amarelo-ouro, em que a pigmentação aumenta com o tempo de incubação prolongado e não chega a ser formada nos casos de crescimento em condições de anaerobiose ou na cultura em caldo (SANTOS et al., 2007).

Em placas de agar sangue, com frequência, desenvolve-se em torno das colônias formadas um halo de hemólise. O meio agar manitol salgado é seletivo para esta espécie, pois o *S. aureus* é capaz de fermentar o manitol, produzindo ácido láctico. Essa espécie também se desenvolve na presença de 7,5% de NaCl, que estimula a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie, pois o *S. aureus* é a única espécie encontrada no ser humano que produz esta enzima, sendo assim todas as outras espécies são classificadas como estafilococos coagulase-negativos (CASSETTARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2005b; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

¹ Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Staphylococcus_aureus_Gram.jpg. Acesso em fev. 2018.

O principal reservatório de *S. aureus* é o homem, podendo estar presente na microbiota natural das fossas nasais, representando, então, uma importante via de disseminação do micro-organismo, por meio dos profissionais da saúde no ambiente hospitalar (TELLAROLLI et al, 2003). Cerca de 50 % das pessoas sadias são portadoras de *S. aureus* nas fossas nasais e garganta (SILVA; GANDRA, 2004).

Staphylococcus aureus destaca-se como importante patógeno causador de infecção nosocomial, pois este micro-organismo é capaz de sobreviver e se multiplicar numa ampla variedade de ambientes. Dispõe de um conjunto de mecanismos de virulência e de grande versatilidade de estratégia patogênica. Adicionalmente, distingue-se por sua capacidade 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).

Também pode produzir um mucopolissacarídeo extracelular amorfo (*slime*), que permite a agregação bacteriana, levando à formação de um verdadeiro biofilme que favorece a colonização dessa bactéria em diversas superfícies não só no hospedeiro, mas também no ambiente. Essas colonizações podem favorecer a sua transmissão para o ser humano e para outras áreas (CHRISTENSEN; SIMPSON; BISNO, 1982).

Diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas relativamente benignas como foliculite simples, impetigo e furúnculos, até infecções sistêmicas potencialmente fatais podem ser produzidos por *Staphylococcus aureus*. Este micro-organismo é isolado com frequência de feridas cirúrgicas infectadas, que podem representar focos para o desenvolvimento de infecções sistêmicas. A broncopneumonia estafilocócica adquirida na comunidade é mais frequente em idosos e está associada à pneumonia viral como fator predisponente (KONEMAN et al, 2006). A pneumonia nosocomial produzida por *S. aureus* ocorre em casos de doença pulmonar obstrutiva crônica, intubação e aspiração. A bacteriemia causada por *S. aureus* pode colonizar sítios corpóreos distantes, originando endocardite, osteomielite, piodartrite e formação de abscessos metastáticos na pele, nos tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro. As doenças causadas por toxinas também apresentam amplo espectro de manifestações clínicas, como celulite, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico e intoxicação alimentar (KONEMAN et al, 2006).

A colonização da pele por essa bactéria ocorre provavelmente devido à sua capacidade de resistir a altas concentrações de sais e lipídios, e também por produzirem proteínas de superfície que se ligam à fibronectina, presente na superfície das células do hospedeiro (FLOCK et al, 1996).

Os principais fatores de virulência do *S. aureus* são os componentes da superfície celular, toxinas e enzimas. O *S. aureus* contém na estrutura de sua parede celular, polissacarídeos, proteínas antigênicas e outras moléculas importantes, por exemplo, o ácido tecóico, o glicanopeptídeo, a proteína A, além da presença de cápsula e de adesinas, as quais podem induzir uma resposta imunológica no hospedeiro (OLIVEIRA et al, 2001; LUTZ et al, 2003).

As toxinas produzidas pelo *S. aureus* são citotoxinas, superantígenos ou um terceiro tipo, que degrada moléculas de adesão das células epiteliais cutâneas. As citotoxinas mais conhecidas são a alfa-toxina e a leucocidina. A alfa-toxina apresenta a capacidade de formar poros na membrana celular dos leucócitos promovendo extravasamento do conteúdo celular e consequente morte da célula, além de ser capaz de lisar hemácias. A lesão celular causada pode promover a liberação de citocinas, que podem contribuir para o desenvolvimento do choque séptico. A leucocidina, assim denominada devido à sua capacidade de lisar leucócitos, é semelhante à alfa-toxina, neste sentido. Cerca de 90% das cepas de *S. aureus* isoladas de lesões dermonecroticas graves produzem leucocidina, o que reforça a sua participação na formação dessas lesões (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005b).

As toxinas com atividade de superantígeno são a Toxina-1 da Síndrome do Choque tóxico (TSST-1) e as enterotoxinas estafilocócicas (SE). As enterotoxinas são a causa direta da intoxicação alimentar estafilocócica. Estas toxinas, como superantígenos, estimulam os linfócitos T a liberar citocinas, as quais provocam o choque. As toxinas esfoliativas degradam as moléculas de adesão do epitélio cutâneo provocando a Síndrome da pele escaldada e o impetigo bolhoso, que consistem na separação entre epiderme e derme (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005b).

Dentre as enzimas extracelulares produzidas pelo *S. aureus*, a mais conhecida é a coagulase, a qual apresenta a capacidade de coagular o plasma, pois transforma protrombina em trombina que, por sua vez, ativa a formação de fibrina a partir do fibrinogênio. Outras enzimas incluem a catalase, desoxirribonucleases (DNase), hialuronidase, lipase, proteases e fibrinolisinase (TRABULSI; ALTERTHUM,

2005b). Colagenase, outra enzima produzida pelo *S. aureus*, produz liquefação do colágeno e contribui para a dispersão da infecção através dos tecidos (WALTER; HAMILTON; ISRAEL, 1981).

Antes dos antimicrobianos serem inseridos na prática clínica, a letalidade causada pela bacteriemia por *Staphylococcus aureus* era superior a 80%, e mais de 70% dos pacientes desenvolviam infecções metastáticas. Com a descoberta e utilização da penicilina no início da década de 1940, o prognóstico desses pacientes melhorou bastante. Contudo devido à utilização indiscriminada desta droga, dois anos mais tarde, foram relatadas as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina (LOWY, 2003; MARANAN et al., 1997).

Com a entrada da penicilina em uso clínico, *S. aureus* passou a desenvolver resistência a esse antibiótico β -lactâmico através da produção da β -lactamase (penicilinase), enzima capaz de hidrolizar o anel β -lactâmico da penicilina, tornando-a inativa (SANTOS et al, 2007).

No ano de 1946, nos Estados Unidos da América, cerca de 5% de estafilococos isolados de pacientes ou portadores eram resistentes à penicilina. Três anos depois no ano de 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). Até o ano de 2002, a maioria dos *S. aureus* que ocasionavam infecção ou simplesmente colonizavam adultos saudáveis era resistente à penicilina (OLIVEIRA; TOMASZ; DE LENCASTRE, 2002). Estas cepas apresentam como principal mecanismo a modificação das proteínas ligantes de penicilina (PBP's), sintetizadas pelo gene *mecA* (AARESTRUP et al., 2001).

Em 1960, após uma modificação estrutural na substância, foi criada uma droga do grupo das penicilinas, a metecilina, a primeira penicilina semi-sintética posta em uso clínico que não era susceptível à ação da β -lactamase (SANTOS et al., 2007). Com o uso intensivo das penicilinas semi-sintéticas, como a metecilina empregada na terapia antiestafilocócica, surgiram cepas resistentes a este antimicrobiano, denominadas MRSA (*Staphylococcus aureus* resistentes à metecilina), cujo padrão de resistência estende-se a outros antibióticos β -lactâmicos (VOSS et al., 1994).

Inicialmente, os *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) eram restritos a centros médicos de referência e hospitais, mas logo se alastraram para serviços e centros de saúde. No entanto, o MRSA não pode mais ser considerado um patógeno relacionado exclusivamente às infecções relacionadas aos serviços de saúde (FARR, 2004; OLIVEIRA; TOMASZ; DE LENCASTRE, 2002).

Casos de MRSA, até então considerado um patógeno hospitalar, começaram a ser observados em pacientes da comunidade (CAMRSA), sem os fatores de risco para aquisição do mesmo (REMONATTO et al, 2007). Estas cepas, não têm relação epidemiológica com os MRSA hospitalares (HAMRSA), no entanto infecções por CAMRSA vêm sendo reportadas em todo mundo desde a década de 1990, e descritos em várias regiões do globo, inclusive no Brasil (VANDENESCH et al, 2003; CHAMBERS, 2001).

Pacientes colonizados constituem a maior fonte de disseminação de MRSA para outros pacientes hospitalizados, sobretudo através das mãos e luvas dos profissionais de saúde, e muito interesse tem surgido a respeito do papel chave do portador do MRSA no controle eficiente deste micro-organismo. Profissionais de saúde colonizados constituem também um reservatório potencial de MRSA, mesmo quando transitoriamente colonizados (AMORIM et al, 2009).

Estudos genéticos demonstram que a atual prevalência de MRSA é resultado principalmente da dispersão de alguns clones, sendo descritos apenas cinco clones no mundo. Para a investigação dos surtos, podem ser utilizadas as caracterizações fenotípica e genotípica para a avaliação da disseminação das cepas (SANTOS et al, 2007).

O mecanismo de resistência à meticilina desenvolvido pelo *Staphylococcus aureus* está relacionado com a produção de uma proteína de parede celular, a PBP2a (FERREIRA; ÁVILA, 2001; ROSSI; ANDREAZZI, 2005). O nível de resistência a meticilina é influenciado por uma proteína citoplasmática, produto do gene *femA* (*fem*, Factor Essential for Methicillin resistance), que está também envolvida na biossíntese de parede celular (MOUSSALEM; KURY; ACOSTA, 2007).

Os antibióticos β -lactâmicos se ligam a Proteínas Ligadoras de Penicilina (PBPs), as quais participam da síntese da parede celular, impedindo desta forma a constituição da mesma, resultando em lise bacteriana. O MRSA desenvolveu uma

nova PBP, a PBP2a, que é plenamente funcional, mas não apresenta afinidade por β -lactâmicos. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA*, que é carregado em um elemento genético móvel denominado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (*SCCmec*) (FERREIRA; ÁVILA, 2001; ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Um estudo realizado em 1996, utilizando estirpes analisadas em diferentes continentes, apontou as primeiras evidências da existência de cinco tipos de cassetes cromossômicos estafilocócicos relacionados com a resistência à meticilina (*SCCmec* I, II, III, IV e V) (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005).

Os MRSA hospitalares (HAMRSA), carregam *SCCmec* dos tipos I, II e III, e os CAMRSA estão mais associados aos *SCCmec* dos tipos IV e V. Estes tipos de cassetes cromossômicos são elementos genéticos menores em relação aos outros tipos e possuem menos genes acoplados que conferem resistência a outros antimicrobianos. Sendo, de maneira geral, o CAMRSA mais susceptível à maioria dos antimicrobianos não β -lactâmicos (LOPES, 2005; DAUM, 2007).

Existem ainda cepas resistentes resultantes de mecanismos não relacionados ao gene *mecA*, como a hiperprodução de β -lactamase (SANTOS et al, 2007).

Além da meticilina, um outro problema na área de saúde é a resistência a oxacilina que vem emergindo no mundo limitando as opções no uso de drogas contra o *S. aureus*. O Brasil, têm apresentado uma grande variação entre os estados de uma mesma região e entre os hospitais analisados no mesmo estado, devendo ser localmente avaliada a situação da resistência dos *Staphylococcus* à meticilina, e conseqüentemente à oxacilina, uma vez que ambos possuem o mesmo mecanismo de ação (SOUSA JUNIOR et al, 2009).

Assim como a meticilina, a oxacilina pertence à classe dos antibióticos β -lactâmicos, amplamente utilizados na terapia das infecções estafilocócicas e os mecanismos de resistência a essa classe de antibióticos inclui a produção de β -lactamases e redução da afinidade de PBP2a (proteína de ligação à penicilina) determinada pela presença do gene *mecA* codificador de uma proteína denominada PBP2a, que possui baixa afinidade a este antimicrobiano (MOON et al, 2007; CAUWELIER et al, 2004). Desta forma, este gene induz resistência à oxacilina, levando às falhas terapêuticas quando outros β -lactâmicos ou outras classes de antibióticos são utilizadas e a detecção da sua presença serve como indicativo de

resistência, o que auxilia na escolha da melhor terapia antimicrobiana (MOON et al, 2007; FERREIRA et al, 2003).

A transferência horizontal do gene *mecA* no gênero *Staphylococcus* tem contribuído para a circulação mundial de clones oxacilina-resistente e multidroga-resistentes e tem sido apontada como mecanismo comum de resistência a fármacos (AARESTRUP et al, 2001; TRAMPER-STRANDERS et al, 2007).

Estafilococos diagnosticados como resistentes à oxacilina devem ser, do mesmo modo, relatados como resistentes a outros antibióticos β -lactâmicos (penicilinas, carbapenêmicos, cefalosporinas e combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases), independente dos resultados dos testes *in vitro* com esses antimicrobianos, visto que o mecanismo de resistência é idêntico. Testes *in vitro* com outros β -lactâmicos têm menor acurácia como preditivos da presença do gene *mecA* do que os testes com oxacilina ou cefoxitina (CLSI, 2018).

Os testes com discos de cefoxitina, para os *Staphylococcus aureus*, são comparáveis aos testes com discos de oxacilina, porém, em geral, o primeiro proporciona uma leitura mais fácil, devido à formação de halo de maior tamanho e à possibilidade de ser lido usando luz refletida, e não transferida, como no caso do disco de oxacilina. Assim, no ano de 2005, segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), foram introduzidos os pontos de corte de cefoxitina para os estafilococos, e especificamente para o *S. aureus* o disco com cefoxitina deveria ser preferido ao da oxacilina e, nesse caso tem a finalidade de detectar resistência à oxacilina e não à própria cefoxitina (MIMICA; MENDES, 2007).

Uma outra droga ativa contra a maioria dos cocos Gram positivos aeróbios, incluindo os *Staphylococcus* é a clindamicina, um derivado sintético da lincomicina obtido em 1966, a qual pertence junto à lincomicina ao grupo das lincosaminas, e representa uma alternativa para os pacientes alérgicos à penicilina (STAMBOULIAN; PAGANINI, 2004). A clindamicina é um agente bacteriostático que inibe a síntese de proteínas bacterianas pela união reversível com a subunidade 50S do ribossomo. Nos *Staphylococcus*, o mecanismo mais comum para adquirir a resistência à clindamicina é através da modificação do sítio de ação, que se produz pela aquisição de um gene *erm* (*erythromycin ribosome methylase*) que codifica uma enzima que dimetila um resíduo específico de adenina no RNAr 23S (FERNANDEZ; CARDENAS; ELSTER, 2004). Esta metilação confere resistência aos Macrolídeos, Lincosamidas e as

Estreptograminas do grupo B. Os mecanismos de efluxo, codificados por este gene, conferem resistência apenas aos macrolídeos (DAVID; PIMENTEL; FREIRE, 2005).

Isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes aos Macrolídeos podem apresentar resistência constitutiva ou induzida à clindamicina e este mecanismo de resistência não é detectado através do teste de sensibilidade rotineiramente empregado em laboratórios, para isso é recomendado o teste de indução, denominado teste-D (OTSUKA et al, 2007). Este teste consiste em dispor o disco de clindamicina (2 µg) a uma distância de 15 a 26 mm do disco de eritromicina (15 µg). Após o período de incubação, se for visualizado um achatamento do halo da clindamicina na zona de confluência dos antibióticos é constatada a resistência induzida à clindamicina e o teste-D é considerado positivo. Quando o achatamento do halo de inibição da clindamicina não ocorre, o micro-organismo é considerado sensível a este antimicrobiano (DAVID; PIMENTEL; FREIRE, 2005).

Outro grupo de antibióticos utilizado no tratamento de infecções estafilocócicas é o dos glicopeptídeos, sendo a vancomicina um dos principais representantes que desde seu surgimento tem estabelecido a alternativa terapêutica para as infecções causadas por estafilococos produtores de penicilinase e resistentes à oxacilina (SCHWALBE, 1987), embora as primeiras cepas resistentes, a esta droga, já tenham sido reportadas desde o ano de 1997 (VELÁZQUEZ-MEZA, 2005). Apesar de ser um antibiótico ativo sobre micro-organismos Gram-positivos, a vancomicina é especificamente indicada para o tratamento de infecções estafilocócicas sistêmicas em pacientes alérgicos às penicilinas ou para as infecções por estafilococos resistentes à meticilina (MRSA) (ALBANESE, 2000).

3.2.4 Testes para Determinação da Atividade Antimicrobiana

Nas pesquisas envolvendo novos protótipos antibióticos, alguns autores indicam que compostos presentes nas plantas, como taninos e flavonoides, podem ser responsáveis pela atividade desejada (HARBONE, 2000; BYLKA; MATLAWSKA; PILEWSKI, 2004). Porém, pouco se sabe sobre os níveis aceitáveis dos extratos vegetais quando comparados com antibióticos utilizados na terapêutica (MENDES et al., 2011). Com isso, é necessário a realização de testes relacionados a esta atividade a fim de se obter parâmetros na comparação de substâncias de origem natural e dos padrões utilizados na terapêutica.

Os testes realizados para a determinação da atividade antimicrobiana são testes *in vitro*, sendo padronizados pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (NASCIMENTO et al., 2007). Alguns destes testes são utilizados, inicialmente, na triagem dos micro-organismos sensíveis (BONA et al., 2014).

Neste aspecto, a metodologia usada nesta etapa inicial é o que chamamos de métodos de difusão em ágar, fundamentado em um método físico quantitativo onde existe uma relação entre o halo de inibição e a quantidade de substância aplicada. As técnicas comumente utilizadas neste tipo de metodologia são aplicação em disco, perfuração em ágar, cilindros de aço inoxidável (OSTROSKY et al., 2008) e diluição em ágar (NASCIMENTO et al., 2007). Estas aplicações diferem quanto ao modo de inoculação da substância no meio sólido de cultura, podendo ser em discos de papel, em poços feitos no meio, cilindros de aço ou até mesmo misturados ao meio antes da solidificação do mesmo, respectivamente.

Além dos métodos quantitativos de triagem, ensaios qualitativos também são utilizados na determinação da atividade antimicrobiana como pode ser observado nos ensaios bioautográficos, sendo baseado na determinação por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e posterior inoculação das substâncias encontradas na mesma (SILVEIRA et al., 2009).

Após a triagem, os micro-organismos sensíveis nos testes iniciais são submetidos a ensaios para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os métodos usuais nesta etapa são de Macrodiluição e Microdiluição, sendo este último mais utilizado, pois necessita de um menor quantitativo de substratos apresentando menor custo e manuseio mais simples na determinação das concentrações (OSTROSKY et al., 2008; BONA et al., 2014).

Apesar da utilização destes testes na determinação da atividade antimicrobiana, ainda não existe uma padronização na realização destes métodos o que, de certa forma, limita as pesquisas nesta área, impossibilitando em alguns casos a comparação dos resultados com o que é descrito na literatura (BONA et al., 2014). Isto pode estar relacionado com um grande número de fatores interferentes nestes métodos como, por exemplo, os meios de cultura utilizados; pH do sistema; disponibilidade de oxigênio no meio; inóculo e as condições de cultivo (OSTROSKY et al., 2008).

Diante da problemática abordada, outra linha de pesquisa para busca de novas substâncias, ou até mesmo de melhoria dos resultados das substâncias já disponíveis no mercado ou com resultados já evidenciados, tem sido os estudos que envolvem a mistura de mais de um composto com atividade antimicrobiana, seja potente ou não, para verificar a possibilidade de sinergismo entre eles, destacando-se as pesquisas com que utilizam bactérias resistentes (NASCIMENTO et al, 2000).

De acordo com Briskin (2000), quando comparados os fármacos sintéticos individuais com os fitoterápicos, estes apresentam efeitos benéficos devido ao sinergismo que os compostos provenientes do metabolismo secundário vegetal podem proporcionar como resposta fisiológica. Ainda em relação a esta ideia, esses efeitos podem ser interpretados como fundamentais para sobrevivência das plantas uma vez que a sinergia destas substâncias pode contribuir não apenas assegurando eficácia na proteção das espécies, mas também contribuindo com a diminuição da resistência ou adaptação dos organismos predadores (KAUFMAN et al., 1999).

Zago et al. (2009) realizaram um estudo para verificar possíveis interações entre extratos de plantas medicinais e drogas sintéticas antimicrobianas diante de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, o qual obteve resultados satisfatórios, em que, por exemplo, o óleo extraído da capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*) que não demonstrou efeito antimicrobiano tão eficiente, ao ser submetido ao teste de sinergismo apresentou índice de 100% interação com as oito drogas avaliadas frente a *S. aureus*. Neste mesmo estudo feito com seis espécies vegetais com indicação medicinal, oito antimicrobianos disponíveis no mercado e doze linhagens para cada bactéria em questão, não foi encontrado nenhum resultado de antagonismo.

3.2.5 Interação entre Antimicrobianos

Para conseguir combater a resistência microbiana, estão sendo utilizadas combinações múltiplas de drogas. Essas combinações vêm sendo utilizadas também entre produtos naturais, antibióticos e substâncias isoladas com o objetivo de alterar a ação dos antibióticos, seja revertendo à resistência ou aumentando a atividade destas drogas consagradas (COUTINHO et al., 2008).

Modificadores da atividade antibiótica é, justamente, o termo usado para estas substâncias que modulam ou mesmo revertem a resistência bacteriana a certos antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes) que alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo, por exemplo (GIBBONS, 2004).

Este aumento crescente de micro-organismos resistentes às drogas antimicrobianas convencionais vêm desafiando a ciência e causando sérios riscos à saúde pública em todo o mundo. As dificuldades para se produzirem novas drogas eficazes no combate microbiano, usando a metodologia tradicional de triagens a partir de fungos e bactérias, tornam os produtos finais cada vez mais escassos e caros (FERRONATO et al., 2007). Os vegetais são excelentes fontes de busca de novas drogas antimicrobianas. Por terem diversidade molecular muito superior àquela derivada de produtos sintéticos, as plantas têm se tornado objeto de estudo científico no que concerne às suas variadas propriedades medicinais (NOVAIS et al., 2003).

Estas propriedades medicinais, principalmente a ação antimicrobiana, para derivados vegetais e a possibilidade de sinergismos com drogas antimicrobianas convencionais, são estudos que, realmente, têm se tornado mais frequentes (BETONI et al., 2006), sendo que a interação sinérgica para 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 apresentar 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 a serem examinados 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).

Para interpretação destes parâmetros de combinação dos antimicrobianos é feito um cálculo e determinado o Índice de Concentração Inibitória Fracionaria (ICIF), mas apesar da fórmula ser um consenso, os parâmetros para análise desta interação é que não são padronizados na literatura, tanto em relação aos efeitos que podem ser sinérgico, parcialmente sinérgico, aditivo, indiferente ou antagônico, quanto aos valores de referencia para interpretar o ICIF (WHITE et al., 1996; OSBURN et al., 2006; AN et al., 2011; SARAIVA et al. 2013; OLIVEIRA et al., 2016). Abaixo exemplifica-se fórmula e parâmetros de comparação da interação dos antimicrobianos:

$$ICIF = CIF_A + CIF_B$$

$$CIF_A = CIM_A \text{ na combinação} / CIM_A \text{ sozinho}$$

$$CIF_B = CIM_B \text{ na combinação} / CIM_B \text{ sozinho}$$

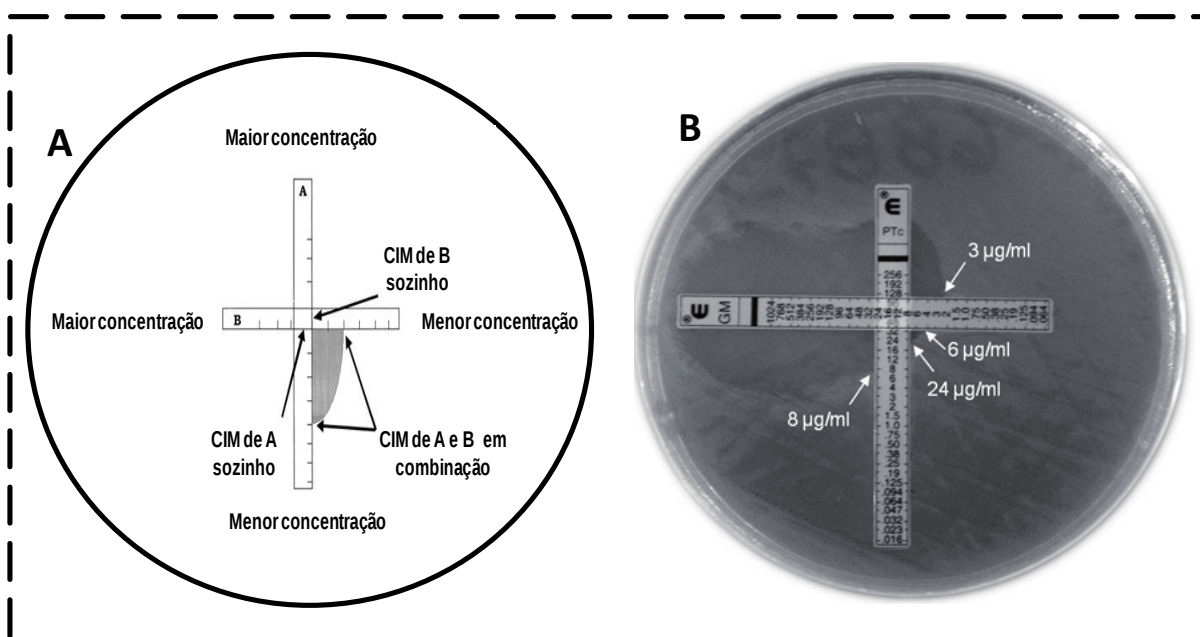
O ICIF menor ou igual a 0,5 corresponde a um efeito sinérgico; ICIF entre 0,5 e 0,75 corresponde a um efeito parcialmente sinérgico; enquanto que um ICIF entre 0,75 - 4,0, corresponde à indiferença e um ICIF maior que 4,0 corresponde a antagonismo (HALL; MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983; FERNÁNDEZ-CUENCA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

3.2.5.1 Método epsilométrico (E-test)

Este método foi proposto por White et al. (1996), e é considerado o mais novo método para avaliar combinação sinérgica de antimicrobianos. De fácil execução, a técnica é semelhante ao teste de susceptibilidade de difusão em agar por disco, utilizando o mesmo padrão de inóculo e placas de Mueller-Hinton (MH) (CLSI, 2015a), mas o diferencial é a forma de apresentação do agente antimicrobiano. O método consiste em sobrepor, de forma entrecruzada, fitas plásticas (E-test) impregnadas com uma concentração gradiente de antimicrobiano, na superfície de uma placa de ágar MH, previamente inoculada com a bactéria testada, sendo incubada durante 18h. O entrecruzamento das fitas se realiza especificamente considerando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (Figura 3). A leitura da CIM é feita na interseção da zona de inibição de cada fita, porém, o efeito sinérgico é interpretado pela observação da queda da CIM de ambos antibióticos na zona da interseção de ambas fitas (WHITE et al., 1996; BONAPACE et al., 2000).

A leitura do teste é analisada pela interpretação e seguindo a mesma lógica de cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionaria (ICIF), sendo necessário calcular o CIF_A , depois o CIF_B para encontrar o ICIF. Os parâmetros de interpretação seguem a mesma falta de padronização para todos os métodos descritos na literatura que se baseiam nesta fórmula de ICIF.

Figura 3 - (A) Representação esquemática do teste epsilométrico (E-test) entre duas substâncias antimicrobianas. (B) Ilustração do teste epsilométrico (E-test) após a determinação de sinergismo entre duas drogas antimicrobianas.



Fonte: White et al. (1996) (A) e Sierra R., Guevara e Guevara-Patino (2011) (B)

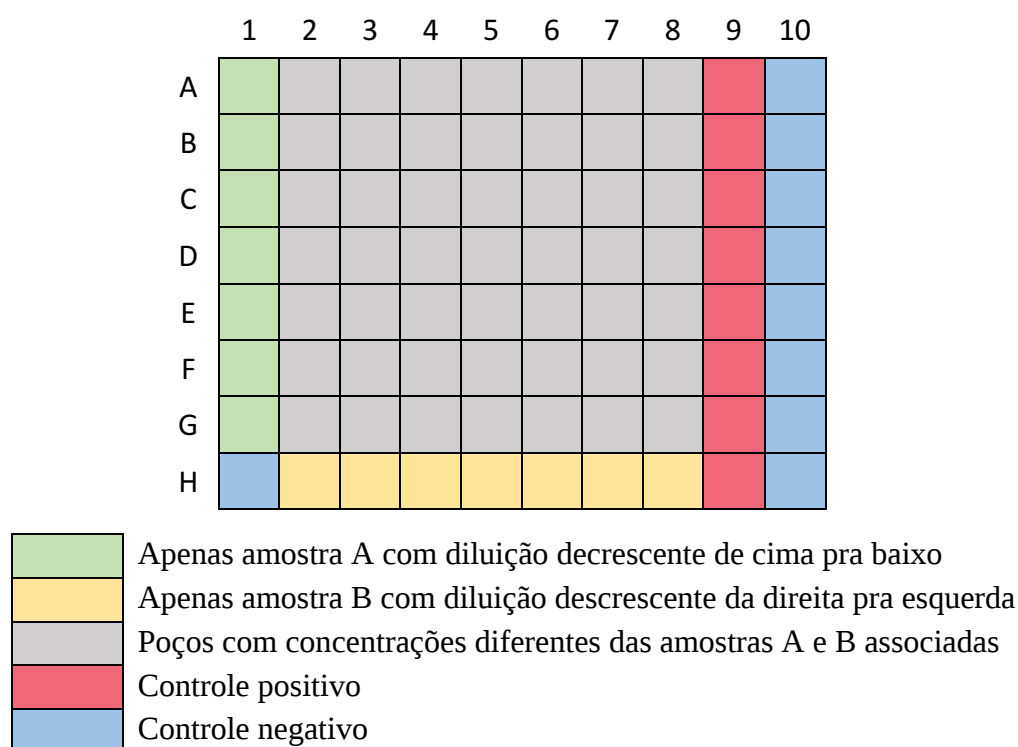
3.2.5.2 Método de Checkerboard

O método 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, requerendo materiais disponíveis em qualquer laboratório de microbiologia (LORIAN, 2005).

O termo checkerboard se refere ao padrão de diluição dos antimicrobianos distribuídos na placa de microtitulação, como se fosse um tabuleiro de xadrez. Na vertical, cada poço contem uma diferente concentração diluída do antibiótico de forma decrescente (poços identificados da A – H) (Figura 4). Já 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). As vantagens deste método é que é possível testar várias combinações de diferentes concentrações das drogas para uma mesma amostra, além de utilizar pequenas quantidades (volume) de cada droga testada. Dentre as limitações do método, é que só determina a atividade inibitória e não a atividade bactericida da combinação (LORIAN, 2005).

Figura 4 - Esquema de como se apresenta a placa de microtitulação no método checkerboard
PLACA CHECKERBOARD



3.2.5.3 Método tempo-morte (Time-kill)

O modelo Time-kill, é um dos métodos mais apropriado para determinar o efeito bactericida ou fungicida sendo também uma boa ferramenta para obter informações sobre a interação dinâmica entre o agente antimicrobiano e a tensão do micro-organismo, sendo também chamado de Curva tempo-morte, este protocolo busca revelar o efeito antimicrobiano dependente do tempo ou dependente da concentração (PFALLER; SHEEHAN; REX, 2004).

Para as bactérias, este teste foi bem padronizado e descrito no documento M26-A do CLSI (1999). É realizado em meio de cultura de caldo usando três tubos

contendo uma suspensão bacteriana de 5×10^5 CFU/mL. O primeiro e o segundo tubos contêm a molécula ou o extrato testado geralmente em concentrações finais de $0,25 \times \text{MIC}$ e $1 \times \text{MIC}$, e o terceiro é considerado como o controle de crescimento. A incubação é feita em condições adequadas para intervalos de tempo variados (0, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h). Em seguida, a porcentagem de células mortas é calculada em relação ao controle de crescimento, determinando o número de células vivas (CFU/mL) de cada tubo usando o método de contagem de placa de ágar. Geralmente, o efeito bactericida é obtido com uma porcentagem de letalidade de 90% durante 6 h, o que equivale a 99,9% de letalidade durante 24 h (KONATE et al., 2012).

Time-kill, igualmente ao Checkerboard, é um método utilizado para avaliar combinações antimicrobianas *in vitro* e os dois modelos são costumeiramente comparados quanto aos seus potenciais de avaliação da modulação antimicrobiana (RAND et al., 1993; MARQUES et al., 1997; LORIAN, 2005; PETERSEN et al., 2006; TONG et al., 2006).

As vantagens desta técnica é o fornecimento de dados sobre a atividade bactericida da associação de antimicrobianos e também proporciona uma imagem dinâmica da ação antimicrobiana e o tempo de interação (com base na contagem de colônias), diferente do checkerboard, que fornece apenas dados da concentração inibitória mínima da associação dos antimicrobianos e a verificação do crescimento é examinada apenas uma vez, após 16 a 24h (LORIAN, 2005).

O time-kill é um método trabalhoso e demorado, mas, os resultados são úteis para orientar a terapia. É essencial que as concentrações dos antimicrobianos testados sejam escolhidas com cuidado para que representem as concentrações teciduais necessárias para combater o micro-organismo no sítio de infecção. (WHITE et al., 1996; LORIAN, 2005).

2.3. METABOLISMO SECUNDÁRIO VEGETAL E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Em pesquisas na área de produtos naturais voltadas para descoberta de novos compostos de interesse médico e farmacêutico, os estudos etnodirigidos são apontados como ferramenta preferencial, assim como relatado em levantamento realizado por Albuquerque e Hanazaki (2006), no qual foi citado como exemplo um estudo comparativo do percentual de atividade antimicrobiana de plantas oriundas da Península do Sinai (Egito) coletadas aleatoriamente contra as coletadas por meio do

método etnodirigido, quando este último apresentou resultados mais promissores (KHAFAGI; DEWEDAR, 2000).

Em investigação realizada com 53 espécies herbáceas do Nordeste brasileiro testadas contra 11 micro-organismos para bioprospecção de plantas com atividade antimicrobiana, Silva et al. (2013), concluíram que as pesquisas com base em informações etnofarmacológicas diretas contribuem com melhor direcionamento para busca de novas substâncias antimicrobianas em espécies vegetais.

Estudo realizado por Gonçalves, Filho e Menezes (2005), cita determinados metabólitos vegetais como principais grupos com propriedades antimicrobianas, a exemplo dos terpenoides, óleos essenciais, alcaloides, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonoides, tanino e cumarinas.

Sabe-se que alguns metabólitos secundários são produzidos a partir de estímulos externos, como para reagir a algum tipo de infecção com micro-organismos. Esta indução pode acontecer a nível local e deve ser refletida de forma sistêmica através de sinais endógenos. Um exemplo seria a produção de fitoalexinas consideradas compostos antimicrobianos, não sendo encontradas numa planta saudável. Vale salientar que cada espécie produz um conjunto específico de fitoalexinas, que compreendem muitos tipos diferentes de compostos, incluindo sesquiterpenes, triterpenos, isoflavonas, antraquinonas, cumarinas (VERPOORT, 1998)

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas, dentre elas as ações bactericida e fungicida, as quais podem estar relacionadas a sua capacidade de precipitação de proteínas (CHUNG; WEI; JOHNSON, 1998; CHUNG et al., 1998). Diversas bactérias são sensíveis aos taninos, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* e, em concentrações mínimas (500,0 µg/mL), o fungo *Fomes annosus* teve seu crescimento inibido (CASTRO et al., 1999).

Nishizawa et al. (1990) demonstraram significativa atividade bactericida do decocto da raiz de *Nuphar variegatum* Durand contra micro-organismos patógenos. O rizoma, em especial, é empregado na cura de infecções diversas e o decocto da raiz para tratamento de infecções dos olhos, garganta e dores internas. Scalbert (1991) relata que taninos condensados e hidrolisáveis não apresentam diferenças

significantes frente a fungos e bactérias, visto que o efeito da toxicidade relacionado à estrutura molecular do tanino é ainda desconhecido.

Os flavonoides compõem uma classe de substâncias de origem natural com extensa diversidade estrutural, cuja síntese não ocorre na espécie humana (ZUANAZZI; MONTANHA, 2004). Já foram identificadas mais de nove mil substâncias pertencentes a este grupo (MARTENS; MITHÖFER, 2005) e dentre as diversas funções atribuídas a esta classe podemos citar a proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioleta, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais com finalidade de polinização, antioxidante, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (MELLO; SANTOS, 2001).

O emprego terapêutico de plantas contendo flavonoides é vasto e muitas destas são testadas empiricamente como a atividade antioxidante, antimicrobiana, hipocolesterolemiantes e hipoglicemiantes (AJALI; CHUKWURAH, 2004; FUHRMAN et al., 2002; JUNG et al., 2006; SÜZGEÇ et al., 2005).

Taguri, Tanaka e Kouno (2006) apontam alguns estudos que evidenciam a atividade antibacteriana de polifenóis, levantando a questão da diversidade de métodos e critérios utilizados nestas análises que tornam difícil o entendimento da relação entre a estrutura desses compostos vegetais e o mecanismo para ação antimicrobiana. Nesse trabalho, a pesquisa realizada por eles, sugere como resultado que polifenóis vegetais com pirogallol apresentam maior atividade antibacteriana em comparação aqueles com grupos catecol ou resorcinol. Destaca ainda que quando a atividade antibacteriana dos compostos ou extratos não pode ser estimada pelo número de grupos hidroxifenil, deve-se considerar outros fatores como o pH do meio e propriedades bacterianas.

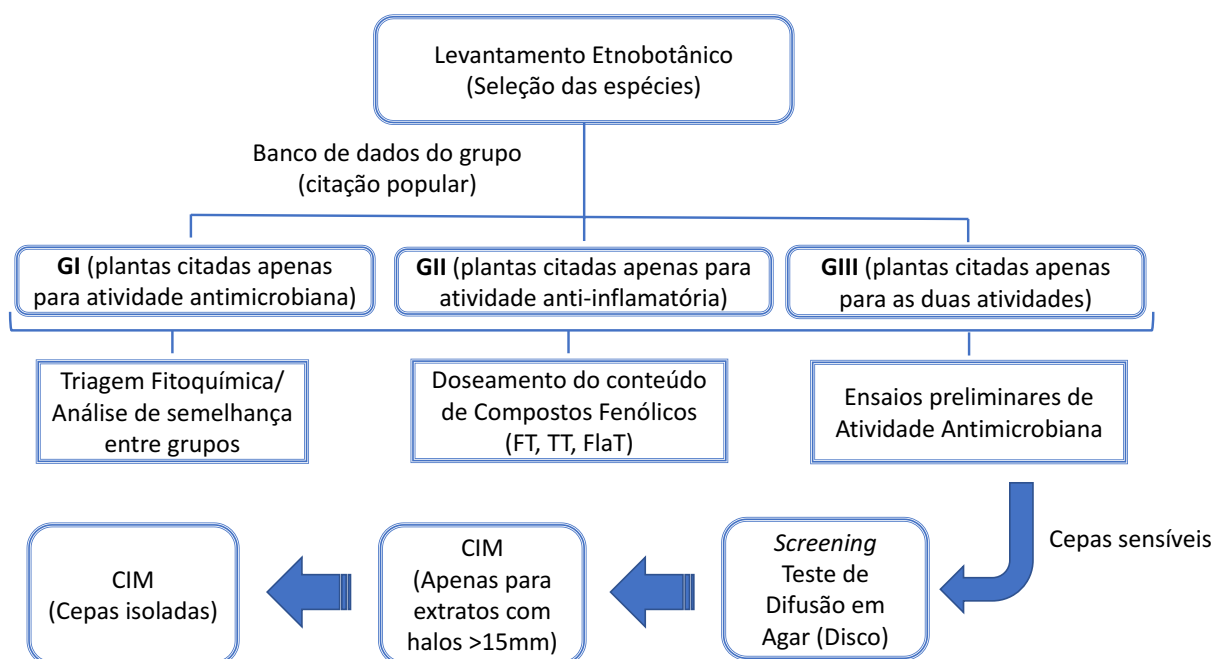
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Etapas desenvolvidas para conclusão do trabalho, sendo divididas em: Seleção das espécies e bioprospecção; Espécie alvo e Fração alvo.

4.1. SELEÇÃO DAS ESPÉCIES E BIOPROSPECÇÃO

Os procedimentos realizados neste estudo seguiram a sequência mostrada na figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da etapa 1, intitulada de “Seleção das Espécies e Bioprospecção”



4.1.1 Abordagem Etnodirigida para Seleção de Plantas Medicinais

As espécies foram selecionadas a partir do banco de dados formado pelo levantamento do conhecimento tradicional, realizado por meio das principais técnicas de obtenção de dados etnofarmacológicos, como lista-livre e entrevista semi-estruturada, descritos em Araujo et al. (2008).

Esta base de dados, previamente elaborada pelo Laboratório de Ecologia e Evolução dos Sistemas Socio-Ecológicos (LEA-UFPE), já foi utilizada em estudos prévios que tratam, entre outras, das indicações como anti-inflamatórias e antimicrobianas (ALENCAR et al., 2009; SILVA et al., 2011; FERREIRA JUNIOR et

al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2012; MELO et al., 2017). As plantas foram agrupadas da seguinte forma: GI – plantas com citação apenas para atividade antimicrobiana, cuja indicação constava, por exemplo, tratar tuberculose, bronquite, furúnculo, boqueira, pneumonia e infecções no geral; GII – plantas com citação apenas para atividade anti-inflamatória, cuja citação constava tratar processos inflamatórios; e GIII – plantas com citação para atividade antimicrobiana e anti-inflamatória, cuja citação envolve, em conjunto, os descritores acima expostos. Como critério de exclusão, foram retiradas as espécies com menos de três citações por pessoa para ter um consenso mínimo entre os informantes (ARAÚJO et al., 2008).

Atendendo a estes critérios foi selecionado um total de 22 espécies as quais estão listadas na Tabela 1. A parte selecionada foi aquela de maior citação para a espécie.

As coletas das espécies foram realizadas em vegetação caducifólia espinhosa (Caatinga), na comunidade do Carão, município de Altinho/PE (08°35'13,5"S x 36°05'34,6"W) em janeiro de 2014. Foram realizadas coletas mínimas de três exemplares que foram misturadas com o intuito de minimizar efeitos idiossincráticos (ARAÚJO et al., 2008).

Tabela 1 - Seleção de plantas pelo método etnodirigido na comunidade do Carão, Altinho-PE, citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias

	Plantas utilizadas	Família	Nome popular	Parte usada	Voucher
GI	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants	Amaranthaceae	mastruz	folha	IPA 81001
	<i>Chloroleucon extortum</i> Barneby & J.W. Grimes	Fabaceae	jurema branca	casca	UFP 53492
	<i>Citrus x aurantium</i> L.	Rutaceae	laranjeira	folha	IPA 89972
	<i>Cleome spinosa</i> Jacq.	Cleomaceae	mussambê	flor	UFP 46366
	<i>Lippia origanoides</i> Kunth	Verbenaceae	alecrim de caboclo	folha	IPA 91588
	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Lamiaceae	hortelã folha grande	folha	IPA 91000
	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Rhamnaceae	juazeiro	casca	UFP 46186
GII	<i>Boerhavia diffusa</i> L.	Nyctaginaceae	pega pinto	raiz	IPA 91066
	<i>Cedrela odorata</i> L.	Meliaceae	cedro	casca	UFP 54186
	<i>Cereus jamacaru</i> DC.	Cactaceae	mandacaru	raiz	UFP 58750
	<i>Crateva tapia</i> L.	Capparaceae	trapiá	casca	UFP 46188
	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart.) L.P. Queiroz	Caesalpinaceae	jucá	casca	UFP 46664
	<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	Anacardiaceae	baraúna	casca	IPA 91044
	<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	Anacardiaceae	umbu	casca	UFP 54171
GIII	<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Sm.	Fabaceae	imburana açu	casca	PEUFR 50486
	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	caju roxo	casca	HST 20410
	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	Fabaceae	angico	casca	UFP 46181
	<i>Erythrina velutina</i> Willd.	Fabaceae	mulungu	casca	UFP 46180
	<i>Maytenus rigida</i> Mart.	Celastraceae	bom nome	casca	UFP 46182
	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	Fabaceae	jurema preta	casca	IPA 91039
	<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Anacardiaceae	aroeira	casca	IPA 91068
	<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. Ex DC.) Mattos	Bignoniaceae	pau d'arco roxo	casca	UFP 17536

GI- Plantas citadas como antimicrobianas, **GII-** Plantas citadas como anti-inflamatórias, **GIII-** Plantas citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias

4.1.2 Preparação e Caracterização Química dos Extratos

As amostras vegetais foram coletadas em janeiro de 2014 com base nas partes indicadas popularmente, sendo reduzidas a partes menores com a finalidade de facilitar o processo de secagem, diminuindo a possibilidade de contaminação do material. As amostras foram submetidas a exposição ambiente por 2 semanas para desidratação, não sendo suficiente, foram colocadas em estufa a 40°C para finalização do processo. Após secagem, cada amostra foi pulverizada em moinho vertical de facas tipo Willye (Adamo 340) e padronizadas em tamises, obtendo granulometria de 20 Mesh (1,2 mm), sendo acondicionadas em sacos de papel até a preparação dos extratos. Após este processo, as amostras foram submetidas à extração por maceração fracionada 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 3 macerações. Em seguida, os extratos foram somados, filtrados e submetidos à evaporação sob pressão reduzida, à temperatura de $40 \pm 5^\circ \text{C}$, até total secura e avaliados através de métodos cromatográficos segundo Wagner e Bladt (1996) procurando-se evidenciar os principais grupos do metabolismo secundário (Tabela 2).

Tabela 2 - Sistemas de eluição, padrões e reveladores utilizados para evidenciar os principais grupos de metabólitos secundários segundo Wagner e Bladt (1996).

Grupo	Sistema eluente	Padrão	Revelador
Alcaloides gerais	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)	Quinina Yoimbina	Dragendorff
Antocianinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	Azul de metileno	Anisaldeído-sulfúrico
Antraquinonas agliconas	Éter de petróleo: acetato de etila: ácido fórmico (75:25:1)	Antraquinona	Ácido fosfomolibdico / H ₂ SO ₄ etanólico 10%
Compostos fenólicos	Acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5)	Rutina Ácido Gálico Ácido Elágico	NEU
Cumarinas	Tolueno: éter (1:1 saturado com ácido acético 10%)	Escopoletina	KOH etanólico 10%
Derivados antracênicos	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	Aloína	KOH etanólico 10%
Iridoides	Acetato de etila: metanol: água (77:15:8)	Carvacrol Timol	Vanilina sulfúrica
Lignanas	Clorofórmio: metanol: água (70:30:4)	Extrato de linhaça	Vanilina fosfórica
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Carvacrol Timol	Vanilina sulfúrica
Naftoquinonas	Tolueno: ácido fórmico (99:1)	Biflorina Lapachol	KOH etanólico 10%
Saponinas	Clorofórmio: ácido acético: metanol: água (64:32:12:8)	Saponina	Anisaldeído-sulfúrico
Triterpenos e esteróides	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	Lupeol Sitosterol	Lieberman-Burchard
Xantinas	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	Cafeína	Iodo - KI - HCl

4.1.3 Determinação do Conteúdo Fenólico Total

Para determinação do conteúdo fenólico total foi utilizada a metodologia descrita por Amorim et. al. (2008). O extrato seco de cada planta 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 medida 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 500 µL 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 apresenta absorção máxima a 760 nm e é proporcional à taxa de compostos fenólicos. O teor de fenois totais foi expresso como miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg EAT/g) (AMORIM et. al., 2008).

4.1.4 Determinação do Conteúdo de Taninos

A determinação do teor de taninos foi realizada segundo protocolo desenvolvido por Amorim et. al. (2008) e 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 de 50 mL, acrescentando 6 mL da amostra diluída e 12 mL de água destilada, em triplicata. Após 3 (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 1 mL 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 4.3.

4.1.5 Determinação do Conteúdo de Flavonoides

A quantificação dos teores de flavonoides 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 flavonoides da amostra, estabelecendo o complexo estável flavonoide- 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 pesado e 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 μL) do extrato diluído foi transferida para tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 0,120 mL (120 μL) de ácido acético glacial, 2 mL da solução de piridina (20%, v/v em metanol P.A), 0,5 mL (500 μL) 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 foi determinada a 420 nm 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 μL 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 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O teor de flavonoides totais foi expresso como miligramas equivalente de rutina por grama de extrato (mg ER/g).

4.1.6 Atividade Antimicrobiana

4.1.5.1 Micro-organismos Testes

Os ensaios antimicrobianos de triagem, para as 22 espécies, foram realizados frente a nove micro-organismos pertencentes à Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Representantes dos grupos de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01); *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16); *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06); bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224); *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39); *Serratia marcescens* (UFPEDA 398); Bacilo álcool-ácido resistente: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71); e levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

Após triagem das espécies, as etapas posteriores foram realizadas frente as cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes pertencentes a Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os sítios de isolamento das cepas foram: urina (UFPEDA 670); urina (UFPEDA 671); sangue (UFPEDA 672); ponta de cateter (UFPEDA 691); secreção de úlcera (UFPEDA 700); ponta de cateter (UFPEDA 725); orofaringe (UFPEDA 728); secreção nasal (UFPEDA 729); escarro (UFPEDA 730); fragmento ósseo (UFPEDA 732).

4.1.5.2 Teste de Difusão em Agar (disco)

Inicialmente foi realizado um screening das espécies pelo método de difusão em agar, utilizando a técnica de disco (BAUER et al., 1966). A concentração do extrato foi de 200.000 µg/ml em dimetilsufóxido (DMSO) e os discos de papel de 6 mm de diâmetro foram embebidos com 10 µL da solução correspondente a 2.000 µg do extrato bruto ou frações por disco. As suspensões foram padronizadas segundo a escala de McFarland no grau de turvação de 0,5 (BARRY, 1986; KONEMAN et al., 1997), o que correspondente a uma concentração de aproximadamente 10^{7-8} UFC/mL.

Resultados com halos menores que 9 mm foram indicativos de inatividade, 9-12 mm parcialmente ativo, 13-18 mm ativo, maiores que 18 foram considerados muito ativos (ALVES et al., 2000).

O antibiótico Gentamicina (bactérias) e o antifúngico cetoconazol (levedura) foram utilizados nos testes como fármacos padrões, nas concentrações de 10 µg/disco e 30 µg/disco, respectivamente.

4.1.5.3 Teste de Microdiluição em Caldo

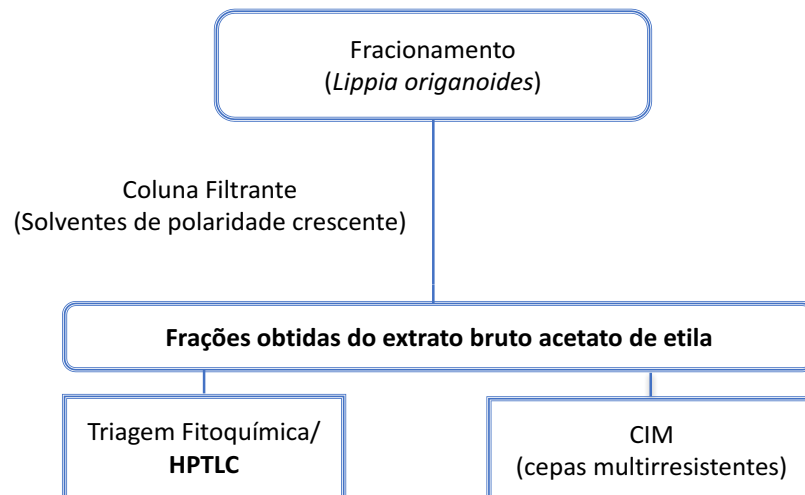
Aos extratos que obtiveram halos no teste de disco ≥ 15 mm, foi realizada determinação da CIM e avaliada segundo os critérios adotados pelo CLSI (2015). Foi utilizada uma placa multipoços (96 poços), uma solução mãe dos extratos a 20.000 µg/mL e uma suspensão padronizada de acordo com o tubo 0,5 da escala de MacFarland, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, para *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus*. Com exceção da terceira coluna, em todas as colunas foi colocado 100 µL do meio caldo Mueller Hinton, sendo a primeira coluna o controle negativo, ou seja, só contém os 100 µL do caldo Mueller Hinton, e na segunda coluna foi adicionado 10 µL da suspensão microbiana padronizada aos 100 µL do caldo Mueller Hinton (controle positivo). Já na terceira coluna foram colocados 180 µL do caldo Mueller Hinton e depois adicionado 20 µL da solução mãe. A partir dessa coluna foram feitas diluições seriadas de 1:2. Aos poços das diluições foram colocados 10 µL da suspensão do micro-organismo teste. A placa foi incubada durante 18 horas e após o período de incubação foi aplicado um corante revelador (resazurina), capaz de exibir de forma mais precisa se houve ou não turbidez no poço.

As espécies que apresentaram melhores resultados neste teste inicial foram novamente avaliadas para determinação de sua CIM frente as cepas multirresistentes isoladas com suspensão microbiana correspondente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. A partir desta etapa, a melhor espécie foi fracionada e suas frações também foram submetidas ao teste de microdiluição seguindo os mesmos procedimentos anteriormente descritos, com suspensão microbiana correspondente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL e a melhor fração foi subfracionada e também determinada sua CIM sob os mesmos aspectos metodológicos já descritos.

4.2 ESPÉCIE ALVO

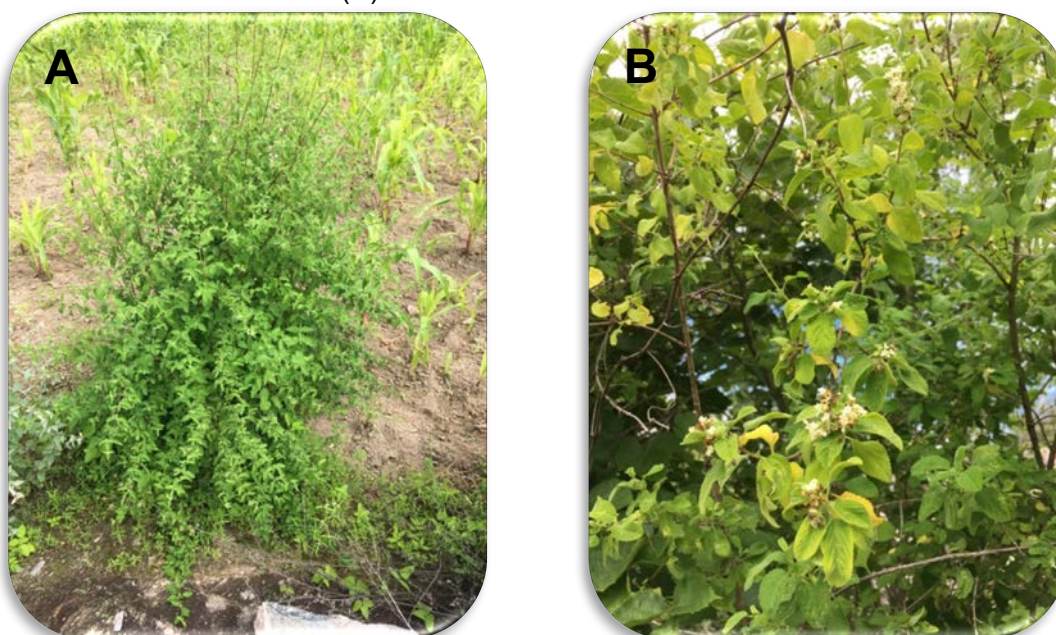
Nesta etapa, realizamos os procedimentos contidos na Figura 6.

Figura 6 - Fluxograma da etapa 2, intitulada de “Espécie alvo”



Lippia origanoides Kunth foi a espécie que mais se destacou nos testes antimicrobianos com cepas multirresistentes isoladas. Para esta foi realizada nova coleta (Figuras 7a e 7b), no mesmo período do ano em que foi realizada a anterior, sendo a espécie submetida a extração nos mesmos moldes do item 4.1.2 e realizado fracionamento com solventes de polaridades crescentes.

Figura 7 - (A) Visão geral do arbusto alecrim-de-caboclo (*Lippia origanoides* Kunth) e detalhe das folhas e flores (B)

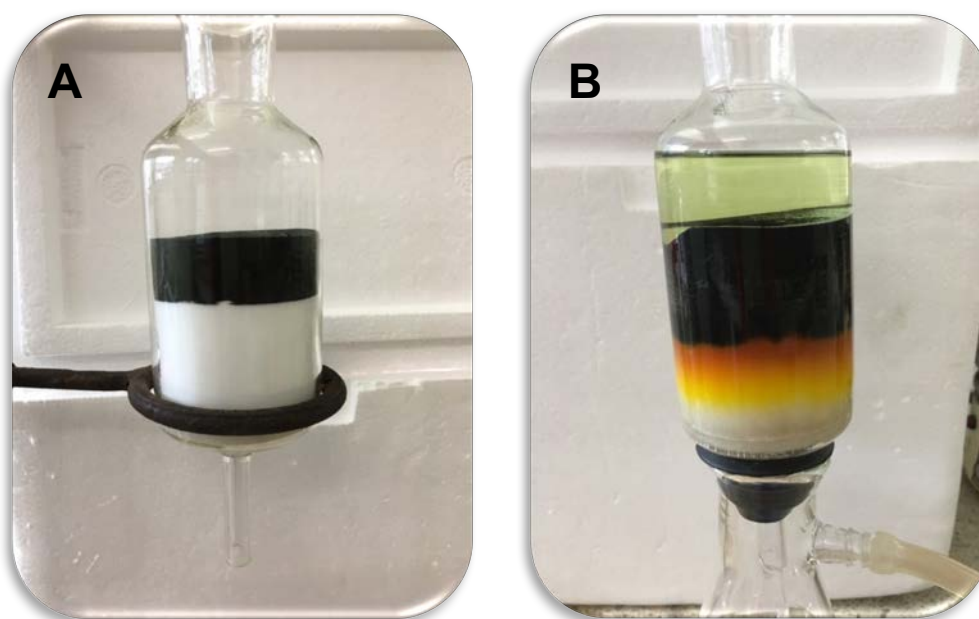


Fonte: Autor

4.2.1 Fracionamento (Coluna Filtrante)

O extrato bruto foi incorporado a 1/3 do total de Silicagel 60 (Merck) da coluna (Figura 8a), enquanto os outros 2/3 foram adicionados a uma coluna pequena para iniciar o processo de partição com solventes de diferentes polaridades, iniciando com hexano (Figura 8b), seguido de acetato de etila e metanol.

Figura 8 - (A) Coluna Filtrante com topo-sólido já adicionado à sílica na coluna e início da partição com o hexano (B)



Fonte: Autor

4.2.2 Análise em HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography)

Para bioprospecção das plantas, foram utilizados os módulos do equipamento CAMAG HPTLC (Figura 9a) que consiste em módulo de aplicação das amostras automatizado (Automatic TLC Sampler 4) (Figura 9b), módulo de eluição das placas (Automatic Development Chamber ADC2) (Figura 9c) e software integrado WINCATS (versão 1.4.4.6337), sendo ainda utilizado 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 (CAMAG TLC Visualizer) (Figura 9d). 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 distancia de 8mm do fundo e 20 mm do lado, tendo espaço entre as aplicações de 12 mm, com taxa de aplicação constante de 150 nL / sob um fluxo de gás N₂.

Figura 9 - Módulos CAMAG HPTLC (A); CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (B); CAMAG Automatic Development Chamber ADC2 (C); CAMAG TLC Visualizer (D).

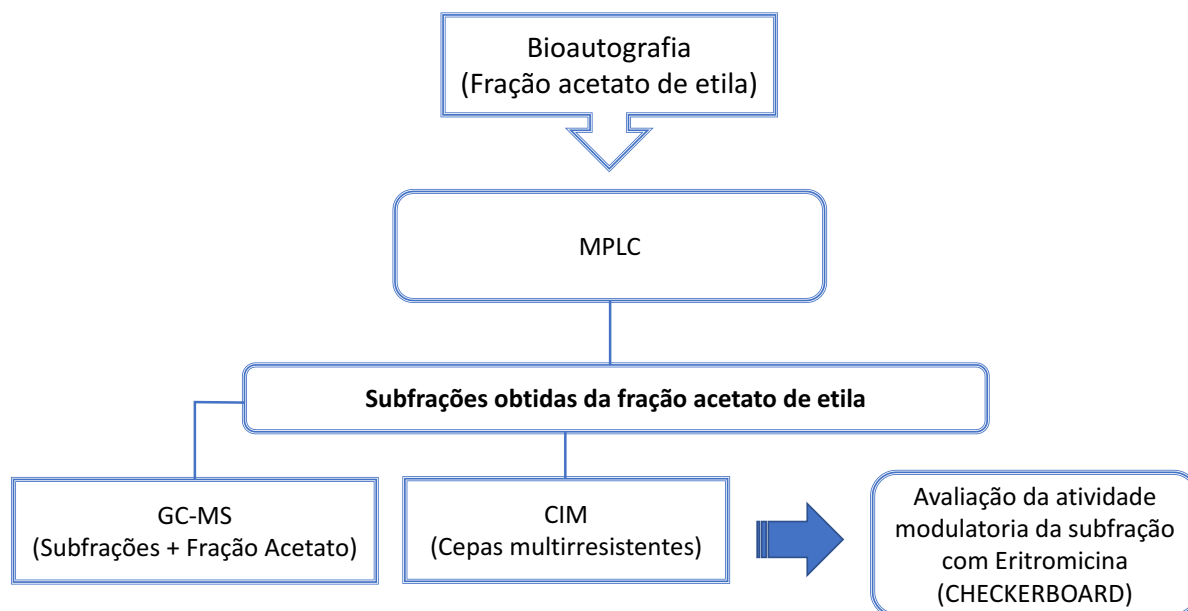


Fonte: Autor

4.3 FRAÇÃO ALVO

Para realizarmos a última etapa deste trabalho, os procedimentos foram organizados na Figura 10.

Figura 10 - Fluxograma da etapa 3, intitulada de “Fração alvo”



Após os testes realizados com as frações provenientes do fracionamento por coluna filtrante, a fração que apresentou melhores resultados nos testes antimicrobianos com cepas multirresistentes isoladas foi submetida a bioautografia e em seguida foi fracionada no MPLC e suas respectivas frações foram analisadas em GCMS, também foi determinada suas CIM's e avaliado a atividade modulatória destas subfrações com eritromicina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isolados e resistentes ao antibiótico.

4.3.1 Bioautografia

O método bioautográfico foi realizado com a fração que se destacou nos testes antimicrobianos, visando determinar um melhor sistema eluente para a etapa seguinte de separação desta fração em coluna.

Foram aplicados 10µL da fração nas placas de CCD. As amostras das frações foram aplicadas na placa com bandas de 9,5 mm de largura, com distancia de 8mm do fundo e 20 mm do lado, com taxa de aplicação constante de 150 nL / sob um fluxo de gás N₂. Para cada teste foi usada uma placa de CCD 10x10 cm e foram aplicados

4 produtos-teste. Foram analisados dois sistemas eluentes diferentes (Clorofórmio 95: 5 Metanol) e (Clorofórmio 90: 10 Metanol).

Em seguida, o inóculo foi preparado com suspensão microbiana correspondente a $1,5 \times 10^6$ UFC/mL e 100 µL desta suspensão do micro-organismo-teste (UFPEDA 728) foi misturado com 9 mL do ágar Mueller-Hinton (Figura 11), sendo o mesmo colocado cuidadosamente sobre a placa de CCD em uma placa de Petri estéril, após este processo as placas foram incubadas por 24h a $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.

A última etapa correspondeu à revelação das placas de CCD com solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). Cada placa de CCD foi borrifada com 1 mL da solução. As placas foram incubadas por mais 4 horas e os halos de inibição do crescimento foram observados, definindo qual o sistema eluente mais eficiente na separação dos compostos bioativos. Os testes com o inóculo bacteriano foram realizados em triplicata.

4.3.2 MPLC (Medium-Pressure Liquid Chromatography)

A fração mais ativa, proveniente da coluna filtrante, foi submetida a novo procedimento de separação em equipamento de cromatografia de média pressão, Flash Isolera One (Biotage, Uppsala, Suécia), sendo as amostras incorporadas em pré-colunas de sílica KP-Sil e então conectadas a uma coluna KP-Sil 50 g com limite de pressão de 100 psi (7 bar). Como fase móvel foi utilizada uma curva de gradiente com o sistema eluente previamente definido pelos resultados obtidos pela bioautografia.

4.3.3 GC-MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry)

A fração mais ativa e suas subfrações foram analisadas através de cromatografia gasosa-espectrometria de massas (GC-MS) utilizando um espectrógrafo Shimadzu modelo QP2010 GCMS em um sistema operado por impacto de elétrons (70eV) e a temperatura do injetor foi de 260°C , com uma razão de divisão de 1:5. Foi utilizada uma coluna DB5 - MS [30 m x 0,25 milímetros ID, espessura do filme 0,25 µm 5% reticulado fenil-metilpolisiloxano] (Agilent J & W colunas GC), com hélio como gás transportador, com um fluxo de coluna de 1,3 mL/min, e volume de injeção de 1 mL, a temperatura do injetor a 260°C e à pressão de 97,4 kPa. Uma mistura de hidrocarbonetos lineares (C9-C20, C21-C40), foi injetada

sob as mesmas condições, a fim de identificar os constituintes químicos. Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados do equipamento (FFNSC1.3.lib, WILEY7.LIB, NIST08s.LIB, MY LIBRARY.lib).

4.3.4 Método de Microdiluição em caldo (Checkerboard)

Para realizar o método de modulação por checkerboard (modelo 7x7) das frações e subfrações com eritromicina frente as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas e resistentes a eritromicina foi utilizado o método de microdiluição em caldo para determinar CIM das frações, subfrações e eritromicina, seguindo o modelo descrito no item 4.1.5.3. Foram utilizadas três cepas de *S. aureus* (UFPEDA 700, 728 e 732) pois foram as bactérias que se mostraram mais sensíveis aos produtos teste.

Foi realizada 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 625nm. Todas as substancias teste 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 100 µL de Mueller-Hinton foram distribuídos ao longo de uma placa estéril de microtitulação com fundo em formato arredondado, após isto, 100 µL da solução mãe da amostra A (eritromicina) 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 Mueller-Hinton caldo), controle positivo (meio + suspensão), coluna com apenas a amostra A (eritromicina) 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 por 24 horas. Após o período de incubação foi aplicado um corante revelador (resazurina), capaz de exibir de forma mais precisa se houve ou não turbidez no poço (WHITE et al., 1996; OSBURN 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 (Σ CIF),

onde $CIF (A \text{ ou } B) = CIM \text{ do antibiótico A (ou B) em combinação} / CIM \text{ do antibiótico A (ou B) sozinho}$, sendo que um ΣCIF menor ou igual a 0,5 corresponde a um efeito sinérgico, ΣCIF menor ou igual a 0,75 corresponde a um efeito parcialmente sinérgico, enquanto que um ΣCIF maior a 4,0 corresponde a antagonismo, e um ΣCIF entre 0,75 - 4,0, corresponde à indiferença (HALL; MIDDLETON; WESTMACOTT, 1983; FERNÁNDEZ CUENCA et al., 2003). Todos os ensaios foram feitos em triplicata, em diferentes intervalos de tempo.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Analisou-se a semelhança do perfil fitoquímico das 22 plantas estudadas. Em uma análise combinatória aos pares, os extratos foram considerados similares quando um mesmo composto estava presente (+) ou ausente (-) na comparação entre as duas espécies. Esta semelhança foi expressa em porcentagem, relacionando o número de metabólitos em comum com o total (13 grupos de metabólitos secundários) que foi testado qualitativamente (ARAUJO et al., 2015). As espécies só foram consideradas semelhantes quando o percentual de similaridade foi igual ou superior a 75%.

O teste de Shapiro-Wilk confirmou a normalidade dos dados obtidos na quantificação dos teores. Os dados foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão e foram analisados utilizando o teste de ANOVA seguido do teste de Tukey. O teste de correlação de Person só pode ser utilizado para comparar os teores de compostos fenólicos totais e taninos do GIII com suas respectivas médias dos halos obtidos no teste de disco frente aos micro-organismos Gram-positivos. O programa BioEstat 5.3 foi utilizado para realização das análises estatísticas.

Foram considerados para pesquisa a respeito de possíveis atividades biológicas os compostos que apresentaram, simultaneamente, índice de similaridade (SI) acima de 90, quando comparados com os bancos de dados do CG, e porcentagem de área acima de 1%. As atividades biológicas foram pesquisadas no Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical databases.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 BIOPROSPECÇÃO

5.1.1 Caracterização Química dos Extratos

Os testes de cromatografia em camada delgada (CCD) mostraram a presença de alcaloides, antrona e antranol, antraquinonas, derivados antracênicos, naftoquinonas, compostos fenólicos (fenóis simples, flavonoides, taninos e cumarinas), saponinas, terpenoides, esteroides e xantinas. Todos os grupos de metabólitos estavam presentes em pelo menos uma das espécies avaliadas e os compostos fenólicos, derivados antracênicos e saponinas destacaram-se por estarem presentes no maior número de amostras, excetuando *B. diffusa* e *C. tapia*. As espécies que se sobressaíram em diversidade de compostos foram *A. cearensis* e *E. velutina*, com ausência apenas de derivados antracênicos e xantinas (Tabela 3).

Para a avaliação de similaridade fitoquímica das espécies *D. ambrosioides* possuiu 100% de similaridade com *C. aurantium*, assim como *S. brasiliensis* x *A. colubrina*, *A. cearensis* x *E. velutina* e *A. occidentale* x *E. velutina*. Ainda foi observado que *C. jamacaru* foi a espécie que mais apresentou similaridades com outras plantas (5 espécies). Quando observado os percentuais de similaridade dos grupos estudados, foi possível identificar que as plantas do GIII obtiveram 7 combinações similares de 28 possíveis dentro do próprio grupo, enquanto que o GI e o GII mostraram 4 e 1 combinação similar de 21 possíveis, respectivamente. (Tabela 4)

A presença de compostos fenólicos em todas as espécies investigadas na CCD ocorre por este grupo de metabólito secundário ser um dos mais diversos encontrados numa ampla variedade de frutas, legumes, nozes, sementes, caules e flores, bem como chá, vinho, inclusive em própolis e mel (CETIN-KARACA; NEWMAN, 2015), isto é melhor observado no HPTLC, com a placa de compostos fenólicos do GI e GIII, por exemplo (Figura 11).

Tabela 3 - Caracterização fitoquímica dos extratos de plantas selecionadas pelo método etnodirigido na comunidade do Carão, Altinho-PE, citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias.

Espécies/Classe de Metabólito		Alcaloides	Antrona e Antraol	Antraquinona	Compostos fenólicos	Cumarinas	Derivados antracênicos	Flavonoides	Taninos	Mono, sesqui e diterpenos	Naftoquinonas	Saponinas	Triterpenos e esteróides	Xantinas
GI	<i>Dysphania ambrosioides</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
	<i>Chloroleucon extortum</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
	<i>Citrus x aurantium</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
	<i>Cleome spinosa</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	<i>Lippia origanoides</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Plectranthus amboinicus</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
	<i>Ziziphus joazeiro</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
GII	<i>Boerhavia diffusa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cedrela odorata</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Cereus jamacaru</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	<i>Crateva tapia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Libidibia ferrea</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
	<i>Spondias tuberosa</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
GIII	<i>Amburana cearensis</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Anacardium occidentale</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
	<i>Erythrina velutina</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Maytenus rigida</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+

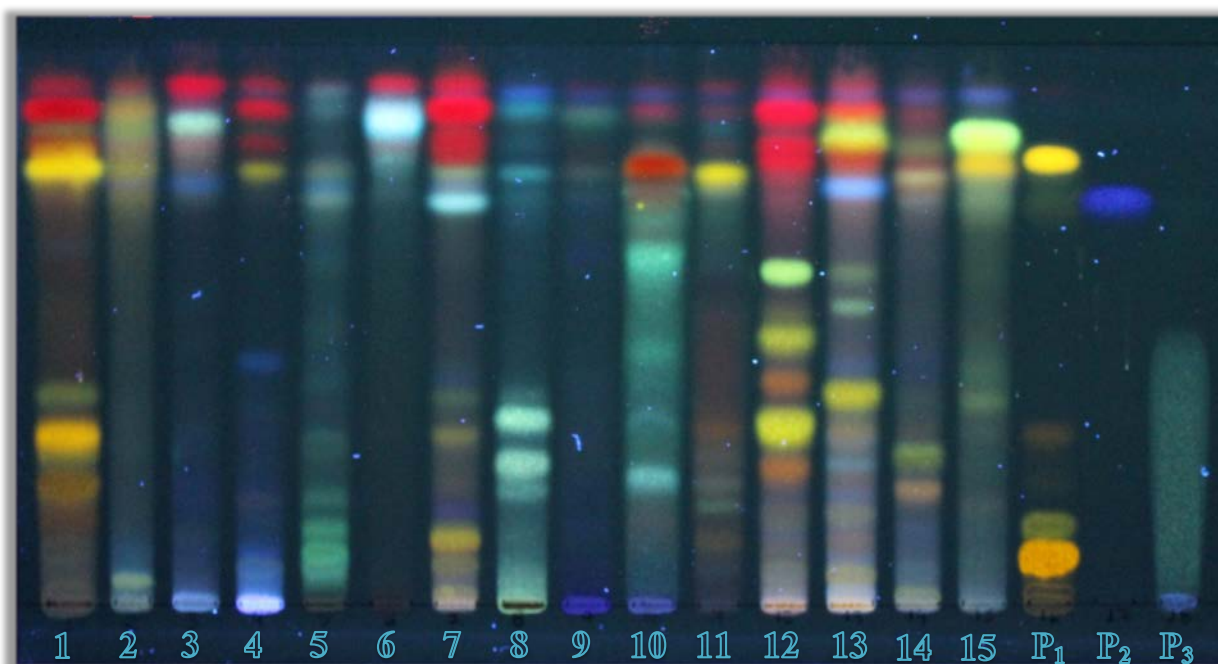
GI- Plantas citadas como antimicrobianas, **GII-** Plantas citadas como anti-inflamatórias, **GIII-** Plantas citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias; (-) = ausência; (+) = presença.

Tabela 4 - Matriz de comparação de similaridade fitoquímica entre as espécies citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias pela comunidade do Carão, Altinho-PE, a partir de triagem fitoquímica por Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

X	Da	Ce	Cau	Cs	Lo	Pa	Zj	Bd	Co	Cj	Ct	Lf	Sb	St	Ac	Ao	Aco	Ev	Mr	Mt	Mu	Hi
Da																						
Ce	54%																					
Cau	100%	54%																				
Cs	85%	69%	85%																			
Lo	69%	38%	69%	54%																		
Pa	77%	77%	77%	77%	46%																	
Zj	77%	77%	77%	77%	62%	85%																
Bd	23%	69%	23%	38%	8%	46%	46%															
Co	46%	62%	46%	62%	77%	54%	69%	31%														
Cj	85%	54%	85%	85%	69%	77%	77%	23%	62%													
Ct	46%	46%	46%	46%	31%	54%	54%	77%	23%	46%												
Lf	77%	54%	69%	69%	69%	62%	62%	23%	77%	54%	15%											
Sb	31%	77%	31%	46%	46%	54%	54%	62%	69%	31%	38%	62%										
St	69%	54%	69%	85%	69%	62%	62%	23%	77%	69%	31%	85%	62%									
Ac	77%	46%	77%	77%	77%	69%	69%	15%	69%	92%	38%	62%	38%	77%								
Ao	31%	62%	31%	46%	62%	38%	38%	46%	69%	46%	38%	46%	85%	62%	54%							
Aco	31%	77%	31%	46%	46%	54%	54%	62%	69%	31%	38%	62%	100%	62%	38%	85%						
Ev	77%	46%	77%	77%	77%	69%	69%	15%	69%	92%	38%	62%	38%	77%	100%	54%	38%					
Mr	62%	46%	62%	62%	62%	69%	69%	31%	69%	77%	38%	62%	54%	62%	85%	54%	54%	85%				
Mt	31%	62%	31%	46%	62%	38%	38%	46%	69%	46%	38%	46%	85%	62%	54%	100%	85%	54%	54%			
Mu	46%	46%	46%	46%	77%	54%	69%	31%	85%	62%	38%	62%	69%	62%	69%	69%	69%	69%	85%	69%		
Hi	54%	69%	54%	54%	69%	77%	77%	38%	77%	54%	46%	69%	77%	69%	62%	62%	77%	62%	62%	62%	77%	

Legenda: **GI** = Da – *Dysphania ambrosioides*; **Ce** – *Chloroleucon extortum*; **Cau** – *Citrus x aurantium*; **Cs** – *Cleome spinosa*; **Lo** – *Lippia origanoides*; **Pa** – *Plectranthus amboinicos*; **Zj** – *Ziziphus joazeiro*; **GII** = **Bd** – *Boerhavia diffusa*; **Co** – *Cedrela odorata*; **Cj** – *Cereus jamacaru*; **Ct** – *Crateva tapia*; **Lf** – *Libidibia ferrea*; **Sb** – *Schinopsis brasiliensis*; **St** – *Spondias tuberosa*; **GIII** = **Ac** – *Amburana cearensis*; **Ao** – *Anacardium occidentale*; **Aco** – *Anadenanthera colubrina*; **Ev** – *Erythrina velutina*; **Mr** – *Mimosa tenuiflora*; **Mu** – *Myracrodruon urundeuva*; **Hi** – *Handroanthus impetiginosus*. Valores >75% foram considerados indicativos de similaridade fitoquímica.

Figura 11 - Cromatograma de caracterização para compostos fenólicos realizado em High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). Eluente: Acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5); Revelador: NEU.



Legenda: **GI** = 1 – *Lippia* sp. (alecrim de caboclo); 3 – *Z. joazeiro* (juá); 4 – *C. extortum* (jurema branca); 7 – *C. aurantium* (laranjeira); 12 – *D. ambrosioides* (mastruz); 13 – *C. spinosa*. (mussambe); 14 – *P. amboinicus* (hortelã graúda);
GIII = 2 – *E. velutina* (mulungu); 5 – *M. tenuiflora* (jurema preta); 6 – *M. rigida* (bom nome); 8 – *H. impetiginosus* (pau d'arco roxo); 9 – *A. occidentale* (caju roxo); 10 – *M. urundeuva* (aroeira); 11 – *A. colubrina* (angico); 15 – *A. cearensis* (imburana açu);
P₁ – rutina; **P**₂ – ácido gálico; **P**₃ – ácido elágico.

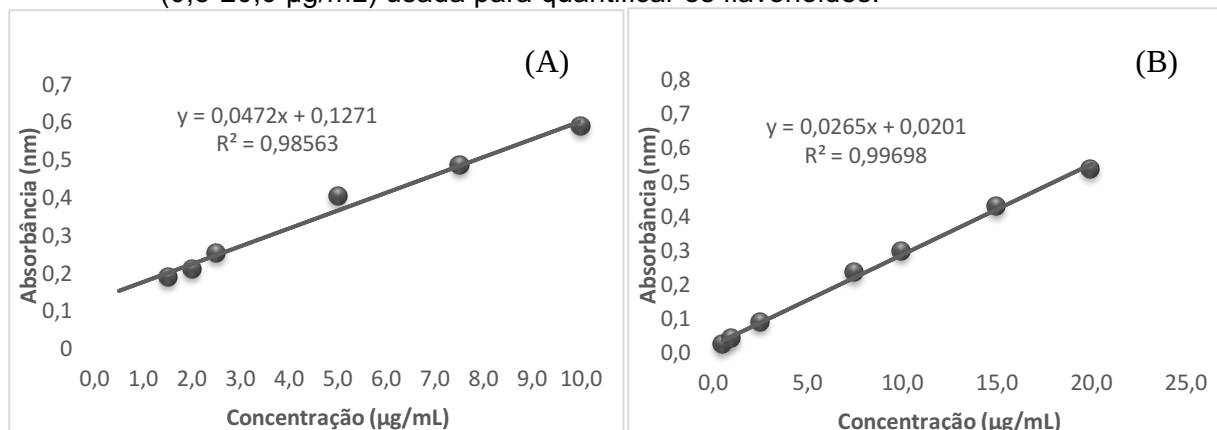
Ainda que técnicas mais modernas para identificação de compostos sejam empregadas, muitas vezes com mais especificidade, como a *Gas chromatography-mass spectrometry* (GC-MS) ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), este último, inclusive, vem substituindo grande parte das análises de rotina, mas a cromatografia em camada delgada ainda é amplamente utilizada, uma vez que permite a separação de misturas com material muito simples e barata (KREISBERGER et al., 2015).

5.1.2 Determinação de Conteúdo Fenólico

Na Figura 12a pode ser observada a curva de calibração construída com ácido tânico usada para quantificar os fenóis totais e taninos e na Figura 12b a curva de calibração construída com rutina usada na quantificação dos flavonoides, onde a equação de correlação e o coeficiente de determinação podem se visualizados. As

análises de regressão das curvas de calibração estão dentro dos limites estabelecidos (mínimo aceitável $R^2 = 0,98$) e apresentam alta linearidade. O conteúdo de fenóis totais, taninos e flavonoides dos grupos de plantas citadas contra infecções causadas por fungos e bactérias e/ou inflamação são apresentados na Tabela 5.

Figura 12 - (A) curva de calibração construída com ácido tânico (0,5-10 µg/mL) usada para quantificar os fenóis totais e taninos; (b) curva de calibração construída com rutina (0,5-20,0 µg/mL) usada para quantificar os flavonoides.



De uma forma geral, foi observada uma ampla variação entre as dosagens de compostos fenólicos nos extratos analisados. Para fenóis totais, os resultados variaram de $27,6 \pm 2,6$ à $497,1 \pm 12,1$ mg/g EAT, sendo o maior teor encontrado para o extrato das cascas de *Myracrodruon urundeuva*, porém não foi encontrada diferença estatística para outras cinco espécies (*A. occidentale*, *A. colubrina*, *M. tenuiflora*, *C. odorata* e *S. brasiliensis*) enquanto que não foi detectado fenóis totais para os extratos de *D. ambrosioides*, *Z. joazeiro*, *B. diffusa*, *C. jamacaru* e *C. tapia*.

O extrato das cascas de *A. occidentale* apresentou, em média, o maior conteúdo de taninos ($460,8 \pm 15,9$ mg/g EAT), mas outras três espécies não apresentaram diferença estatística aos seus resultados (*M. urundeuva*, *C. odorata* e *S. tuberosa*). Já os extratos de *D. ambrosioides*, *C. extortum*, *C. aurantium*, *P. amboinicus*, *Z. joazeiro*, *B. diffusa*, *C. jamacaru* e *C. tapia* não apresentaram taninos.

Os extratos de *C. extortum*, *P. amboinicus*, *A. occidentale*, *A. colubrina*, *M. tenuiflora*, *H. impetiginosus*, *B. diffusa*, *C. tapia*, *S. brasiliensis* e *S. tuberosa* não exibiram flavonoides, enquanto que o extrato da casca de *E. velutina* apresentou o maior teor deste metabólito ($257,4 \pm 11,9$ mg/g ER). Esta variação entre as amostras era esperada por se tratar de extratos provenientes de diferentes espécies/órgãos vegetais e devido à presença de diferentes compostos fenólicos.

Tabela 5 - Concentração de fenóis totais, taninos e flavonoides obtidos de extratos hidroalcoólico de plantas selecionadas pelo método etnodirigido na comunidade do Carão, Altinho-PE, citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias.

Espécies/Compostos fenólicos		CFT ± DP	CTT ± DP	CF ± DP
GI	<i>Dysphania ambrosioides</i>	N/D	N/D	46,15±2,75 i
	<i>Chloroleucon extortum</i>	67,87±6,03 j	N/D	N/D
	<i>Citrus x aurantium</i>	115,89±5,75 h	N/D	101,20±4,04 h
	<i>Cleome spinosa</i>	81,84±1,81dj	14,80±1,22 h	122,84±3,88 g
	<i>Lippia origanoides</i>	326,17±4,99 g	204,33±6,89 g	196,37±18,20 f
	<i>Plectranthus amboinicus</i>	27,64±2,64 i	N/D	N/D
	<i>Ziziphus joazeiro</i>	N/D	N/D	54,33±4,66 i
	Média GI	88,49	31,30	74,41
GII	<i>Boerhavia diffusa</i>	N/D	N/D	N/D
	<i>Cedrela odorata</i>	477,78±28,24 be	447,53±28,69 c	31,80±2,37 c
	<i>Cereus jamacaru</i>	N/D	N/D	69,11±6,05 e
	<i>Crateva tapia</i>	N/D	N/D	N/D
	<i>Libidibia ferrea</i>	370,33±35,28 c	370,33±35,28 b	13,41±1,30
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	493,88±13,23 b	367,12±21,35 b	N/D
	<i>Spondias tuberosa</i>	452,56±29,33 e	452,10±7,23 c	N/D
	Média GII	256,36	233,87	16,33
GIII	<i>Amburana cearensis</i>	216,63±17,92 f	186,31±17,79 g	150,77±11,10 d
	<i>Anacardium occidentale</i>	488,43±6,58 b	460,85±15,90 c	N/D
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	492,09±3,57 b	331,24±3,52 d	N/D
	<i>Erythrina velutina</i>	186,28±12,51 a	147,88±13,83 a	257,14±11,95 a
	<i>Maytenus rigida</i>	382,43±8,33 c	296,20±9,37 e	42,20±1,87 ci
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	478,46±11,62 be	379,50±17,28 b	N/D
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	497,07±12,13 b	441,66±30,52 c	13,33±1,26 b
	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	107,22±10,46 dh	79,78±6,28 f	N/D
	Média GIII	376,00	305,30	44,67

GI- Plantas citadas como antimicrobianas, **GII-** Plantas citadas como anti-inflamatórias, **GIII-** Plantas citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias; **CFT-** Conteúdo de Fenóis Totais; **CTT-** Conteúdo de Taninos Totais; **CF-** Conteúdo de Flavonoides. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p < 0,05$); Conteúdo = mg/g de ácido tânico ou rutina por extrato; DP = Desvio-padrão; N/D = Não Detectado.

Diante disto, o grupo de plantas que foram citadas para atividade antimicrobiana e anti-inflamatória apresentou maiores teores de compostos fenólicos e taninos com 376,0 e 305,3 mg/g EAT, respectivamente, como média das espécies pertencentes ao seu grupo. Já para flavonoides, o GI se mostrou com maiores teores médios das suas plantas (74,41 mg/g ER), principalmente por apresentar mais espécies herbáceas e com extratos foliares, porém, *E. velutina* que pertence ao GIII foi a que teve o maior teor desta classe de metabólitos.

Plantas da Caatinga são indicadas apresentarem compostos fenólicos e as atividades terapêuticas atribuídas popularmente a estas espécies, são um indicativo de que estes compostos podem estar relacionados com muitas destas espécies (MONTEIRO et al., 2006b; ALENCAR et al., 2009). Araújo et al., (2008) também evidenciaram o quantitativo de taninos e flavonoides de diversas espécies da Caatinga relacionando estes com uso popular.

Os compostos fenólicos possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomodulatórias e antimicrobiana comprovadas. Atualmente, estudos apontam a eficácia deste grupo de metabólitos na ação sinérgica frente a bactérias de origem alimentar. O uso dos polifenóis como agentes antimicrobianos pode proporcionar benefícios adicionais, tanto os efeitos antioxidantes de preservação da saúde inerente a esse grupo, como tratamento de infecções. (BALOGH et al., 2011; CETIN-KARACA; NEWMAN, 2015).

O estudo de bioprospecção realizado por Siqueira et al. (2012), inclui oito espécies em comum com o presente estudo. Os autores apresentam *Mimosa tenuiflora* (jurema lisa) como a espécie com maior conteúdo de taninos, com um teor de 12,58%. Este resultado diverge dos obtidos no presente estudo, pois teores mais elevados deste metabólito foram observados nas plantas estudadas, inclusive não sendo esta a espécie que se destacou como possuidora de maior teor. Estas diferenças podem ser justificadas, no primeiro caso, pelo fato da divergência do método de extração, demonstrando a influência deste no quantitativo de compostos extraídos de espécies vegetais. No segundo caso, a análise dos taninos no estudo de bioprospecção foi realizada pelo método de difusão radial de Hagerman, sendo os métodos baseados em diferentes propriedades químicas.

No mesmo estudo o conteúdo de flavonoides também foi descrito, sendo a espécie *Myracrodruon urundeuva* (aroeira) a detentora do maior percentual (2,95%). Devido ao fato da metodologia de análise ser a mesma, baseada na complexação dos flavonoides com o alumínio, uma possível explicação seria o período de coleta das amostras, não informada no estudo, visto que podem ocorrer variações nas concentrações de metabólitos secundários nas plantas dependendo das condições ambientais diferentes em cada período do ano. Como as amostras foram coletadas no mês de janeiro, onde ocorre uma grande intensidade de radiação solar e a função de proteção solar dos flavonoides nas plantas (MELLO; SANTOS, 2001), pode haver uma relação com o aumento deste tipo de metabólito nas espécies estudadas.

A questão dos fatores ambientais influenciarem na concentração de metabólitos secundários nas plantas da Caatinga já vem sendo estudada. Diversos fatores como foto-período, intensidade luminosa e temperatura podem provocar alterações significativas nos compostos fenólicos, dentre eles taninos e flavonoides. Estudos apontam que a intensidade luminosa é capaz de influenciar na concentração e/ou composição de metabólitos secundários (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2009; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Monteiro et al. (2006b) observaram que a sazonalidade climática pode influenciar no conteúdo de taninos pois, houve um aumento no conteúdo destes metabólitos em duas espécies da Caatinga, *Anadenanthera colubrina* (Angico) e *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira), no período de estiagem na região.

Em outro estudo realizado por Peixoto Sobrinho et al. (2009) foi observado que plantas, de uma espécie da Caatinga, localizados nas bordas da mata apresentaram um teor de flavonoides maior quando comparados com indivíduos localizados no interior da mata na maior parte do ano. Porém, não ficou evidenciado a relação existente entre a pluviosidade e um aumento na produção destes metabólitos.

5.1.3 Atividade Antimicrobiana

5.1.3.1 Teste de difusão em Agar (disco)

Os extratos hidroalcoólicos das espécies *Lippia origanoides*, *A. colubrina*, *M. urundeuva*, *M. rigida*, *A. occidentale*, *M. tenuiflora* foram os que apresentaram maior

atividade frente as cepas testadas, sendo as Gram-positivas que se mostraram mais sensíveis aos extratos analisados, diferente das Gram-negativas e levedura que foram resistentes aos fitocomplexos (Tabela 6).

Analisando os parâmetros sugeridos por Alves et al. (2000), os extratos de *D. ambrosioides*, *C. extortum*, *C. aurantium*, *C. spinosa.*, *P. amboinicus*, *B. difusa*, *C. jamacaru* e *C. tapia* mostraram-se inativos para todas as cepas avaliadas, assim como os micro-organismos Gram-negativos e *Candida albicans* que foram resistentes a todos os extratos avaliados.

Os extratos que se mostraram parcialmente ativos foram: *A. cearenses*, *A. occidentale*, *M. rigida* e *M. tenuiflora* frente a *B. subtilis* com halos de $11,3\pm0,6\text{mm}$, $12,3\pm0,6\text{mm}$, $10,7\pm0,6\text{mm}$ e $12,3\pm0,6\text{mm}$, respectivamente; frente a *M. luteus*, os extratos de *A. cearenses* ($12,3\pm0,6\text{mm}$) e *E. velutina* ($12,3\pm0,6\text{mm}$) também foram parcialmente ativos para este micro-organismo.

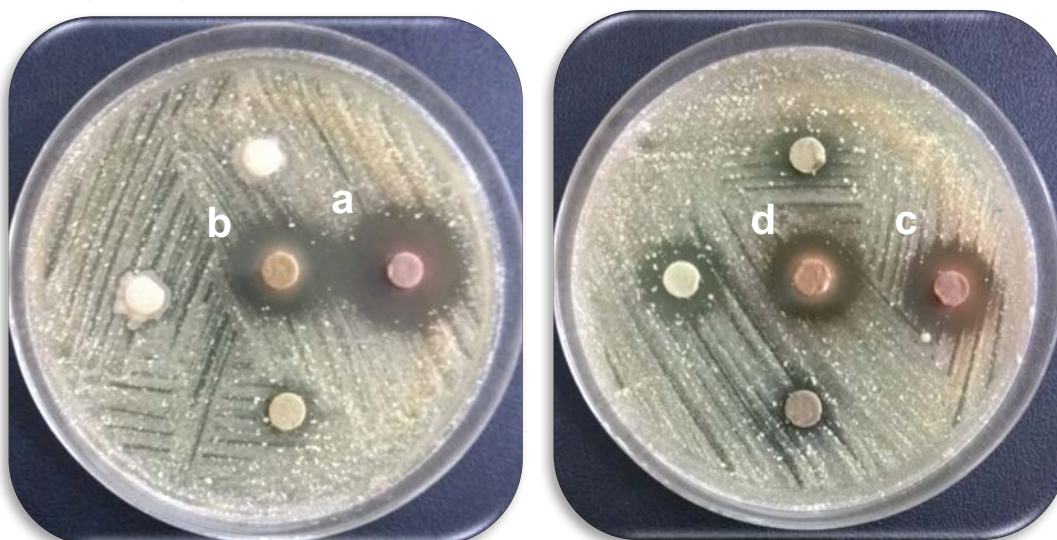
Tabela 6 - Médias dos halos de inibição antimicrobiano (em mm) dos extratos hidroalcoólicos de plantas selecionadas pelo método etnodirigido na comunidade do Carão, Altinho-PE, citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias.

ESPÉCIES/MICRO-ORGANISMOS		EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS (2,000 µg/disco) (média dos halos em mm)								
		Bactérias Gram-positivas				Bactérias Gram-negativas			BAAR	L
		Sa	Bs	Ef	MI	Ec	Pa	Sm	Ms	Ca
GI	<i>Chenopodium ambrosioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chloroleucon extortum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Citrus aurantium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cleome spinosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Lippia origanoides</i>	21,0	23,0	-	25,7	-	-	-	17,0	-
	<i>Plectranthus amboinicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ziziphus joazeiro</i>	-	-	-	13,3	-	-	-	14,7	-
GII	<i>Boerhavia diffusa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cedrela odorata</i>	15,7	-	-	16,7	-	-	-	-	-
	<i>Cereus jamacaru</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Crateva tapia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Libidibia ferrea</i>	19,3	14,7	14,7	16,3	-	-	-	20,3	-
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	18,0	16,7	16,7	15,0	-	-	-	16,7	-
	<i>Spondias tuberosa</i>	13,3	13,0	13,0	14,0	-	-	-	12,0	-
GIII	<i>Amburana cearensis</i>	14,3	11,3	14,7	12,3	-	-	-	12,0	-
	<i>Anacardium occidentale</i>	17,7	12,3	16,0	17,0	-	-	-	16,0	-
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	18,0	16,7	15,0	23,3	-	-	-	23,3	-
	<i>Erythrina velutina</i>	-	-	-	12,3	-	-	-	-	-
	<i>Maytenus rigida</i>	17,7	10,7	13,7	17,3	-	-	-	18,0	-
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	19,3	12,3	17,7	14,0	-	-	-	15,0	-
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	19,3	13,7	17,3	17,3	-	-	-	17,0	-
	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	-	14,7	14,7	-	-	-	-	17,0	-
Padrão	Gentamicina (10 µg/disco)	22,7	27,7	14,7	30,7	22,7	21,3	15,0	33,3	-
	Cetoconazol (30 µg/disco)	-	-	-	-	-	-	-	-	39,7

Legenda: GI- Plantas citadas como antimicrobianas, GII- Plantas citadas como anti-inflamatórias, GIII- Plantas citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias; BAAR – Bacilo Álcool-Ácido Resistente, L - Levedura; Sa - *Staphylococcus aureus*, Bs – *Bacillus subtilis*, Ef - *Enterococcus faecalis*, MI - *Micrococcus luteus*, Ec - *Escherichia coli*, Pa - *Pseudomonas aeruginosa*, Sm - *Serratia marcescens*, Ms - *Mycobacterium smegmatis*, Ca - *Candida albicans*; (-) – Sem atividade

Também foi observado que os extratos de *L. origanoides* com halos de $25,7 \pm 0,6$ mm (*M. luteus*), $23,0 \pm 2,0$ mm (*B. subtilis*) e $21,0 \pm 1,7$ mm (*S. aureus*); *A. colubrina* com halos de $23,3 \pm 0,6$ mm (*M. luteus*), $23,3 \pm 0,6$ mm (*M. smegmatis*) (Figura 13a) e $18,0 \pm 1,0$ mm (*S. aureus*); *M. rigida* com halo de $18,0 \pm 1,0$ mm (*M. smegmatis*) (Figura 13b); *M. tenuiflora* com halo de $19,3 \pm 1,2$ mm (*S. aureus*), *M. urundeuva* com halo de $19,3 \pm 1,2$ mm (*S. aureus*) e $17,3 \pm 1,2$ mm (*M. smegmatis*) (Figura 13c); *L. ferrea* com halos de $19,3 \pm 0,6$ mm (*S. aureus*) e $20,3 \pm 0,6$ mm (*M. smegmatis*) e *S. brasiliensis* com halo de $18,0 \pm 1,7$ mm frente a *S. aureus* foram todos classificados como fortemente ativos pelos parâmetros descritos por Alves et al. (2000).

Figura 13 - Resultado da placa de atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos frente a *Mycobacterium smegmatis*. **a)** *Anadenanthera colubrina* (23,3 mm), **b)** *Maytenus rigida* (18,0 mm), **c)** *Myracrodruon urundeuva* (17 mm), **d)** *Anacardium occidentale* (16 mm).



Fonte: Autor

Quando analisada a correlação entre os compostos fenólicos das plantas citadas no GIII e a sua atividade antimicrobiana, foi observada correlação positiva entre o teor e as cepas de *S. aureus* ($r=0,8866$; $p=0,0033$), *E. faecalis* ($r=0,8176$; $p=0,0131$) e *M. luteus* ($r=0,8176$; $p=0,0131$) no teste de disco. Da mesma forma, foi possível observar uma correlação entre os taninos e a atividade antimicrobiana, pois os extratos das plantas pertencentes ao GIII, também apresentaram correlação positiva frente a *S. aureus* ($r=0,8565$; $p=0,0066$) e *M. luteus* ($r=0,7227$; $p=0,428$) nos testes de disco.

Assim como Trentin et al. (2011) que comentaram em seus estudos sobre o potencial das plantas da Caatinga frente a micro-organismos, Rosado-Vallado et al. (2000) encontraram atividade antimicrobiana de espécies da Caatinga frente a Gram-positivos em detrimento aos Gram-negativos, as espécies da Caatinga escolhidas no presente estudo também se mostraram promissoras no estudo microbiológico, apresentando boa atividade frente a Gram-positivos.

Gonçalves, Filho e Menezes (2005), trabalharam com 17 espécies nativas, três dessas estão contidas no presente estudo (*A. occidentale*, *M. tenuiflora* e *A. colubrina*), os resultados das duas primeiras corroboram com o trabalho atual, pois mostrou que as espécies tiveram resultados apenas para Gram-positivos testados, mas o resultado de *A. colubrina* mostrou-se diferente desta investigação, haja vista que no trabalho de Gonçalves, Filho e Menezes os micro-organismos testados foram resistentes a espécie.

Akinpelu (2001) que testaram a atividade antimicrobiana de *A. occidentale* frente a três micro-organismos do presente estudo (*S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus*) e encontraram resultados parecidos com os que foram encontrados neste trabalho com halos de inibição de 17, 18 e 18 mm respectivamente. Assim como os resultados frente a *C. albicans* que também se mostraram ineficazes frente a esta levedura, igualmente ao presente estudo. Estevam et al. (2009) também testaram a atividade antimicrobiana de *M. rigida* que também mostrou resultados semelhantes aos do presente estudo no teste de difusão em agar, com resultados de 15/16 mm de halos frente a *S. aureus*.

Num estudo mais recente, Almeida et al. (2012) também realizaram um trabalho de bioprospecção antimicrobiana com espécies nativas e exóticas da Caatinga e Mata Atlântica, dentre essas: *A. cearensis*; *A. occidentale*; *A. colubrina*; *E. velutina*; *M. rigida*; *M. tenuiflora* e *M. urundeuva*. Os autores também identificaram maior potencial das espécies frente ao micro-organismo álcool-ácido resistente *M. smegmatis*. Assim como a resistência que *C. albicans* também apresentou para as espécies analisadas, igualmente ao presente estudo.

Ainda podemos analisar que compostos fenólicos no geral, taninos, flavonoides, cumarinas e terpenoides são responsáveis pela ação antibacteriana na maioria dos trabalhos citados na literatura, inclusive os fenóis são os metabólitos secundários mais abundantes nas plantas e descritos por vários autores como os

componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana de algumas espécies vegetais (DAGLIA, 2012; SILVA et al, 2010), igualmente ao presente estudo, onde observou-se correlação positiva entre o conteúdo fenólico das plantas citadas no GIII e a atividade antimicrobiana para algumas cepas analisadas no teste de disco.

Utilizando o cálculo realizado por Araújo et al. (2015) para avaliar o percentual de similaridade química entre cascas e folhas de *Anacardium humile*, *Brosimum gaudichaudii* e *Tabebuia avellanedae*, o presente estudo evidenciou um maior número de espécies similares fitoquimicamente no GIII. Além da semelhança na composição química entre os membros do GIII, este se apresenta também como o grupo com maior espectro de atividade, com todas as espécies mostrando ação antimicrobiana frente a pelo menos uma das bactérias Gram-positivas testadas.

Entre os micro-organismos Gram-positivos utilizados, destaca-se *Staphylococcus aureus* como o principal causador de várias das doenças citadas no estudo etnofarmacológico que antecedeu o presente trabalho, como furúnculo (RAZERA et al., 2009; ARNAIZ-GARCIA; ARNAIZ-GARCIA; ARNAIZ, 2015), boqueira (PARK; BRODELL; HELMS, 2011; ROCHA, MELO-FILHO, SIMOES, 2015) e bronquite (SANTOS et al., 2017). Os resultados apresentados nesta pesquisa reforçam a atividade antimicrobiana das plantas analisadas perante os micro-organismos Gram-positivos, incluindo *S. aureus*, no teste de difusão em disco.

Embora existam estudos que comparem as abordagens existentes para seleção de plantas e os resultados etnodirigidos sejam mais eficazes nesta escolha (SILVA et al., 2013), encontra-se na literatura também trabalhos que buscaram avaliar atividade antimicrobiana de plantas que são citadas para algum problema infeccioso (VIEIRA et al., 2014; CHANDER et al., 2016), mas que não se mostraram totalmente ativas. Portanto, nem todas as plantas serão ativas de fato e isto sugere algum efeito placebo ou alguma associação entre espécies que o entrevistado não citou na coleta de dados, e/ou uma interpretação equivocada por parte do pesquisador no entendimento da indicação terapêutica.

5.1.3.2 Concentração Inibitória Mínima – CIM

Os testes de CIM foram realizados com as espécies que obtiveram os melhores halos no teste de disco com cepas sensíveis da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos e depois foram utilizadas para as

mesmas espécies frente cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes.

5.1.3.2.1 Cepas sensíveis

Extratos de plantas foram considerados com boa atividade antimicrobiana quando a CIM < 100 µg/mL, atividade moderada com uma CIM de 100 a 500 µg/mL, fraca atividade com uma CIM de 501 a 1000 µg/mL e inativo com uma CIM > 1000 µg/mL (TANAKA et al., 2005). Mediante estes parâmetros, sobressaem os extratos que foram moderadamente ativos no teste de CIM: *Lippia* sp. (500 µg/mL), *A. colubrina* (500 µg/mL), *M. urundeuva* (250 µg/mL), *M. rigida* (500 µg/mL), *A. occidentale* (250 µg/mL) e *M. tenuiflora* (500 µg/mL) frente a *S. aureus*; *Lippia* frente a *B. subtilis* com CIM de 250 µg/mL; *Lippia* sp. (125 µg/mL), *A. colubrina* (250 µg/mL) e *M. rigida* (250 µg/mL) frente a *M. luteus*. Ainda destaca-se os valores de CIM de *M. urundeuva* (62,5 µg/mL) e *M. tenuiflora* (62,5 µg/mL) frente a *M. luteus* (Tabela 7).

A CIM é utilizada pela literatura como um método padrão para quantificar a suscetibilidade dos organismos aos possíveis antimicrobianos, servindo também para refinar os resultados de outros testes de suscetibilidade, como o teste de difusão em disco (ANDREWS, 2002). Desta forma, as CIM's do presente estudo ratificam os resultados obtidos no teste de difusão em disco, sendo observados melhores resultados para as plantas do GIII e GII e não para aquelas do GI, as quais foram citadas pela população para tratar apenas doenças causadas por fungos e bactérias.

As três espécies que apresentaram maiores resultados de disco e de CIM foram *M. urundeuva*, *M. tenuiflora* e *A. colubrina*. Essas espécies também fazem parte do grupo das espécies que trataram o maior número de subcategorias inflamatórias, no estudo etnofarmacológico em Altinho-PE de Ferreira-Junior, Ladio e Albuquerque (2011). Esse quadro pode expressar uma ideia de que quando uma infecção é a causa da inflamação por conta da presença de um agente microbiano (bactéria ou fungo), a eliminação desse agente, frequentemente, leva a uma resolução do quadro inflamatório. Por esta razão, plantas com indicação popular para uso antiinflamatório podem, na verdade, possuir uma função antibiótica ao invés de estarem atuando de fato na cascata de mediadores inflamatórios (CABRAL, 2014).

Tabela 7 - Concentrações inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos hidroalcoólicos de plantas citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias frente a micro-organismos Gram-positivos que mostraram halos $>15\text{mm}$ no teste de disco.

ESPÉCIES/MICRO-ORGANISMOS		MICRO-ORGANISMOS GRAM-POSITIVOS (média das concentrações em µg/mL)		
		Sa	Bs	MI
GI	<i>Lippia origanoides</i>	500±0,0	250±0,0	125±0,0
GII	<i>Cedrela odorata</i>	500±0,0	>2000	62,5±0,0
	<i>Libidibia ferrea</i>	250±0,0	2000	31,25±0,0
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	500±0,0	>2000	62,5±0,0
GIII	<i>Anacardium occidentale</i>	250±0,0	>2000	62,5±0,0
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	500±0,0	1000±0,0	250±0,0
	<i>Maytenus rígida</i>	500±0,0	>2000	250±0,0
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	500±0,0	>2000	62,5±0,0
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	250±0,0	>2000	62,5±0,0

Legenda: **GI**- Plantas citadas como antimicrobianas, **GII**- Plantas citadas como anti-inflamatórias, **GIII**- Plantas citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias; **Sa**- *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), **Bs** – *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), **MI** - *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06)

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). Nesta perspectiva, seis espécies, que foram selecionadas para a determinação da CIM, como *L. origanoides*, *A. colubrina*, *M. urundeuva*, *M. rígida*, *A. occidentale* e *M. tenuiflora* também foram aquelas que apresentaram os maiores teores de taninos no estudo. Ainda foi encontrada correlação positiva entre o teor de taninos e a atividade antimicrobiana das plantas do GIII para as cepas analisadas no teste de disco. Este resultado é corroborado por dados da literatura que citam esta atividade como

característica para tal grupo de metabolitos secundários (SCALBERT, 1991; SANTOS; MELLO, 2002; ALMEIDA et al., 2005; OBIANG-OBOUNOU; RYU, 2013).

Os resultados encontrados podem apontar uma possível falha na interpretação dos dados etnobotânicos, evidenciando que plantas com indicação popular para uso anti-inflamatório possuem uma função antimicrobiana e em um planejamento experimental antimicrobiano, essas espécies poderiam ficar fora da seleção.

Para explicar a relação entre a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória é importante saber o papel da inflamação na defesa do corpo à agentes nocivos, diluindo, destruindo ou neutralizando-os. Vários tipos de moléculas e células são essenciais nos processos inflamatórios, como proteínas plasmáticas, macrófagos, monócitos e leucócitos polimorfonucleares. No caso de um processo inflamatório decorrente de uma infecção, estas moléculas circulam na corrente sanguínea e são trazidas pelas reações inflamatórias para o local da infecção, com a função de eliminar os micro-organismos presentes (KUMAR et al., 2008). Com a eliminação do patógeno, seja por ação do próprio sistema imunológico ou pelo efeito dos antibióticos administrados, o processo inflamatório diminui. Observa-se então a diminuição de sintomas como edema, calor, rubor e dor, característicos da inflamação, portanto após o uso de uma planta com ação antimicrobiana, é provável que a população credite a esta a atividade anti-inflamatória.

As dificuldades na interpretação dos dados coletados com a população, começam a ganhar um viés de maior importância, uma vez que a percepção de doenças pode afetar a avaliação das respostas obtidas, consequentemente, podendo afetar a seleção de plantas medicinais (HERNDON et al., 2009; REYS-GARCIA, 2010). Partindo do princípio da complexidade na interpretação do estudo etnofarmacológico, Ferreira-Junior et al. (2011) também corroboram com a ideia de que a inflamação ser confundida com outros processos médicos, já que eles observaram uma variação das plantas utilizadas para tratar inflamações de acordo com o tipo de inflamação percebida pelo entrevistado.

5.1.3.2.2 Cepas *Staphylococcus aureus* multirresistentes

Diante dos resultados obtidos nos testes com cepas sensíveis e já discutidos neste trabalho, as espécies só tiveram bons resultados para micro-organismos Gram-

positivos e houve a necessidade de avaliar esta atividade também frente cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da UFPE.

Inicialmente foi analisado o perfil de sensibilidade das cepas existentes e selecionado apenas as que tivessem resistência a Eritromicina para estudos futuros de conjugação e sinergismo com o antibiótico, esta análise foi realizada conforme resultados da Tabela 8.

Tabela 8 - Perfil de sensibilidade das cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes

Micro-organismos	Clin	Eri	Cef	Gen	Oxa	Clo	Van	Cipro
670	R	R	S	S	S	S	S	S
671	R	R	R	R	R	S	S	R
672	R	R	S	S	S	S	S	S
691	R	R	S	S	S	S	S	S
700	R	R	S	S	S	S	S	S
725	R	R	S	R	S	S	S	I
728	R	R	S	R	S	I	S	R
729	R	R	S	S	S	S	S	S
730	R	R	S	S	S	S	S	S
732	R	R	R	R	R	S	S	R

Legenda: 670-732 cepas de isolados clínicos de *S. aureus* do Hospital das Clínicas da UFPE; **Clin** – Clindamicina; **Eri** – Eritromicina; **Cef** – Cefoxitina; **Gen** – Gentamicina; **Oxa** – Oxacilina; **Clo** – Cloranfenicol; **Van** – Vancomicina; **Cipro** – Ciprofloxacino; **R** - Resistente; **I**: Resistência Intermediária; **S**: Sensível

Os resultados referentes aos testes de determinação da CIM dos extratos frente a cepas isoladas mostraram que, segundo Tanaka et al. (2005), a maioria das plantas foram inativas frente a esses micro-organismos, menos *L. origanoides*, que só não foi ativa frente ao micro-organismo 729, *S. brasiliensis* que foi ativa frente a 671 e 725, e *M. urundeuva* que foi ativa frente ao 730 (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentrações inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos hidroalcoólicos de plantas citadas como antimicrobianas e/ou anti-inflamatórias frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes.

ESPÉCIES/MICRO-ORGANISMOS		MICRO-ORGANISMOS GRAM-POSITIVOS (média das concentrações em $\mu\text{g/mL}$)									
		670	671	672	691	700	725	728	729	730	732
GI	<i>Lippia origanoides</i>	500 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0
	<i>Cedrela odorata</i>	>2000	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	>2000	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0
GII	<i>Libidibia ferrea</i>	>2000	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	>2000	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	>2000	500 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0
	<i>Anacardium occidentale</i>	>2000	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0
GIII	<i>Anadenanthera colubrina</i>	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0
	<i>Maytenus rigida</i>	2000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	>2000	1000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	1000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0

Legenda: 670-732 cepas de isolados clínicos de *S. aureus* do Hospital das Clínicas da UFPE; **GI-** Plantas citadas como antimicrobianas, **GII-** Plantas citadas como anti-inflamatórias, **GIII-** Plantas citadas como antimicrobianas e anti-inflamatórias.

C. odorata, *L. ferrea*, *A. occidentale*, *A. colubrina*, *M. rigida* e *M. tenuiflora* foram as espécies que apresentaram inatividade frente a todas as cepas testadas, já *S. brasiliensis* também apresentou inatividade frente as cepas selecionadas, mas ainda obteve fraca atividade frente ao micro-organismo 671 (500 µg/mL) e 725 (500 µg/mL), da mesma forma acontecendo com *M. urundeuva* que só teve fraca atividade frente ao 730 com CIM de 500 µg/mL, pois para as outras cepas a espécie também se mostrou inativa.

Ainda seguindo com as análises dos parâmetros de Tanaka et al. (2005), *L. origanoides* só foi inativa frente a cepa 730, mas mostrou-se com fraca atividade frente as cepas 670, 672, 691, 728, 729, 732 com CIM de 500 µg/mL para estas cepas e atividade moderada frente a 671 (250 µg/mL), 700 (250 µg/mL) e 725 (125 µg/mL).

Muito embora estas espécies analisadas tenham tido boa atividade frente as cepas sensíveis e quando testadas frente a cepas multirresistentes tenham sido pouco efetivas se explica pela dificuldade que os fitocomplexos possuem para encontrar um mecanismo de ação que seja efetivo contra essas bactérias (MENEGOTTO; PICOLI, 2007; SANTOS et al., 2007), o que mostra a importância destes estudos, pois mesmo que estas espécies não sejam mais virulentas que as cepas sensíveis, mas para o seu combate existem armas reduzidas na terapêutica (MENEZES et al., 2004).

Os micro-organismos isolados resistentes a Oxacilina, são denominadas (MRSA) e são responsáveis por infecções graves em hospitais, mas vem aumentando os casos de infecções causadas por este patógeno na comunidade, sendo então chamados de CA-MRSA, com isso se tornando um importante problema de saúde pública (GELATTI et al., 2009). As cepas 671 e 732 foram resistentes a oxacilina, mas mesmo tendo mecanismo de resistência a β -lactâmicos no geral, o extrato de *L. origanoides* se mostrou moderadamente ativo frente a estas cepas.

5.2 ESPÉCIE ALVO

Após identificar *L. origanoides* como a espécie com melhor atividade nos testes frente as cepas sensíveis e multirresistentes, seu extrato bruto foi fracionado com hexano, acetato de etila e metanol para realização de triagem fitoquímica por HPTLC de compostos fenólicos e terpenoides, além da determinação de suas respectivas CIM's.

5.2.1 HPTLC (High-Performance Thin-Layer Chromatography)

Utilizando sistema eluente e revelador específico determinados por Wagner e Bladt (1995), foi possível observar uma boa separação dos compostos fenólicos e terpenoides contidos no extrato bruto de *L. origanoides*, com ausência dos terpenoides na fração metanólica, dos compostos fenólicos na fração hexânica e com a fração acetato de etila contendo todos os compostos analisados, menos taninos (Tabela 10).

Tabela 10 - Caracterização fitoquímica do extrato bruto da folha de *Lippia origanoides* Kunth e suas frações por HPTLC utilizando sistema eluente e reveladores específicos propostos por Wagner e Bladt (1995).

Grupo Metabólico/Frações	Extrato Bruto	Fração hexano	Fração acetato de etila	Fração metanol
Mono, sesqui e diterpenos	+	+	+	-
Triterpenos e esteróides	+	-	+	-
Compostos fenólicos	+	-	+	+
Flavonoides	+	-	+	+
Taninos	+	-	-	+

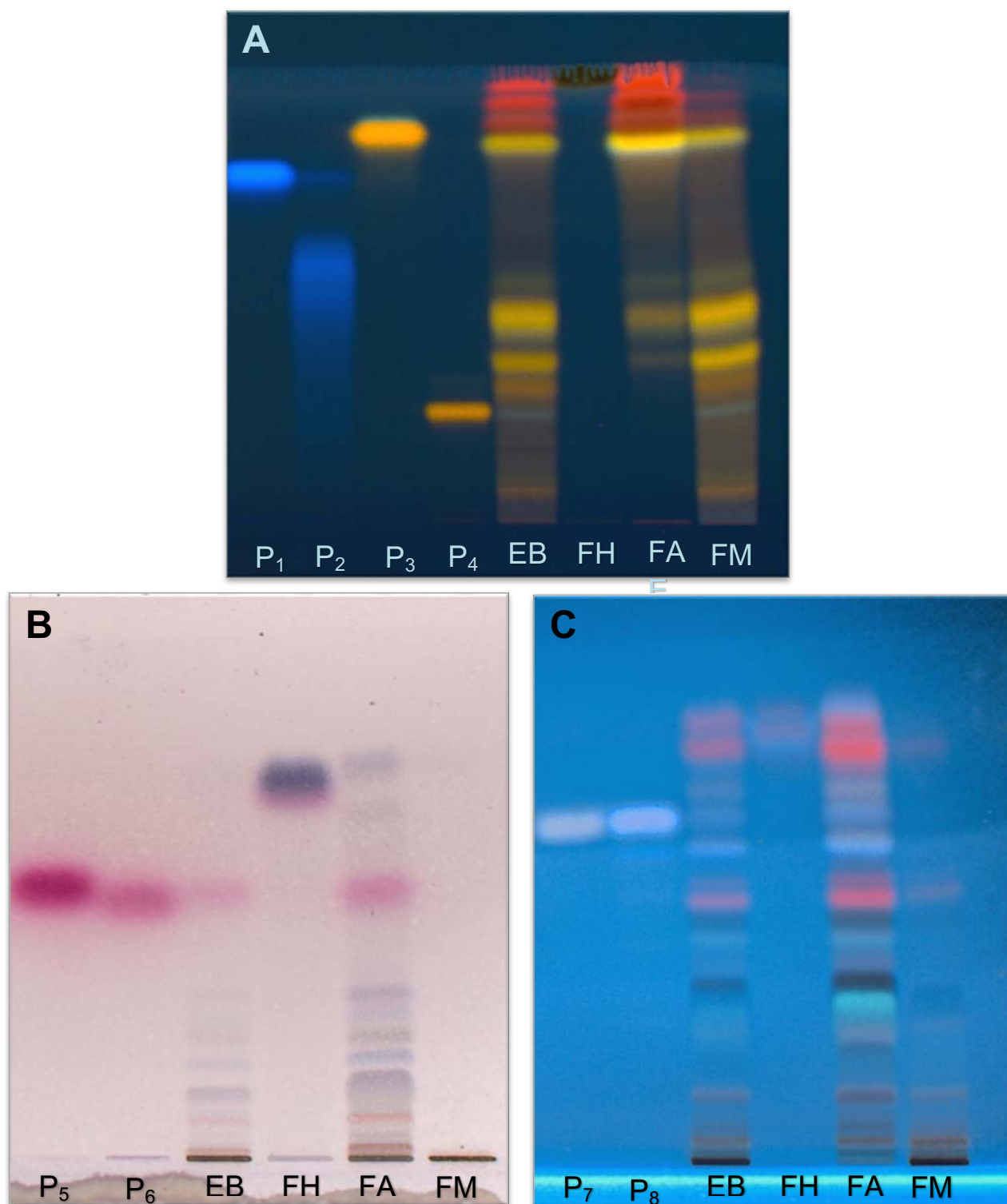
Legenda: (-) = ausência; (+) = presença.

Vizzotto e Pereira (2011), testaram diferentes solventes com baixa, intermediária e alta polaridade de amora-preta para extração de compostos fenólicos e igualmente ao presente estudo, o solvente hexano (de menor polaridade), ao ser utilizado, não apresentou resultados satisfatórios, uma vez que não foi capaz de extrair os compostos fenólicos. Do mesmo modo que a presente análise fitoquímica (Figura 14a), nos estudos de Vizzotto e Pereira (2011) os solventes de maior polaridade (acetona, etanol e metanol) foram mais eficientes na extração dos polifenóis.

Buscando explicar essa afinidade por solventes de maior polaridade, Liu, Ang e Springer (2000), reforçam a ideia de que para eficiente extração de compostos fenólicos de uma matriz vegetal, é necessário aumento da solubilidade e polaridade do sistema, isto deve ser feito com a combinação de solventes, como os hidrometanólicos, hidroetanólicos, não apenas utilizá-los em sua natureza pura.

Outro detalhe neste resultado obtido, foi afinidade dos terpenoides pelas frações hexânica e acetato de etila, não se mostrando presente na fração metanólica (Figura 14b e 14c), que é a mais polar. Isto já se esperava pela característica de solubilidade que esses compostos apresentam em solventes de baixa e intermediária polaridade (ALCANTARA et al., 2010; LOOMIS; CROTEAU, 2014; HILL; CONNOLLY, 2017)

Figura 14 - Placas cromatográficas de compostos fenólicos, revelada com Reagente NEU (A) monoterpeno, revelada com vanilina sulfurica (B) e Triterpenos e esteroides, revelado com Lieberman-Burchard (C) do extrato bruto das folhas de *Lippia origanoides* Kunth e suas frações.



Legenda: P₁ – Ácido Gálico; P₂ – Ácido Tânico; P₃ – Quercetina; P₄ – Rutina (A); P₅ – Timol; P₆ – Carvacrol (B); P₇ – Stigmasterol; P₈ – β -Sitosterol (C); EB – Extrato Bruto; FH – Fração hexânica; FAE – Fração Acetato de Etila; FM – Fração Metanólica

Fonte: Autor

5.2.2 Concentração Inibitória Mínima (cepas *Staphylococcus aureus* multirresistentes)

Foram realizados testes de determinação de CIM comparativa para o extrato bruto das folhas de *L. origanoides* e suas frações, onde os melhores resultados foram observados na fração acetato de etila para as 10 cepas testadas, a fração hexânica obtendo resultados semelhantes ao extrato bruto e a fração metanólica sendo inativa frente as cepas analisadas (Tabela 11).

Tabela 11 - Concentrações inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato hidroalcoólicos da folha de *Lippia origanoides* e suas frações (hexano, acetato de etila e metanol) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes.

MICRO-ORGANISMOS/FRAÇÕES		Extrato Bruto	Fração hexânica	Fração Acetato de Etila	Fração Metanólica
MICRO-ORGANISMOS GRAM-POSITIVOS (média das concentrações em $\mu\text{g/mL}$)	670	500 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	>2000
	671	1000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	>2000
	672	2000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	>2000
	691	500 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	>2000
	700	250 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	125 $\pm$ 0,0	>2000
	725	2000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	>2000
	728	500 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	125 $\pm$ 0,0	>2000
	729	500 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	>2000
	730	500 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	>2000
	732	250 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	62,5 $\pm$ 0,0	>2000

Legenda: 670-732 cepas de isolados clínicos de *S. aureus* do Hospital das Clínicas da UFPE.

Observando os parâmetros estabelecidos por Tanaka et al. (2005), o extrato bruto manteve de fraca a moderada atividade em relação ao teste de bioprospecção das espécies com CIMs variando de 1000-250 µg/mL e só foi inativo frente aos micro-organismos 672 e 725. A fração metanólica se mostrou inativa frente a todas as cepas. A fração hexânica, igualmente ao extrato bruto, também apresentou de fraca a moderada atividade com CIM's variando entre 1000-250, mas diferente do extrato bruto, so mostrou inatividade frente a cepa 672.

A fração acetato de etila foi a amostra com melhor atividade, pois mostraram atividade frente a todas as cepas, obtendo resultados fracos para 671 (500 µg/mL), 672 (1000 µg/mL) e 725 (500 µg/mL), moderados para 670 (250 µg/mL), 691 (250 µg/mL), 700 (125 µg/mL), 728 (125 µg/mL), 729 (250 µg/mL) e 730(250 µg/mL) e obteve boa atividade frente a cepa 732 com CIM de 62,5 µg/mL.

Estes resultados mostraram que as frações foram mais ativas do que o extrato bruto, indicando que o fracionamento aumentou a atividade antimicrobiana, principalmente na fração acetato de etila. Isto pode ser devido à exclusão de alguns constituintes do extrato que antagonizam os ativos reduzindo sua atividade. Esta seleção, proporcionada pelo fracionamento, pode também ter aumentado as concentrações destes compostos ativos e ampliado a ação antibiótica desta fração (TAMOKOU et al 2012).

No geral, frações com polaridades intermediárias tendem a ter melhores atividades (AHMED et al. 2015), e isto pode ser explicado pela afinidade que compostos fenólicos e alguns terpenoides apresentam com estas amostras (SOLON et al., 2012; CARVALHO et al., 2018), já que estas classes de metabólitos são responsáveis pela atividade antimicrobiana em alguns estudos na literatura (OLIVEIRA et al., 1996; CHANWITHEESUK et al. 2007; SOLON; CAROLLO; BRANDÃO, 2012; HARTANTI; SUPRIYANTO; SUGIJANTO, 2016), talvez a melhor atividade da fração acetato de etila seja proveniente desta relação entre o grupo químico presente na amostra e sua ação antimicrobiana inerente.

Ainda se ressalta a diferença de resultados que as cepas mostraram, onde algumas foram inativas ou com resultados diferentes para a mesma amostra, mesmo sendo todas de *S. aureus*. Essas variações na resposta antimicrobiana à cepas do mesmo micro-organismo podem ser explicadas pela formação genética que é

intrínseca a cada espécie microbiana e pode conferir maior resistência a um mecanismo de ação para uma cepa e não para outra (TAMOKOU et al. 2012).

5.3 FRAÇÃO ALVO

Como a fração acetato de etila do extrato bruto hidroetanólico das folhas de *L. origanoides* foi a mais ativa no teste antimicrobiano, esta fração foi selecionada para bioautografia com objetivo de identificar o melhor sistema eluente para realização de subfracionamento utilizando Cromatógrafo Líquido de Media Pressão (MPLC), com as subfrações obtidas do MPLC, avaliar composição química no Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de massas (CG-MS), ação antimicrobiana com determinação de CIM e a modulação subfração que tiver os melhores resultados antimicrobianos com Eritromicina buscando efeito sinérgico desta interação.

5.3.1 Bioautografia

Para um melhor ajuste de método de subfracionamento em MPLC, foram realizados testes com diversas mistura de solventes visando separar melhor as bandas na placa cromatográfica da fração acetato de etila. Dentre as misturas testadas, a combinação Clorofórmio:metanol foi a que melhor separou a fração, espaçando as bandas ao máximo na placa.

Com a mistura escolhida, ocorreram testes com proporções diferentes de cada solvente para definir o sistema eluente ideal, restando duas opções, sistema Cloroformio:Metanol (95:5) ou Clorofórmio:Metanol (90:10) onde estas foram submetidas a revelação bioautográfica e o resultado pode ser avaliado nas Figuras 15 e 16.

Na mistura clorofórmio:metanol (95:5), é possível observar que os compostos ainda se encontram muito presos na base da placa, necessitando um sistema ainda mais polar e ao aumentar a proporção de metanol para elevar a polaridade na mistura clorofórmio:metanol (90:10), já se observa que os compostos separaram mais e migraram para parte superior da placa e o halo de inibição também migra da base, na mistura 95:5, para a porção superior da placa na mistura 90:10.

Figura 15 - Placa cromatográfica da fração acetato de etila de *Lippia origanoides* com sistema clorofórmio:metanol (95:5) em revelação física de lâmpada uv254nm, uv365nm e revelação bioautográfica da cepa 728 de *Staphylococcus aureus* multirresistente.

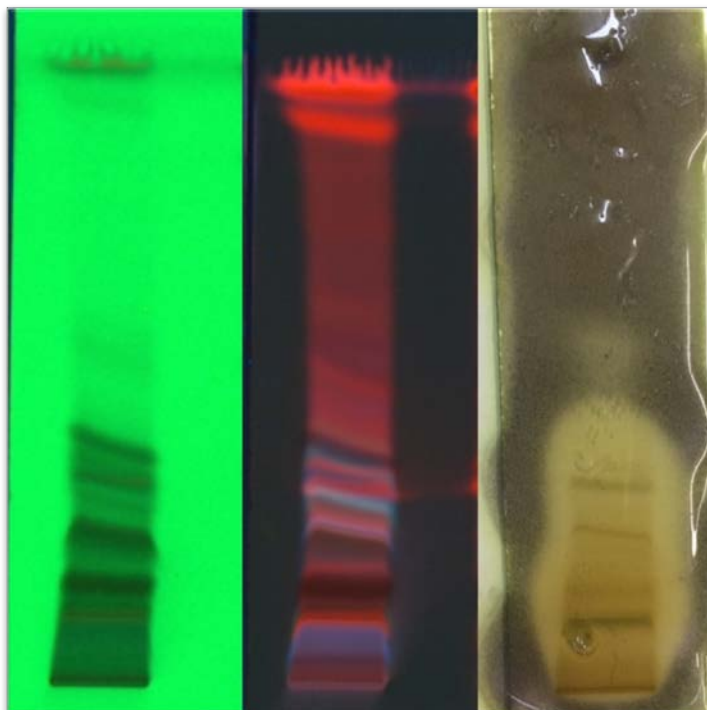
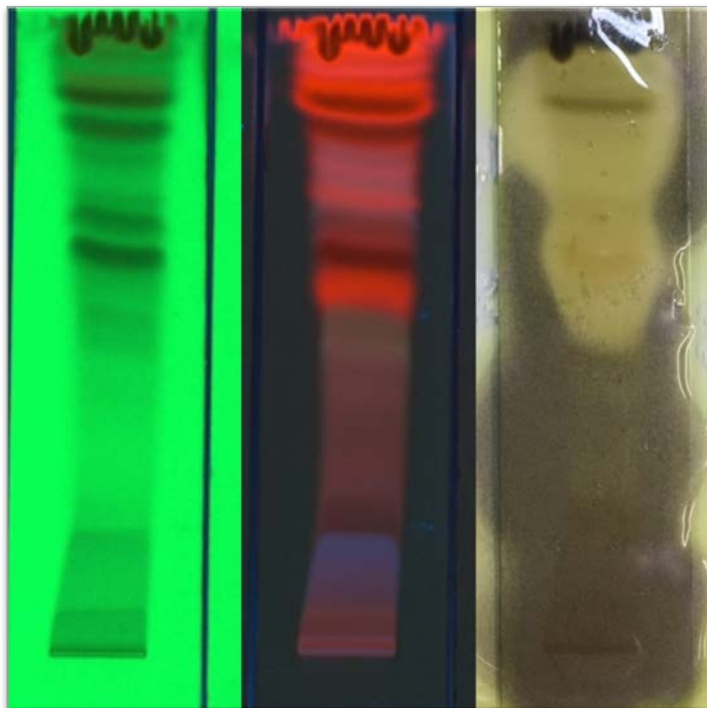


Figura 16 - Placa cromatográfica da fração acetato de etila de *Lippia origanoides* com sistema clorofórmio:metanol (90:10) em revelação física de lâmpada uv254nm, uv365nm e revelação bioautográfica da cepa 728 de *Staphylococcus aureus* multirresistente.

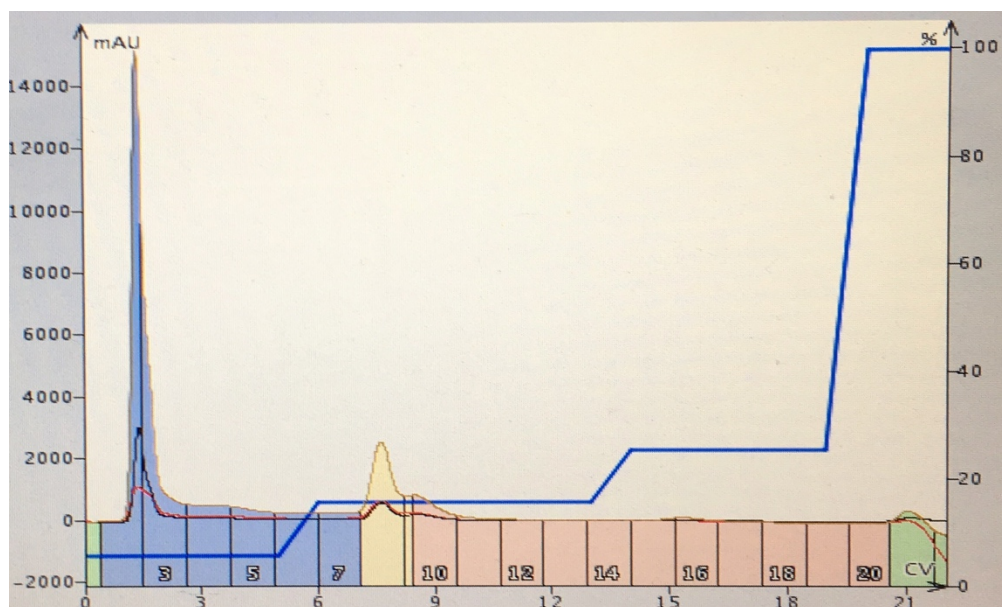


Fonte: Autor

5.3.2 MPLC (Medium Pressure Liquid Chromatography)

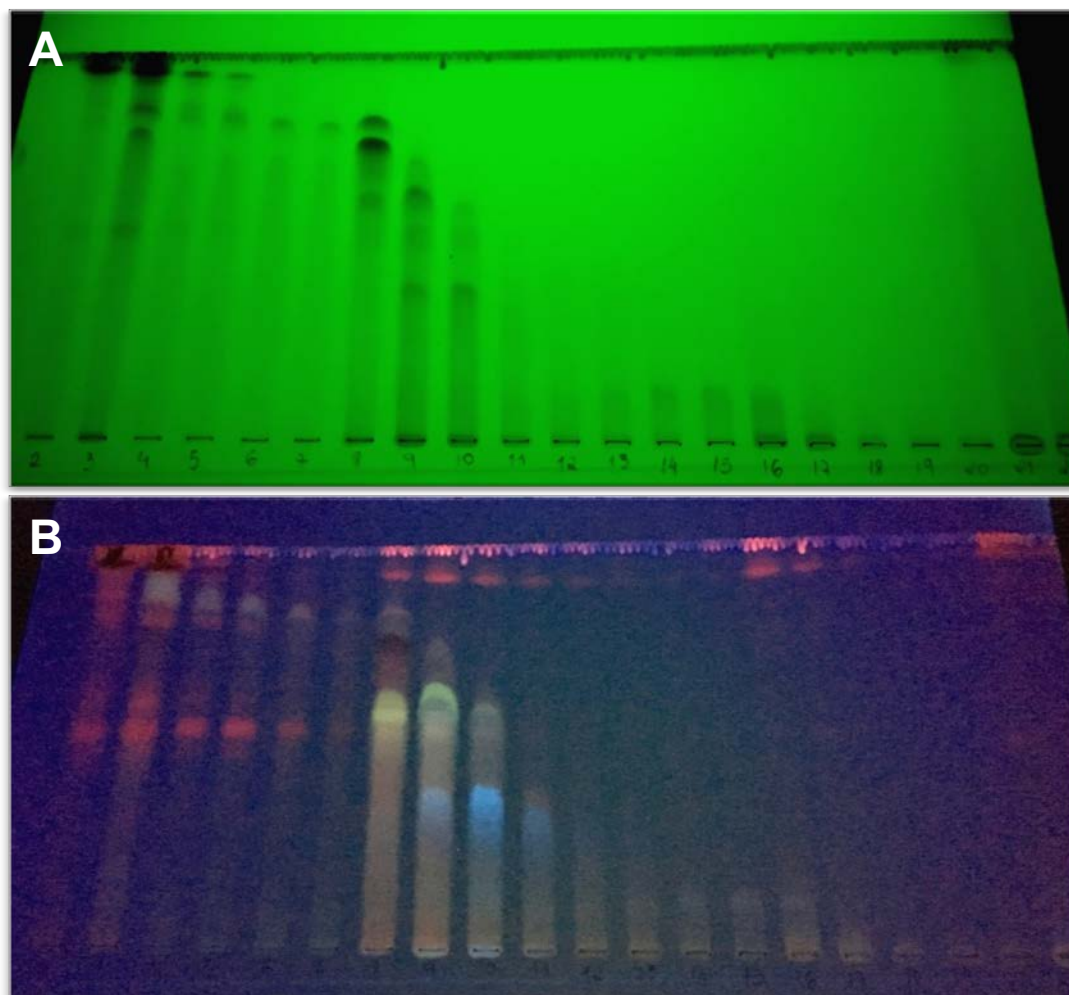
Foi optado por fazer uma corrida em sistema gradiente começando em clorofórmio:metanol (95:5) por 5 volumes de coluna e aumentando para 90:10 por 6 volumes de coluna, 50:50 por 6 volumes de coluna e finalizando com apenas metanol por 3 volumes de coluna, isto resultou em 22 frações separadas em tubos de ensaio, as quais foram reunidas em 4 subfrações denominadas de F₁, F_A, F_B e F_C com base no perfil das amostras demonstrada na figura 17, juntamente com análise através de CCD (Figura 18a e 18b).

Figura 17 - Cromatograma da evolução na Cromatografia Líquida de Média Pressão para a fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth.



Fonte: Autor

Figura 18: Cromatoplasmas de cromatografia em camada delgada dos 22 tubos referentes a fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth após separação por cromatografia líquida de média pressão utilizando revelação física com lâmpada de uv254 (A) e uv365 (B).



Fonte: Autor

5.3.3 Atividade Antimicrobiana e Modulatória

Eritromicina e as quatro subfrações provenientes da fração acetato de etila das folhas de *L. origanoides* foram testadas frente as cepas de *S. aureus* isolados clínicos multirresistentes. De um modo geral, as subfrações obtiveram melhores resultados que a fração acetato de etila, diminuindo a CIM para sete das oito cepas analisadas. Na comparação com a eritromicina, as subfrações também foram mais ativas em seis cepas de *S. aureus* multirresistentes utilizados (Tabela 12).

Tabela 12 - Concentrações inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) das subfrações da fração acetato de etila do extrato hidroalcoólico das folhas de *Lippia organoides* Kunth e da Eritromicina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes.

Subfrações/Antibiótico		F ₁	F _A	F _B	F _C	Eritromicina*
MICRO-ORGANISMOS GRAM-POSITIVOS (média das concentrações em $\mu\text{g/mL}$)	670	125 $\pm$ 0,0	125 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	>2000	> 250
	671	1000 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	>2000	0,48 $\pm$ 0,0
	691	125 $\pm$ 0,0	125 $\pm$ 0,0	500 $\pm$ 0,0	>2000	0,48 $\pm$ 0,0
	700	125 $\pm$ 0,0	62,5 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	>2000	> 250
	725	125 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	2000 $\pm$ 0,0	>2000	> 250
	728	125 $\pm$ 0,0	62,5 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	>2000	> 250
	729	250 $\pm$ 0,0	125 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0	>2000	> 250
	732	125 $\pm$ 0,0	62,5 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0	>2000	125 $\pm$ 0,0

Legenda: 670-732 cepas de isolados clínicos de *S. aureus* do Hospital das Clínicas da UFPE. * Eritromicina (2500 $\mu\text{g/mL}$)

Utilizando os parâmetros de Tanaka et al. (2005), a subfração F_A foi a que apresentou os melhores resultados, obtendo boa atividade frente as cepas 700 (62,5 $\mu\text{g/mL}$), 728 (62,5 $\mu\text{g/mL}$) e 732 (62,5 $\mu\text{g/mL}$), enquanto nenhuma outra fração conseguiu tao boas CIM's. A F_A ainda obteve moderada atividade frente as cepas 670 (125 $\mu\text{g/mL}$), 691 (125 $\mu\text{g/mL}$), 725 (250 $\mu\text{g/mL}$) e 729 (125 $\mu\text{g/mL}$). O micro-organismo 671 se mostrou fracamente resistente a subfração F_A com CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados da subfração F₁ se mostraram mais padronizados, pois mostrou atividade moderada frente a 7 cepas testadas, sendo elas 670 (125 $\mu\text{g/mL}$), 691 (125 $\mu\text{g/mL}$), 700 (125 $\mu\text{g/mL}$), 725 (125 $\mu\text{g/mL}$), 728 (125 $\mu\text{g/mL}$), 729 (250 $\mu\text{g/mL}$) e 730 (125 $\mu\text{g/mL}$), ainda apresentou fraca atividade frente a cepa 671 com CIM de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Quando avaliada a subfração F_B, observa-se inatividade frente a cepa 671 e 725 com CIM de 2000 µg/mL além de fraca atividade frente ao micro-organismo 670 e 729 com CIM de 1000 µg/mL, mas também foi descoberta atividade moderada frente as cepas 691 (500 µg/mL), 700 (250 µg/mL), 728 (250 µg/mL) e 732 (250 µg/mL).

Para análise do teste com eritromicina, a CLSI (2018) preconiza que CIM's > 8 µg/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. Os resultados de CIM para as cepas utilizadas mostraram que apenas duas delas se mostraram sensíveis a eritromicina, a cepa 671 e 691 com CIM's de 0,48 µg/mL, mas os outros *S. aureus* foram resistentes ao antibiótico com CIM's > 125 µg/mL.

Em seu estudo, Cartaxo (2012) avaliou a atividade antimicrobiana de frações e subfrações de geopropolis e também identificou atividade frente a cepas de *S. aureus* para as subfrações com menor polaridade, inclusive sugerindo esta ação aos terpenoides contidos nas amostras, que podem corroborar com o presente trabalho, devido a presença de terpenoides na fração acetato de etila e ela foi a fração de origem para as subfrações.

Uma vez que a subfração F_A se mostrou mais ativa, principalmente frente aos micro-organismos 700, 728 e 732, esta amostra foi avaliada em associação com Eritromicina pelo método Checkerboard para avaliar o efeito modulador, já que estas cepas se mostraram resistentes ao antibiótico conforme Tabela 12. Nesta associação, foi possível identificar o aumento da atividade antiestafilocócica da combinação, quando comparada as amostras individualmente, mas este aumento não foi suficiente para determinar um efeito sinérgico entre estas combinações, sendo parcialmente sinérgico apenas na interação entre a subfração F_A e Eritromicina frente ao micro-organismo 700 (Tabela 13).

Os resultados do checkerboard mostraram que a combinação da subfração F_A com Eritromicina diminuiu a CIM do antibiótico de 62,5 µg/mL para 15,6 µg/mL frente a cepa 700 de *S. aureus* e ainda conseguiu reduzir as CIM's do antibiótico para 1,95 µg/mL frente os micro-organismos 728 e 732. Mesmo com a diminuição da CIM, a associação ainda não conseguiria mudar a resistência de *S. aureus*, pois segundo CLSI (2018), apenas CIM's < 0,5 µg/mL para este micro-organismo são indicativas de sensibilidade a Eritromicina.

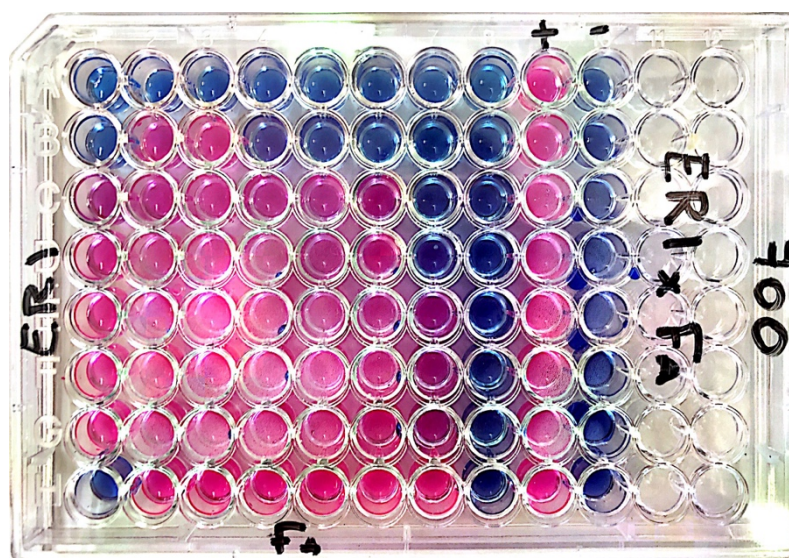
Tabela 13 - Interação da subfração F_A da fração acetato de etila das folhas de *Lippia organoides* Kunth com Eritromicina utilizando método Checkerboard frente a cepas *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes

Cepas	Associação	CIM individual ($\mu\text{g/mL}$)	CIM combinação ($\mu\text{g/mL}$)	CIF individual	ICIF	Interpretação
700	$F_A \times \text{Eri}$	62,5/62,5	31,25/15,63	0,25/0,50	0,75	Sinergismo Parcial
728	$F_A \times \text{Eri}$	31,25/62,5	31,25/1,95	1,00/0,03	1,03	Indiferente
732	$F_A \times \text{Eri}$	31,25/31,25	31,25/1,95	1,00/0,06	1,06	Indiferente

Legenda: 700, 728 e 732 = Cepas *Staphylococcus aureus* isolados clínicos multirresistentes; Eri = Eritromicina; CIM = Concentração Inibitória Mínima; CIF = Concentração Inibitória Fracionária; ICIF = Índice da Concentração Inibitória Fracionária

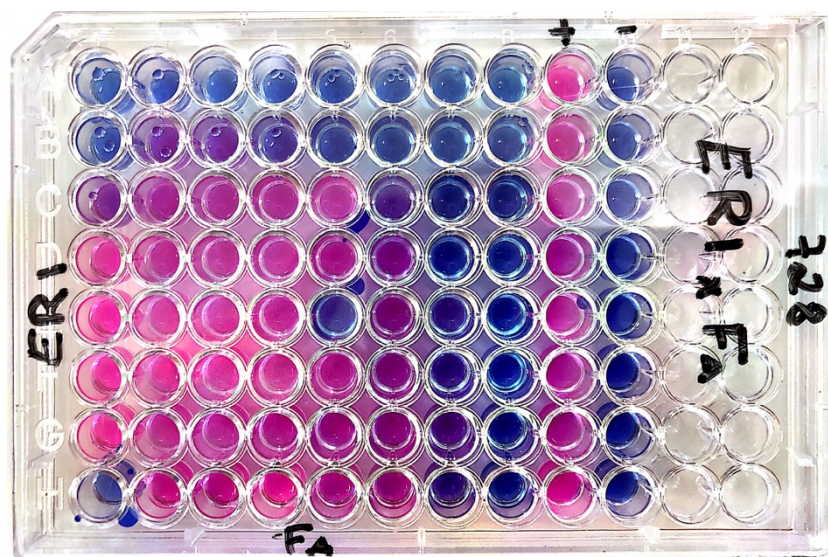
Mediante ao método de análise das placas (Figuras 19, 20 e 21) de checkerboard descrito por Moody (1992), a combinação entre subfração F_A e Eritromicina obtiveram ICIF de 0,75 frente ao micro-organismo 700, sendo interpretado como efeito parcialmente sinérgico, ICIF de 1,03 frente a cepa 728 e ICIF de 1,06 frente ao micro-organismo 732 com efeito indiferente para as duas cepas.

Figura 19 - Placa da combinação entre a subfração F_A da fração acetato de etila das folhas de *Lippia organoides* Kunth e Eritromicina frente a cepa de *Staphylococcus aureus* multirresistente (UFPEDA 700) pelo método de Checkerboard



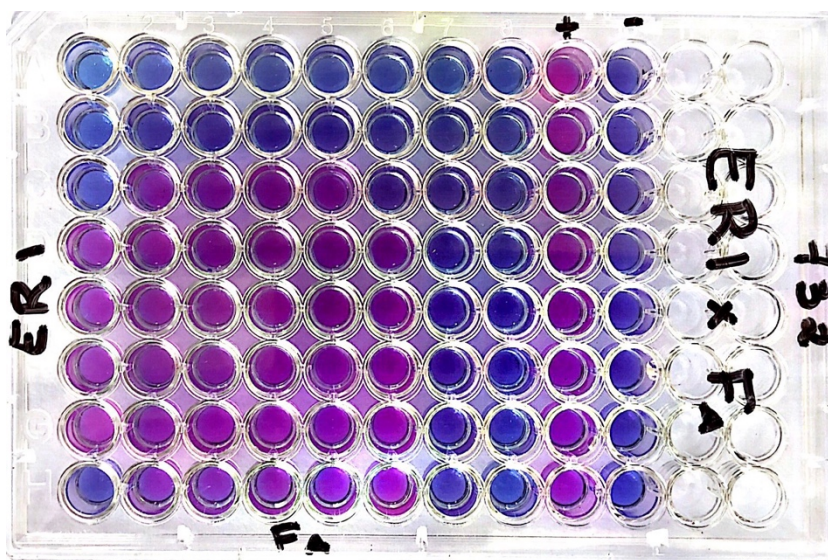
Fonte: Autor

Figura 20 - Placa da combinação entre a subfração F_A da fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth e Eritromicina frente a cepa *Staphylococcus aureus* multirresistente (UFPEDA 728) pelo método de Checkerboard



Fonte: Autor

Figura 21 - Placa da combinação entre a subfração F_A da fração acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides* Kunth e Eritromicina frente a cepa *Staphylococcus aureus* multirresistente (UFPEDA 732) pelo método de Checkerboard



Fonte: Autor

A busca pelo sinergismo de produtos naturais e agentes antimicrobianos é uma promissora área da pesquisa fitomedicinal, desenvolvendo novas perspectivas para os fitofármacos, uma vez que podem ser modificadores da atividade antibiótica e este é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo reverterem a resistência bacteriana a certos antibióticos, podendo alterar a susceptibilidade microbiana a antibióticos (COSTA et al., 2008). Isto evolui a ideia de que esta abordagem é exclusiva para combinações entre compostos isolados, mas também combinações de óleos essenciais e extratos com agentes antimicrobianos (HEMAISWARYA et al., 2008; WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Maciel et al. (2002) comentam que as plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos com classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade. Nesta perspectiva, já existem alguns estudos na literatura que têm investigado as interações entre antibióticos e extratos de planta frente *Staphylococcus aureus* multidroga resistente (GIBBONS, 2004, ROCCARO et al., 2004; FUJITA et al., 2005; HATANO; KUSUDA; INADA, 2005; KITAHARA et al., 2006; BETONI et al., 2006; ESIMONE et al., 2006; ADWAN; ABU-SHANAB; ADWAN, 2008; PESEWU; CUTLER; HUMBER, 2008).

Esta interação pode atingir efeitos sinérgicos, onde a combinação de 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-JR, 1991; MUROI; KUBO, 1994).

Com o aumento da prevalência de *S. aureus* multirresistente, testes para avaliação sinérgica, utilizando várias combinações de fitoquímicos com agentes antimicrobianos pode ser uma ferramenta poderosa para ajudar a seleção da terapia antimicrobiana adequada (JAYARAMAN et al., 2010). Tendo em vista a capacidade dos extratos de plantas de melhorar a atividade de agentes antimicrobianos vários pesquisadores estudaram essa interação sinérgica (DARWISH et al., 2002; AQUIL et al., 2005; BRAGA et al., 2005; BETONI et al., 2006; ESIMONE et al 2006; ADWAN et al., 2008).

Vários fitofármacos atuam como inibidores dos mecanismos de resistência bacteriana e alguns deles são flavonas glicosiladas que suprimem a atividade da

Topoisomerase IV (BERNARD et al., 1997), miricetina inibindo DNA helicase (GRIEP et al., 2007), alicina inibindo a síntese de RNA (FELDBERG et al., 1988). Corilagina, um polifenol isolado de *Arctostafilos uva-ursi* foi capaz de reduzir significativamente o valor da CIM de beta-lactâmicos contra MRSA e de acordo com Shimizu et al. (2001), existem duas possibilidades quanto ao mecanismo de ação da corilagina, inibindo a atividade da proteína de ligação a penicilina (PBP2a), ou inibindo sua produção.

5.3.4 GCMS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry)

Amostras da Fração Acetato de Etila (FAE) do extrato bruto hidroetanólico das folhas de *L. origanoides* e suas subfrações (F_1 , F_A , F_B e F_C) foram analisadas quanto aos seus respectivos conteúdos fitoquímicos pelo GC-MS. O cromatograma de FAE, apresentou 60 picos, correspondentes a presença de 52 compostos (Tabela 14). Dois picos não foram identificados e doze picos correspondem aos isômeros: 2-Hexadecenol-1, 3,7,11,15-tetrametil-, [R-[R*,R*-(E)]]-; linolato de etila; Silano, dietildi(3,4-dimetilfenoxi)-; 14- β -H-pregna; β -Sitosterole e β -amirina. Os compostos que mostraram maior área (%) foram os ácidos graxos: ácido palmítico (13,99%) e ácido α -linolênico (12,23%).

TABELA 14 - Compostos identificados no cromatograma da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de massas.

PICO	TR	AREA%	NOME DO COMPOSTO (BANCO DE DADOS)	PM	FM	IUPAC	SI
1	10.736	0.41	Thymoquinone	164	C10H12O2	2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone	83
2	11.741	2.29	Thymol	150	C10 H14 O	Thymol	97
3	12.004	3.22	Carvacrol	150	C10 H14 O	5-Isopropyl-2-methylphenol	95
4	12.506	0.75	2,2-Dimethyl-4,5-di[(1E)-1-propen-1-yl]-1,3-dioxolane	182	C11H18O2	2,2-Dimethyl-4,5-di[(1E)-1-propen-1-yl]-1,3-dioxolane	85
5	14.056	0.22	N,N-Dimethyl-4-nitroso-3-(trimethylsilyl)aniline	222	C11H18N2OSi	N,N-Dimethyl-4-nitroso-3-(trimethylsilyl)aniline	78
6	15.866	0.79	2-(2-Methoxyphenyl)-2-propanol	166	C10H14O2	2-(2-Methoxyphenyl)-2-propanol	84
7	16.637	1.25	3-T-Butyl-4-methoxyphenol	180	C11H16O2	4-Methoxy-3-(2-methyl-2-propanyl)phenol	86
8	17.814	0.16	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	180	C11H16O2	4,4,7a-Trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(4H)-one	89
9	18.567	0.39	2-Methoxy-4-ethyl-6-methylphenol	166	C10H14O2	4-Ethyl-2-methoxy-6-methylphenol	86
10	20.291	6.45	Ethyl α -D-glucopyranoside	208	C8H16O6	Ethyl α -D-glucopyranoside	90
11	20.758	2.20	Silane, [3-(2,3-epoxypropoxy)propyl]ethoxydimethyl-	218	C10H22O3Si	Ethoxy(dimethyl)[3-(2-oxiranylmethoxy)propyl]silane	70
12	24.259	2.39	Neophytadiene	278	C20H38	7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1-hexadecene	96
13	24.429	0.47	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	268	C18H36O	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	95
14	24.766	0.61	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	296	C20H40O	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	94
15	24.995	0.22	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methylpropyl) ester	278	C16H22O4	Diisobutyl phthalate	95
16	25.123	0.94	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-	296	C20H40O	(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	94
17	25.951	0.14	Bromoacetic acid, octadecyl ester	390	C20H39BrO2	Octadecyl bromoacetate	84
18	26.890	13.99	Palmitic acid	256	C16H32O2	Palmitic acid	96
19	27.216	0.30	Ethyl 9-hexadecenoate	282	C18H34O2	Ethyl 9-hexadecenoate	88
20	27.323	4.48	Hexadecanoic acid, ethyl ester	284	C18H36O2	Ethyl palmitate	96

21	29.538	4.40	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-	296	C20H40O	(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	98
22	30.009	3.97	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- / Linoleic acid	280	C18H32O2	(9Z,12Z)-9,12-Octadecadienoic acid	95
23	30.168	12.23	α -Linolenic acid	278	C18H30O2	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid	97
24	30.383	2.31	Ethyl linoleate	308	C20H36O2	Ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate	94
25	30.509	4.78	Ethyl linoleate (JAN)	308	C20H36O2	Ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate	92
26	30.932	0.63	Octadecanoic acid, ethyl ester	312	C20H40O2	Ethyl stearate	94
27	33.049	0.37	Oleyl alcohol, trifluoroacetate	364	C20H35F3O2	(9Z)-9-Octadecen-1-yl trifluoroacetate	85
28	33.224	0.18	Silane, diethyldi(3,4-dimethylphenoxy)-	328	C20H28O2Si	Bis(3,4-dimethylphenoxy)(diethyl)silane	59
29	33.428	0.18	Cyclohexane, eicosyl-	364	C26H52	Icosylcyclohexane	78
30	33.495	0.10	Silane, diethyldi(3,4-dimethylphenoxy)-	328	C20H28O2Si	Bis(3,4-dimethylphenoxy)(diethyl)silane	59
31	34.256	0.18	Heptadecanoic acid, ethyl ester	298	C19H38O2	Ethyl heptadecanoate	90
32	34.594	3.41	Isobutyl (5-isopropyl-2-methylphenyl) carbonate	250	C15H22O3	Isobutyl 5-isopropyl-2-methylphenyl carbonate	78
33	34.885	1.54	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	150	C10H14O	2,3,5,6-Tetramethylphenol	68
34	35.025	0.68	5-Isopropyl-2-methylphenyl pentanoate	234	C15H22O2	5-Isopropyl-2-methylphenyl valerate	86
35	36.702	0.28	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	390	C24H38O4	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	96
36	37.328	0.27	Octadecanoic acid, ethyl ester	312	C20H40O2	Ethyl stearate	87
37	38.956	1.10	Durohydroquinone	166	C10H14O2	2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzenediol	76
38	40.077	3.10	9-Octadecenamide, (Z)-	281	C18H35NO	(9Z)-9-Octadecenamide	93
39	40.421	1.81	Sakuranin	448	C22H24O10	2-(4-Hydroxyphenyl)-7-methoxy-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-5-yl β -D-glucopyranoside	79
40	41.049	0.71	14-.Beta.-H-pregna	288	C21 H36	14-.Beta.-H-pregna	64
41	41.347	1.06	14-.beta.-H-pregna	288	C21 H36	14-.beta.-H-pregna	
42	41.779	3.54	Naringenin	272	C15H12O5	(2S)-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	91
43	42.528	0.52	Hesperetin	302	C16H14O6	(2S)-5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	73

							99
44	43.700	0.24	.gamma.-Tocopherol	416	C28H48O2	2,7,8-Trimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-6-chromanol	90
45	43.912	0.14	4-Methoxy-2-methylbenzoic acid	166	C9H10O3	4-Methoxy-2-methylbenzoic acid	69
46	44.028	0.08	Cholesta-4,6-dien-3-ol, (3.beta.)-	384	C27H44O	(3β)-Cholesta-4,6-dien-3-ol	66
47	44.300	0.18	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)-	414	C29H50O	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	80
48	44.763	0.54	Vitamin E	430	C29H50O2	(2R)-2,5,7,8-Tetramethyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-6-chromanol	94
49	44.921	0.89	3-Methoxy-4',5,7-Trihydroxyfl	300	C16H12O6	5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-methoxy-4H-chromen-4-one	71
50	45.623	0,26	-	-	-	-	-
51	46.282	0.29	Campesterol	400	C28H48O	(3β,24R)-Ergost-5-en-3-ol	84
52	46.815	0.77	Stigmasterol	412	C29H48O	(3β,20R,22E,24S)-Stigmasta-5,22-dien-3-ol	89
53	47.846	4.09	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)-	414	C29H50O	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	93
54	48.495	0.15	β-amyrin	426	C30H50O	(3β)-Olean-12-en-3-ol	86
55	48.628	0,28	-	-	-	-	-
56	49.442	1.05	β-amyrin	426	C30H50O	(3β)-Olean-12-en-3-ol	87
57	49.636	0.24	D:B-Friedo-B':A'-neogammacer-5-en-3-one	424	C30H48O	(3R,3aR,5aR,5bS,11aS,11bR,13aS,13bR)-3-Isopropyl-3a,5a,8,8,11b,13a-hexamethyl-1,2,3,3a,4,5,5a,5b,6,8,10,11,11a,11b,12,13,13a,13b-octadecahydro-9H-cyclopenta[a]chrysen-9-one	71
58	50.710	0.11	Cholest-4-en-3-one	384	C27H44O	(8α,9β)-Cholest-4-en-3-one	77
59	52.603	0.37	03027205002 Flavone 4'-OH,5-OH,7	594	C27 H30 O15		78
60	52.908	1.29	Phytol, acetate	338	C22H42O2	(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-yl acetate	90

Legenda: **TR** = tempo de retenção; **PM** = Peso molécula; **FM** = Fórmula molecular; **SI** = Índice de similaridade.

Na subfração F_1 , o cromatograma apresentou 66 picos, correspondentes a presença de 59 compostos (Tabela 15). Três picos não foram identificados e oito picos correspondem aos isômeros: linolato de etila; ácido heptadecanóico etil ester; β -Sitosterol e β -amirina. Os compostos que mostraram maior área (%) foram: ácido palmítico (18,18%) e ácido α -linolênico (14,12%).

O cromatograma da subfração F_A apresentou 35 picos, correspondentes a presença de 31 compostos (Tabela 16). Oito picos foram correspondentes aos isômeros: 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecenol-1; linolato de etila; estearato de etilo e 2,3,5,6-Tetrametilfenólico. Os compostos que mostraram maior área (%) foram ácido palmítico (16,49%), naringenina (15,35%), ácido α -linolênico (11,56%) e estearato de etilo (10,43%).

Já o cromatograma da subfração F_B , apresentou 21 picos correspondentes a presença de 20 compostos e dois picos foram correspondentes ao isômero timol (Tabela 17). Os compostos que mostraram maior área (%) foram: Etil- α -d-glucopiranosideo (41,80%); Pentanoato de 5-isopropil-2-metilfenilo (19,04%) e Carbonato de isobutilo (5-isopropil-2-metilfenil) (16,71%).

O cromatograma da subfração F_C , apresentou 32 picos correspondentes a presença de 30 compostos e quatro picos foram correspondentes aos isômeros: Fenol, 2,3,5,6-tetrametil- e 14- β -H-pregna (Tabela 18). Os compostos que mostraram maior área (%) foram: Etil- α -d-glucopiranosideo (28,13%) e ácido palmítico (21,53%).

TABELA 15 - Compostos identificados no cromatograma da subfração F₁ da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas.

PICO	TR	AREA%	NOME DO COMPOSTO (BANCO DE DADOS)	PM	FM	IUPAC	SI
1	10.698	0.57	Thymoquinone	164	C10H12O2	2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone	86
2	11.702	3.43	Thymol	150	C10 H14 O	Thymol	97
3	11.960	4.68	Carvacrol	150	C10 H14 O	5-Isopropyl-2-methylphenol	95
4	14.050	0.10	N,N-Dimethyl-4-nitroso-3-(trimethylsilyl)aniline	222	C11H18N2OSi	N,N-Dimethyl-4-nitroso-3-(trimethylsilyl)aniline	77
5	15.914	0.43	2-Methoxy-4-Ethyl-6-Methylphenol	166	C10H14O2	4-Ethyl-2-methoxy-6-methylphenol	84
6	16.664	0.49	3-tert-Butyl-4-methoxyphenol	180	C11H16O2	4-Methoxy-3-(2-methyl-2-propanyl)phenol	86
7	17.226	0.05	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-	206	C14H22O	2,4-Bis(2-methyl-2-propanyl)phenol	90
8	17.816	0.20	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	180	C11H16O2	4,4,7a-Trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(4H)-one	90
9	18.829	0.08	Espatulenol	220	C15H24O	(1aR,4aR,7S,7aR,7bR)-1,1,7-Trimethyl-4-methylenedecahydro-1H-cyclopropa[e]azulen-7-ol	84
10	20.981	0.04	-	-	-	-	-
11	22.921	0.32	Tetradecanoic acid	228	C14H28O2	Myristic acid	94
12	24.263	3.76	Neophytadiene	278	C20H38	7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1-hexadecene	96
13	24.424	0.96	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	268	C18H36O	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	96
14	24.769	0.79	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl	296	C20H40O	(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	93
15	24.996	0.34	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-met	278	C16H22O4	Diisobutyl phthalate	97
16	25.126	1.25	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	296	C20H40O	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	94
17	25.951	0.16	14-.Beta.-H-pregna	288	C21 H36	-	-
18	26.055	0.06	Hexadecanoic acid, methyl ester	270	C17H34O2	Methyl palmitate	85
19	26.963	18.18	n-Hexadecanoic acid	256	C16H32O2	Palmitic acid	95
20	27.217	0.93	Ethyl 9-hexadecenoate	282	C18H34O2	Ethyl 9-hexadecenoate	91
21	27.329	6.69	Hexadecanoic acid, ethyl ester	284	C18H36O2	Ethyl palmitate	96

22	28.713	0.20	7,11-Epoxymegastigma-5(6)-en-9-one	208	C13H20O2	1-(7,7-Dimethyl-1,3,4,5,6,7-hexahydro-2-benzofuran-1-yl)acetone	102 78
23	29.543	4.65	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-	296	C20H40O	(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	98
24	30.074	4.89	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	280	C18H32O2	(9Z,12Z)-9,12-Octadecadienoic acid	88
25	30.226	14.12	α -Linolenic acid	278	C18H30O2	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid	96
26	30.385	2.67	Ethyl linoleate (JAN)	308	C20H36O2	Ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate	94
27	30.516	6.95	Ethyl linoleate (JAN)	308	C20H36O2	Ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate	92
28	30.931	0.92	Octadecanoic acid, ethyl ester	312	C20H40O2	Ethyl stearate	93
29	31.363	0.52	Phytol, acetate	338	C22H42O2	(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-yl acetate	93
30	33.219	0.29	Dehydrodihydrodiisoeugenol	328	C20H24O4	2-Methoxy-4-(7-methoxy-3-methyl-5-propyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-2-yl)phenol	60
31	33.500	0.20	Silane, diethyldi(2-ethylphenoxy)-	328	C20H28O2Si	Diethyl[bis(2-ethylphenoxy)]silane	56
32	33.674	0.12	4,8,12,16-Tetramethylheptadecan-4-olid	324	C21H40O2	5-Methyl-5-(4,8,12-trimethyltridecyl)dihydro-2(3H)-furanone	86
33	33.849	0.14	Eicosanoic acid	312	C20H40O2	Icosanoic acid	75
34	34.250	0.24	Heptadecanoic acid, ethyl ester	298	C19H38O2	Ethyl heptadecanoate	91
35	35.821	0.12	9-Octadecenoic acid, ethyl ester	310	C20H38O2	Ethyl 9-octadecenoate	78
36	36.698	0.51	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390	C24H38O4	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	97
37	37.322	0.42	Heptadecanoic acid, ethyl ester	298	C19H38O2	Ethyl heptadecanoate	89
38	38.776	0.10	Heptadecanoic acid, ethyl ester	298	C19H38O2	Ethyl heptadecanoate	86
39	40.073	1.31	9-Octadecenamide, (Z)-	281	C18H35NO	(9Z)-9-Octadecenamide	93
40	40.174	0.36	Heptadecanoic acid, ethyl ester	298	C19H38O2	Ethyl heptadecanoate	87
41	40.312	1.55	Sakuranin	448	C22H24O10	2-(4-Hydroxyphenyl)-7-methoxy-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-5-yl β -D-glucopyranoside	79
42	41.043	1.35	14-.Beta.-H-pregna	288	C21 H36	-	-
43	41.337	1.68	Cyclohexane, 1,2,3,5-tetraisopropyl-	252	C18H36	1,2,3,5-Tetraisopropylcyclohexane	62
44	41.810	1.40	Naringenin	272	C15H12O5	(2S)-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	92
45	42.524	0.34	Hesperetin	302	C16H14O6	(2S)-5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	74

							103
46	42.838	0.10	Octadecanoic acid, ethyl ester	312	C20H40O2	Ethyl stearate	68
47	43.696	0.10	.gamma.-Tocopherol	416	C28H48O2	2,7,8-Trimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-6-chromanol	91
48	43.909	0.12	4-Methoxy-2-methylbenzoic acid	166	C9H10O3	4-Methoxy-2-methylbenzoic acid	70
49	44.298	0.08	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)-	414	C29H50O	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	80
50	44.761	0.29	Vitamin E	430	C29H50O2	(2R)-2,5,7,8-Tetramethyl-2-[(4R,8R)-4,8,12-trimethyltridecyl]-6-chromanol	95
51	45.079	0.18	-	-	-	-	-
52	45.640	0.15	-	-	-	-	-
53	46.300	0.15	Campesterol	400	C28H48O	(3β,24R)-Ergost-5-en-3-ol	85
54	46.818	0.43	Stigmasterol	412	C29H48O	(3β,20R,22E,24S)-Stigmasta-5,22-dien-3-ol	91
55	47.854	2.79	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)-	414	C29H50O	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	93
56	48.496	0.15	β-amyrin	426	C30H50O	(3β)-Olean-12-en-3-ol	90
57	48.619	0.21	A'-Neogammacer-22(29)-ene	410	C30H50	Hop-22(29)-ene	71
58	49.449	1.25	β-amyrin	426	C30H50O	(3β)-Olean-12-en-3-ol	88
59	49.644	0.28	D:B-Friedo-B':A'-neogammacer-5-en-3-	424	C30H48O	(3R,3aR,5aR,5bS,11aS,11bR,13aS,13bR)-3-Isopropyl-3a,5a,8,8,11b,13a-hexamethyl-1,2,3,3a,4,5,5a,5b,6,8,10,11,11a,11b,12,13,13a,13b-octadecahydro-9H-cyclopenta[a]chrysen-9-one	79
60	50.682	0.22	Stigmast-4-en-3-one	412	C29H48O	Stigmast-4-en-3-one	82
61	51.669	0.14	5H-3,5a-Epoxy-naphth[2,1-c]oxepin, dod	278	C18H30O2	-	81
62	52.596	0.75	03027205002 Flavone 4'-OH,5-OH,7	594	C27 H30 O15	-	81
63	52.907	1.92	Phytol, acetate	338	C22H42O2	(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-yl acetate	90
64	55.204	0.09	Stigmastane-3,6-dione, (5.alpha.)-	428	C29H48O2	(5α)-Stigmastane-3,6-dione	75
65	59.146	0.83	Borane, diethylmethyl-	83	C5H13B	Diethyl(methyl)borane	86
66	59.604	1.21	1-Heptatriacotanol	536	C37H76O	1-Heptatriacotanol	83

Legenda: **TR** = tempo de retenção; **PM** = Peso molécula; **FM** = Fórmula molecular; **SI** = Índice de similaridade.

TABELA 16 - Compostos identificados no cromatograma da subfração F_A da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas.

PICO	TR	AREA%	NOME DO COMPOSTO (BANCO DE DADOS)	PM	FM	IUPAC	SI
1	10.741	0.73	Thymoquinone	164	C10H12O2	2-Isopropyl-5-methyl-1,4-benzoquinone	82
2	11.812	0.89	Thymol	150	C10 H14 O	Thymol	95
3	12.064	1.65	Carvacrol	150	C10 H14 O	5-Isopropyl-2-methylphenol	85
4	12.453	3.15	1,3-Dioxolane, 2,2-dimethyl-4,5-di-1-propenyl-	182	C11H18O2	2,2-Dimethyl-4,5-di[(1E)-1-propen-1-yl]-1,3-dioxolane	85
5	14.039	0.48	Silane, trimethyl[5-methyl-2-(1-methylethyl)phenoxy]-	222	C13H22OSi	(2-Isopropyl-5-methylphenoxy)(trimethyl)silane	79
6	17.817	0.12	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	180	C11H16O2	4,4,7a-Trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(4H)-one	89
7	23.173	1.26	(-)-Loliolide	196	C11H16O3	(7aR)-6-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(4H)-one	91
8	24.255	1.83	Neophytadiene	278	C20H38	7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1-hexadecene	95
9	24.428	0.47	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	268	C18H36O	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	94
10	24.762	0.42	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	296	C20H40O	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	94
11	25.121	0.70	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	296	C20H40O	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	93
12	26.863	16.49	n-Hexadecanoic acid	256	C16H32O2	Palmitic acid	96
13	27.320	2.48	Hexadecanoic acid, ethyl ester	284	C18H36O2	Ethyl palmitate	96
14	29.541	2.70	2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetramethyl-, [R-[R*,R*-(E)]]-	296	C20H40O	(2E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	98
15	29.984	3.40	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	280	C18H32O2	(9Z,12Z)-9,12-Octadecadienoic acid	96
16	30.130	11.56	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	278	C18H30O2	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid	97
17	30.377	1.75	Ethyl linoleate (JAN)	308	C20H36O2	Ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate	92

							105
18	30.501	3.59	Ethyl linoleate (JAN)	308	C20H36O2	Ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate	84
19	30.930	0.48	Octadecanoic acid, ethyl ester	312	C20H40O2	Ethyl stearate	91
20	31.354	0.42	N-(2-Methylbutyl)undeca-(2E,4E)-diene-8,10-diynamide	243	C16H21NO	(2E,4E)-N-(3-Methylbutyl)-2,4-undecadiene-8,10-diynamide	68
21	33.035	0.83	Oleyl alcohol, trifluoroacetate	364	C20H35F3O2	(9Z)-9-Octadecen-1-yl trifluoroacetate	85
22	33.416	0.61	Cyclohexane, eicosyl-	364	C26H52	Icosylcyclohexane	76
23	34.569	2.89	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	150	C10H14O	2,3,5,6-Tetramethylphenol	70
24	34.849	1.65	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	150	C10H14O	2,3,5,6-Tetramethylphenol	66
25	35.582	0.18	Hexadecanoic acid, 3-[(trimethylsilyl)oxy]propyl ester	386	C22H46O3Si	3-[(Trimethylsilyl)oxy]propyl palmitate	66
26	36.372	0.16	Heptadecanal	254	C17H34O	Heptadecanal	79
27	36.701	0.51	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl)-	390	C24H38O4	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	96
28	37.322	0.16	Octadecanoic acid, ethyl ester	312	C20H40O2	Ethyl stearate	86
29	40.070	10.43	9-Octadecenamide, (Z)-	281	C18H35NO	(9Z)-9-Octadecenamide	93
30	40.417	3.14	Sakuranin	448	C22H24O10	2-(4-Hydroxyphenyl)-7-methoxy-4-oxo-3,4-dihydro-2H-chromen-5-yl β-D-glucopyranoside	78
31	41.047	0.45	14-.Beta.-H-pregna	288	C21 H36	-	-
32	41.383	0.89	erythro-7,8-Bromochlorodisparlure	380	C26 H50	-	-
33	41.665	15.35	Naringenin	272	C15H12O5	(2S)-5,7-Dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	94
34	42.458	2.12	Hesperetin	302	C16H14O6	(2S)-5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one	84
35	47.846	6.07	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)-	414	C29H50O	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	92

Legenda: **TR** = tempo de retenção; **PM** = Peso molécula; **FM** = Fórmula molecular; **SI** = Índice de similaridade.

TABELA 17 - Compostos identificados no cromatograma da subfração F_B da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas.

PICO	TR	AREA%	NOME DO COMPOSTO (BANCO DE DADOS)	PM	FM	IUPAC	SI
1	11.923	0.43	Thymol	150	C10 H14 O	Thymol	92
2	12.197	1.00	Thymol	150	C10 H14 O	Thymol	91
3	16.772	0.07	3-T-Butyl-4-methoxyphenol	180	C11H16O2	4-Methoxy-3-(2-methyl-2-propanyl)phenol	76
4	16.956	2.75	.beta.-D-Glucopyranose, 1,6-anhydro-	162	C6H10O5	(1R,2S,3S,4R,5R)-6,8-Dioxabicyclo[3.2.1]octane-2,3,4-triol	88
5	18.598	0.42	2-Methoxy-4-ethyl-6-methylphenol	166	C10H14O2	4-Ethyl-2-methoxy-6-methylphenol	83
6	20.830	41.80	Ethyl .alpha.-d-glucopyranoside	208	C8H16O6	Ethyl α-D-glucopyranoside	89
7	26.819	0.81	n-Hexadecanoic acid	256	C16H32O2	Palmitic acid	95
8	27.327	0.34	Hexadecanoic acid, ethyl ester	284	C18H36O2	Ethyl palmitate	94
9	28.305	0.83	9-Octadecenoic acid (Z)-	281	C18H35NO	(9Z)-9-Octadecenamide	79
10	28.769	0.56	Cyclohexanol, 4-[(trimethylsilyl)oxy]-, c	188	C9H20O2Si	-	-
11	29.552	0.18	Phytol	296	C20H40O	(2E,7R,11R)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	93
12	30.113	0.31	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	278	C18H30O2	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid	92
13	30.514	0.29	Ethyl linoleate (JAN)	308	C20H36O2	Ethyl (9Z,12Z)-9,12-octadecadienoate	84
14	34.346	0.30	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	370	C22H42O4	Bis(2-ethylhexyl) adipate	95
15	34.634	16.71	Isobutyl (5-isopropyl-2-methylphenyl) carbonate	250	C15H22O3	Isobutyl 5-isopropyl-2-methylphenyl carbonate	83
16	34.850	6.85	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	150	C10H14O	2,3,5,6-Tetramethylphenol	64
17	35.066	19.04	5-Isopropyl-2-methylphenyl pentanoate	234	C15H22O2	5-Isopropyl-2-methylphenyl valerate	87
18	36.699	0.58	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	390	C24H38O4	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	97
19	37.544	0.27	2,5-Dimethoxy-4-ethylamphetamine	223	C13H21NO2	1-(4-Ethyl-2,5-dimethoxyphenyl)-2-propanamine	75
20	38.972	5.37	Durohydroquinone	166	C10H14O2	2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzenediol	79

21	47.847	1.08	Stigmast-5-en-3-ol, (3.β.)-	414	C29H50O	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	90
----	--------	------	-----------------------------	-----	---------	-------------------------	----

Legenda: **TR** = tempo de retenção; **PM** = Peso molécula; **FM** = Fórmula molecular; **SI** = Índice de similaridade.

TABELA 18 - Compostos identificados no cromatograma da subfração F_C da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia origanoides* Kunth, obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espetrômetro de massas.

PICO	TR	AREA%	NOME DO COMPOSTO (BANCO DE DADOS)	PM	FM	IUPAC	SI
1	12.020	0.64	Thymol	150	C10 H14 O	Thymol	88
2	12.290	0.83	Carvacrol	150	C10 H14 O	5-Isopropyl-2-methylphenol	85
3	12.685	0.59	1,3-Dioxolane, 2,2-dimethyl-4,5-di-1-propenyl-	182	C11H18O2	2,2-Dimethyl-4,5-di[(1E)-1-propen-1-yl]-1,3-dioxolane	75
4	14.090	0.17	3,3,6,9,9,10-Hexamethyl-2,10-diazabicyclo[4.4.0]-1-d	222	C14 H26 N2	-	81
5	16.936	0.21	3S*,7S*-7-Hydroxy-7-methyl-1-oxadispiro[2.0.2.4]de	180	C10 H12 O3	-	70
6	17.285	0.73	1,6-Anhydro-Beta-D-Glucopyranose (Levoglucozan)	162	C6H10O5	(1R,2S,3S,4R,5R)-6,8-Dioxabicyclo[3.2.1]octane-2,3,4-triol	79
7	17.926	0.18	2(4H)-Benzofuranone, 5,6,7,7a-tetrahydro-4,4,7a-trimethyl-	180	C11H16O2	4,4,7a-Trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydro-1-benzofuran-2(4H)-one	77
8	18.858	0.31	2-Methoxy-4-ethyl-6-methylp	166	C10H14O2	4-Ethyl-2-methoxy-6-methylphenol	74
9	20.339	28.13	Ethyl .alpha.-d-glucopyranoside	208	C8H16O6	Ethyl α-D-glucopyranoside	90
10	24.261	1.58	Neophytadiene	278	C20H38	7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1-hexadecene	95
11	24.425	2.58	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl- (C	268	C18H36O	6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone	96
12	26.854	21.53	n-Hexadecanoic acid	256	C16H32O2	Palmitic acid	96
13	27.323	7.27	Hexadecanoic acid, ethyl ester	284	C18H36O2	Ethyl palmitate	96
14	29.556	0.62	Phytol	296	C20H40O	(2E,7R,11R)-3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	94
15	29.980	1.07	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	280	C18H32O2	(9Z,12Z)-9,12-Octadecadienoic acid	95
16	30.105	2.84	9,12,15-Octadecatrienoic acid, (Z,Z,Z)-	278	C18H30O2	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid	91
17	30.485	2.08	9-Octadecenoic acid (Z)-	281	C18H35NO	(9Z)-9-Octadecenamide	91
18	30.936	1.14	Heptadecanoic acid, ethyl ester	298	C19H38O2	Ethyl heptadecanoate	93

19	34.343	3.90	Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	370	C22H42O4	Bis(2-ethylhexyl) adipate	108 96
20	34.543	1.59	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	150	C10H14O	2,3,5,6-Tetramethylphenol	69
21	34.846	1.86	Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-	150	C10H14O	2,3,5,6-Tetramethylphenol	67
22	36.700	6.60	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-ethylhexyl) ester	390	C24H38O4	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	97
23	37.330	0.78	Ethyl ester of docosanoic a	368	C24H48O2	Ethyl docosanoate	85
24	38.779	0.35	2-methylhexacosane	380	C27H56	2-Methylhexacosane	82
25	38.943	2.75	tert-Butylhydroquinone, diacetate	250	C14H18O4	2-(2-Methyl-2-propanyl)-1,4-phenylene diacetate	76
26	40.107	0.89	9-Octadecenamide, (Z)-	281	C18H35NO	(9Z)-9-Octadecenamide	90
27	40.175	0.85	Ethyl ester of docosanoic A	368	C24H48O2	Ethyl docosanoate	82
28	41.049	1.21	14-.Beta.-H-pregna	288	C21 H36	-	-
29	41.349	1.67	14-.Beta.-H-pregna	288	C21 H36	-	-
30	47.845	2.65	Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)-	414	C29H50O	(3β)-Stigmast-5-en-3-ol	88
31	47.994	0.84	Stigmasta-3,5-dien-7-one	410	C29H46O	Stigmasta-3,5-dien-7-one	61
32	49.447	1.56	Methyl commate D	486	C31 H50 O4	-	86

Legenda: **TR** = tempo de retenção; **PM** = Peso molécula; **FM** = Fórmula molecular; **SI** = Índice de similaridade.

Também foi utilizado critério de seleção de compostos para análise dos cromatogramas e quando avaliado apenas as moléculas com percentual de área acima de 1% e com grau de similaridade acima de 90% com os cromatogramas das bibliotecas, em FAE os picos reduzem de 60 para 15, mas ainda tendo 2 picos isoméricos de linolato de etila. No cromatograma de F₁ reduzem de 66 para 14 picos sem isômeros, em F_A reduzem de 35 para 11 picos sem isômeros, em F_B reduzem de 21 para 2 picos, apenas timol e sitosterol e em F_C reduzem de 32 para 11 picos sem isômeros.

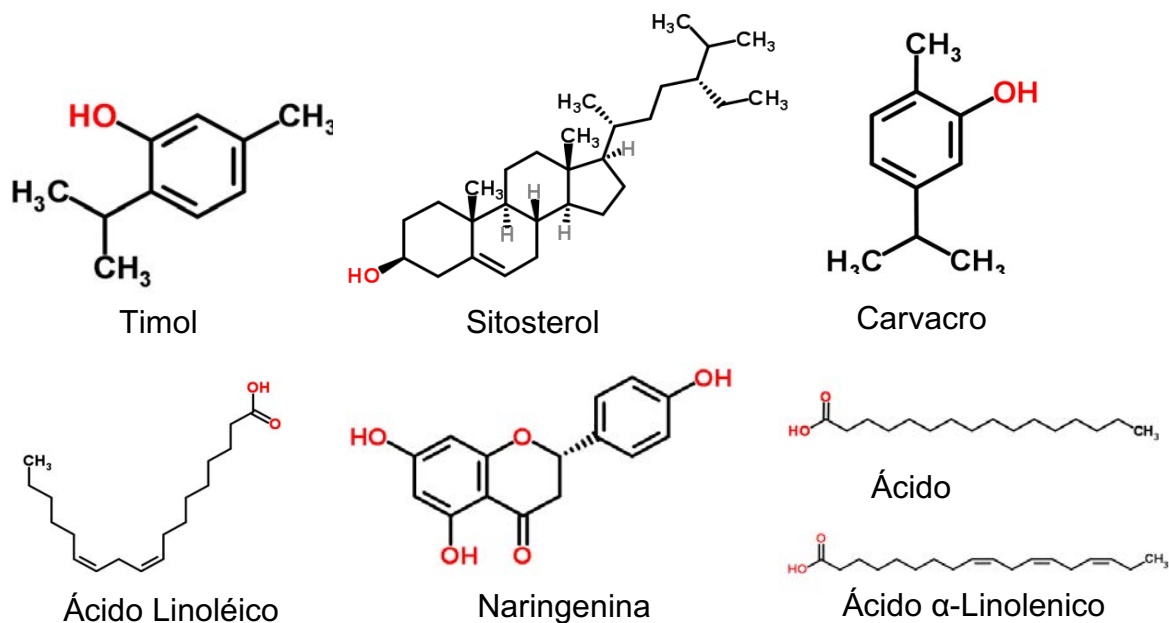
Na análise comparativa entre os cromatogramas, sete compostos aparecem em todas as amostras e observa-se que a separação não foi muito efetiva para compostos como timol, ácido palmítico, palmitato de etila, (9Z)-9-octadecenamida, ácido α -Linolenico, Ftalato bis (2-etilhexil) e sitosterol.

As subfrações F₁ e F_A foram as mais ativas nos testes antimicrobianos e seus cromatogramas mostram seis compostos que estão tanto em FAE, que também teve atividade, quanto em suas duas subfrações mais promissoras, estes compostos foram: timoquinona, 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol, 2-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil, sakuranina, naringenina e hesperetina. Nestes últimos compostos já foi encontrada atividade antimicrobiana e antifúngica na literatura (WEIDENBORN et al. 1989; BRANTNER; BRANTNER, 1991). No caso da naringenina, possivelmente o composto é responsável pela ação antibiótica da espécie, por estar presente na fração e subfrações ativas e pela sua concentração estar mais elevada na subfração que obteve os melhores resultados.

Não há na literatura estudos com naringenina isolada de *L. origanoides*, mas existem trabalhos com a identificação da molécula em extratos da planta e avaliação antimicrobiana frente a vários micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos (BARRETO et al. 2014a; BARRETO et al. 2014b; BORGES et al. 2016).

Alguns outros compostos presentes na subfração F_A também já possuem estudos de atividade antimicrobiana realizada, como timoquinona (CHALCHAT et al., 1991), timol e carvacrol (GUTIÉRREZ-FERNANDEZ et al., 2013), ácido palmítico (AVRAHAMI; SHAI, 2004), ácido linoleico (O'SHEA et al., 2012), ácido α -Linolenico (SADO-KANDEM et al., 2009) e sitosterol (FANNANG et al., 2011). Alguns destes compostos em destaque estão representados na Figura 22.

Figura 22 - Estruturas químicas de compostos em destaque encontrados na subfração F_A da fração acetato de etila do extrato hidroetanólico das folhas de *Lippia organoides* Kunth através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas.



Fonte: Autor

6 CONCLUSÕES

O critério na seleção das espécies para a pesquisa científica antimicrobiana é algo primordial no planejamento experimental e a abordagem etnodirigida, apesar de todas as suas qualidades, foi possível identificar que existem, de fato, limitações quando o pesquisador se propõe escolher este método de seleção de espécies. Pode-se observar estes limites uma vez que plantas unicamente anti-inflamatórias foram mais antimicrobianas que as unicamente antimicrobianas, podendo este cenário sugerir três situações que podem ser complementares: (i) as pessoas não distinguem bem as situações de inflamação; e/ou (ii) os pesquisadores não captam bem tais informações sobre o sistema médico local; e/ou (iii) as plantas podem passar por um processo de evolução no conhecimento popular e serem utilizadas inicialmente como anti-inflamatórias, já que a inflamação traz sintomas mais visíveis, para depois serem percebidas como antimicrobianas.

Em uma bioprospecção de plantas antimicrobianas escolhidas pela abordagem etnodirigida, sugere-se ao pesquisador, adicionar à sua lista de possíveis candidatas ao estudo, também aquelas plantas citadas pela população de interesse como sendo anti-inflamatórias, para que não se perca uma potencial espécie com atividade antimicrobiana.

Várias técnicas cromatográficas foram utilizadas no presente trabalho e serviram para refinar mais a pesquisa que começou com uma espécie alvo e foi sendo aprimorado e otimizado com a ajuda destas técnicas. Existem vários métodos de fracionamento fitoquímico, a coluna filtrante foi escolhida para fazer a semipurificação do extrato bruto e cumpriu bem o objetivo de separação por polaridades crescentes, assim como as técnicas de triagem fitoquímica por HPTLC, separação apurada da fração alvo por Cromatografia Líquida de Média Pressão e caracterização destas amostras por Cromatografia gasosa.

Apesar do objetivo da bioautografia, no presente trabalho, ter sido guiar o subfracionamento da fração acetato de etila em MPLC, se faz necessário utilizar a técnica de cromatografia em camada delgada bidimensional e avaliar este desenvolvimento da placa com reveladores específicos para cada classe de metabólito secundário, com finalidade de identificar o (s) grupo (s) fitoquímico (s) que causa (m) esta atividade.

A modulação de drogas antimicrobianas é algo necessário frente a micro-organismos multirresistente e os produtos naturais se tornam uma boa alternativa para

esta finalidade, seja pelo isolamento de compostos ou pelo aproveitamento de amostras semi-purificadas, principalmente porque produtos naturais sempre foram fonte e alvo de pesquisa para novos antimicrobianos e também possuem esse papel importante de agirem como modificadores de resistência antibiótica.

O presente trabalho conseguiu trazer pontos importantes para discussão e trouxe resultados que contribuem para conhecimento científico de plantas com potencial terapêutico nas áreas de etnobotânica, fitoquímica e antimicrobiana, principalmente pelo apelo ao estudo com plantas da Caatinga, que mesmo possuindo um maior interesse por parte da comunidade científica nos últimos tempos, ainda chama atenção pelo grande potencial farmacológico e químico, com espécies que sofrem estresses abióticos e fortalecem sua formação biótica com o passar do tempo.

REFERENCIAS

- AARESTRUP, F. M.; SEYFARTH, A. M.; EMBORG, H. D.; PEDERSEN, K.; HENDRIKSEN, R. S.; BAGER, F. 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**, v. 45, p. 2054-2059. 2001.
- 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**, v. 32, n. 1, p. 47-58. 2011.
- ABRAHAM, D.J. **Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery: Chemotherapeutic Agents**. 5. vol. 6. ed. San Francisco: John Willey & Sons, 2003. 808p.
- ADWAN, M.G.; ABU-SHANAB A.B; ADWAN, M.K. In vitro activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. **Pakistan Journal of Medical Science**. v. 24, p. 541-544. 2008.
- AGRA, M. F.; BARACHO, G. S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I. J.; COELHO, V. P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of Cariri Paraibano, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-395. 2007.
- AHMED, D.; SAEED, R.; SHAKEEL, N.; FATIMA, K.; ARSHAD, A. Antimicrobial activities of methanolic extract of *Carissa opaca* roots and its fractions and compounds isolated from the most active ethyl acetate fraction. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 7, p. 541-545. 2015.
- AJALI, U.; CHUKWURAH, B. K. C. Antimicrobial activity of *Securidaca longipedunculata*. **Phytomedicine**, v. 11, p. 701-03. 2004.
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, v. 72, p. 286-287. 2001.
- ALBANESE, J. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetics of vancomycin administered by continuous infusion to mechanically ventilated patients in an intensive care unit. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 1356-1358. 2000.
- 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**, v. 16, n. 3, p. 273-285. 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**, v. 16 (Supl), p. 678-689. 2006.
- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. **Journal Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325-354. 2007.

ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; RAMOS, M. A.; FERREIRA, W. S.; NASCIMENTO, A. L. B.; AVILEZ, W. M. T.; MELO, J. G. Are ethnopharmacological surveys useful for the discovery and development of drugs from medicinal plants?. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 110-115. 2014.

ALBUQUERQUE, U. P.; NASCIMENTO, L. G. S.; VIEIRA, F. J.; ALMEIDA, C. M. A. D.; RAMOS, M. A.; SILVA, A. C. O. "Return" and Extension Actions After Ethnobotanical Research: The Perceptions and Expectations of a Rural Community in Semi-arid Northeastern Brazil. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 25, p. 19–32. 2012.

ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native Caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 156–170. 2007.

ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; SILVA, J. R. A.; VEIGA JUNIOR, V. F. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 40, n. 3, p. 567-572. 2010.

ALENCAR, N. L.; ARAÚJO, T. A. S.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Can the apparency hypothesis explain the selection of medicinal plants in an area of Caating vegetation? A chemical perspective. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 908–909. 2009.

ALMEIDA, C. D. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; MAIA, M. B. S. Medicinal plants popularly used in the Xingó region – a semi-arid location in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, n. 15, p. 1-9. 2006.

ALMEIDA, C. D. C. B. R.; CABRAL, D. L. D.; ALMEIDA, C. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ARAÚJO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2, p. 201-207. 2012.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Insights into the search for new drugs from traditional knowledge: An ethnobotanical and chemical–ecological perspective. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 8, p. 864–873. 2011.

ALMEIDA, C. F. C. B. R.; SILVA, T. C. D. E.; AMORIM, E. L. C.; MAIA, M. B. D.; ALBUQUERQUE, U. P. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **Journal of Arid Environments**, v. 62, p. 127-142. 2005.

ALVES, T. M. D.; SILVA, A. F.; BRANDAO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMANIA, E. D. A.; JUNIOR, A. S.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373. 2000.

AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n. 1, p. 88-94. 2008.

AMORIM, M. L.; VASCONCELOS, C.; OLIVEIRA, D. C.; AZEVEDO, A.; CALADO, E.; FARIA, N. A.; PEREIRA, M.; CASTRO, A.P.; MOREIRA, A.; AIRES, E.; CABEDA, J. M.; RAMOS, M. H.; AMORIM, J. M.; DE LENCASTRE, H. Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Nasal Colonization Among Patients and Healthcare Workers in a Portuguese Hospital: A Pre-intervention Study Toward the Control of MRSA. **Microbial drug resistance**, v. 15, n. 1. 2009.

AN, J.; ZUO, G. Y.; HAO, X. Y.; WANG, G. C.; LI, Z. S. Antibacterial and synergy of a flavanonol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 18, p. 990–993. 2011.

ANDREWS, J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 1049. 2002.

ANSARI, S. H.; ALI, M.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; PEREZ-ALONSO, M. J. Characterization of Volatile Constituents of Mango ‘Qalmi’ *Mangifera indica* L. Fruit. **Journal of Essential Oil**, v. 16, p. 417-419. 2004.

AQIL, F.; KHAN, M. S.; OWAIS, M.; AHMAD, I. Effect of certain bioactive plant extracts on clinical of β -lactamase producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45; p.106-114. 2005.

ARAUJO, T. A. S.; ALENCAR, N. L.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 72-80. 2008.

ARAUJO, T. A. S.; CASTRO, V. T. N. D. E.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondias tuberosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 754-759. 2012.

ARAÚJO, T. A. S.; MELO, J. G.; ALBUQUERQUE, U. P. Plantas medicinais. In: ALBUQUERQUE, U. P. (org.). **Introdução à Etnobiologia**. Recife: NUPEEA, 2014. 189 p.

ARAÚJO, T. A. S.; PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. S.; AGUIAR, J. S.; SILVA, A. C. O.; BRITO, F. U.; SILVA, T. G.; AMORIM, E. L. C.; PRANCHEVICIUS, M. C. S. Phytochemical, antioxidant and cytotoxic analysis of Brazilian cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 9, p. 310-319. 2015.

ARNÁIZ-GARCÍA, A. M.; ARNÁIZ-GARCÍA, M. E.; ARNÁIZ, J. Management of furuncle, furunculosis and anthrax. **Med Clin (Barc)**, v. 144, p. 376–378. 2015.

AVRAHAMI, D.; SHAI, Y. A New Group of Antifungal and Antibacterial Lipopeptides Derived from Non-membrane Active Peptides Conjugated to Palmitic Acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, pp.12277-12285. 2004.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 36, n. 4, p. 732-742. 2011.

BARRETO, H. M.; COELHO, B. R. C.; MENEZES-SILVA, S. M. P.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; COUTINHO, H. D. M.; LEMOS, I. C. S.; SOUSA, T. O.; SILVA, R. A. C.; MEDEIROS, M. G. F.; CITO, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Light-mediated

antibacterial activity of *Lippia organoides* H.B.K. in vitro. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 13, n. 12, pp.1650-1654. 2014a.

BARRETO, H. M.; FONTINELE, F. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARCANJO, D. D. R.; SANTOS, B. H. C.; ABREU, A. P. L.; COUTINHO, H. D. M.; SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; MEDEIROS, M. G. F.; CITO, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D.; REDDY, A. B. Phytochemical Prospection and Modulation of Antibiotic Activity In Vitro by H.B.K. in Methicillin Resistant. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 7. 2014b.

BARRY, A. L. **Procedure goes testing antimicrobial agents in Agar measures: theortical considerations**. Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Willians, 1986. p. 13.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493 – 496. 1966.

BEIERSMANN, C.; SANOU A.; WLADARSCH, E.; DE ALLEGRI, M.; KOUYATÉ, B.; MÜLLER O. Malaria in rural Burkina Faso: local illness concepts, patterns of traditional treatment and influence on health-seeking behavior. **Malaria Journal**, v. 6, p. 106. 2007.

BERNARD, F.X., SABLE, S., CAMERON, B., PROVOST, J., DESNOTTES, F., CROUZET, J., BLANCHE, F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41; p. 992–998. 1997.

BETONI, J. E. C.; MANTOVANI, R. P.; BARBOSA, L. N.; DI STASI, L. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on 77 *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-90. 2006.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225. 2014.

BONAPACE, C. R.; WHITE, R. L.; FRIEDRICH, L. V.; BOSSO, J. A. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, n. 1, p. 43-50. 2000.

BORGES, A.; ABREU, A.; DIAS, C.; SAAVEDRA, M.; BORGES, F.; SIMÕES, M. New Perspectives on the Use of Phytochemicals as an Emergent Strategy to Control Bacterial Infections Including Biofilms. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 877. 2016.

BRAGA, L.C.; LEITE, A. A.M.; XAVIER, K.G.S.; TAKAHASHI, J. A.; BEMQUERER, M. P.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51; p. 541-547. 2005.

BRANTNER, A.; BRANTNER, H. Screening of flavonoid aglycones and glycosides for antimicrobial activity. **Planta Medica**, v. 57, p. 43-44. 1991.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 19 mar. 2018a

BRINSKIN, D. P. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to human Health. **Pant Physiology**, v. 124, p. 507-514. 2000.

BRODY, T.M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K.P. **Human Pharmacology**. Missouri, Mosby, 3. ed, 1998. 1001p.

BRUNTON, L. L; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12. ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 2012. 2112 p.

BYLKA, W.; MATLAWSKA, I.; PILEWSKI, N. A. Natural flavonoids as antimicrobial agents. **Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 7, p. 24-31. 2004.

CABRAL, D. L. V. **Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como anti-inflamatórias**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

CARRAI, V.; BORGOGNINI-TARLI, S. M.; HUFFMAN, M. A.; BARDI, M. Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self-medication in prosimians?. **Primates**, v. 44, p. 61-66. 2003.

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

CARVALHO, R. S.; CAROLLO, C. A.; MAGALHÃES, J. C.; PALUMBO, J. M. C.; BOARETTO, A. G.; NUNES E SÁ, I. C.; FERRAZ, A. C.; LIMA, W. G.; SIQUEIRA, J. M.; FERREIRA, J. M. S. Antibacterial and antifungal activities of phenolic compound-enriched ethyl acetate fraction from *Cochlospermum regium* (mart. Et. Schr.) Pilger roots: Mechanisms of action and synergism with tannin and gallic acid. **South African Journal of Botany**, v. 114, p. 181–187. (2018).

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p.70-76. 2005.

CASTRO, H. G.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala*); em diferentes épocas de colheita em Viçosa-MG. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 1, n. 2, p. 29. 1999.

CAUWELIER, B.; GORDTS, B.; DESCHEEMAECKER, P.; VAN LANDUYT, H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30µg) for detection of methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal Microbiology Infectious Diseases**, v. 23, p. 389-392. 2004.

CETIN-KARACA, H.; NEWMAN, M. C. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against Salmonella and Escherichia coli. **Food Bioscience**, v. 11, p. 8-16. 2015.

CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P.; BASTIDE, P.; FABRE, F.; MALHURET, R. Correlation Composition Chimique/Activite Antimicrobienne: V - Contribution a la Comparaison de 2 Methodes de Determination Des Cmi. **Plantes medicinales et phytotherapie**, v. 25, p. 184-193. 1991.

CHAMBERS, H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? **Emerging INFECTIOUS DISEASES**, V. 7, P. 178-82. 2001.

CHANDER, M. P.; PILLAI, C. R.; SUNISH, I. P.; VIJAYACHARI, P. Antimicrobial and antimalarial properties of medicinal plants used by the indigenous tribes of Andaman and Nicobar Islands, India. **Microbial Pathogenesis**, v. 96, p. 85-88. 2016.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1044–1048. 2007.

CHOUDHARI, A. S.; RAINA, P.; DESHPANDE, M. M.; WALI, A. G.; ZANWAR A.; BODHANKAR, S. L.; KAUL-GHANEKAR, R. Evaluating the anti-inflammatory potential of Tectaria cicutaria L. rhizome extract in vitro as well as in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 215-222. 2013.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; BISNO, A. L. Adherence of slimeproducing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, p. 318-326. 1982.

CHUNG, K.; WEI, C.; JOHNSON, M. G. Are tannins a double-edged sword in biology and health. **Trends in Food Science and Technology**. v. 9, p.168. 1998.

CHUNG, K.; WONG, T. Y.; WEI, C.; HUANG, Y.; LIN, Y. Tannins and human health: a review. **Critical Review in Food Science and Nutrition**. v. 38, p. 421. 1998.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline**. 1. ed. CLSI document M26-A. 1999.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard**. 10. ed. CLSI document M07-A10. 2015.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28. ed. CLSI supplement M100. 2018.

COELHO-CASTELO, A. A. M.; TROMBONE, A. P. F.; ROCHA, C. D.; LORENZI, J. C. C. Immune response to infectious diseases. **Medicina (Ribeirão Preto)**. v. 42, n. 2, p.127-142. 2009.

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

COSTA, M. J. R. P. **Etologia e produtividade animal**. Disponível em: <<http://www.uff.br/webvideoquest/CS/etologia%20animal.pdf>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

COSTA, V.C.O.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; FALCÃO-SILVA, V.S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; MARQUES, M.O.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, M.S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 245-248. 2008.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, p. 328-330. 2008.

CRAWFORD, D. J.; GIANNASI, D. E. Plant Chemosystematics. **BioScience**, v. 32, n. 2, p. 114-118+123-124.1982.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agentes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 174-181. 2012.

DARWISH, R. M.; ABURJAI, T.; AL-KHALIL, S.; MAHAFAZAH, A. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 359-364. 2002.

DAUM, R. S. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 380-90. 2007.

DAVID, J.; PIMENTEL J. C.; FREIRE R. P. A. Aspecto Fenotípico da Resistência dos Estafilococos à Clindamicina e Eritromicina. **NewsLab**, v. 70, p. 114-115. 2005.

DEL-CLARO, K. **Comportamento animal: uma introdução a ecologia comportamental**. Ed. Livraria Conceito, Jundiaí, São Paulo. 2004. 132p.

DIAZ-CAYCEDO, N.; PAYÁN-MADRIÑÁN, M. A.; PÉREZ- ACOSTA, A. M. Psychological Approach to self-medication behavior. **Revista Costarricense de Psicología**, v. 33, n. 1, p. 17-29. 2014.

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

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

ENGLEBERG, N. C.; DIRITA, V.; DERMODY, T. **Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease**. 5. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 826p.

ERAZO, S.; DELPORTE, C.; NEGRETE, R.; GARCIA, R.; ZALDIVAR, M.; ITURRA, G.; CABALLERO, E.; LOPEZ, J. L.; BACKHOUSE, N. Constituents and biological

activities of *Schinus polygamus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 395–400. 2006.

ESIMONE, C.O.; ROHA I.R.; IBEZIM E.C.; OKEH, C. O.; OKPANA, E. M. In vitro evaluation of the, interaction between tea extracts and penicillin G against *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 5; p. 1082-1086. 2006.

ESTEVAM, C. S. CAVALCANTI, A. M.; CAMBUI, É. V. F.; NETO, V. A.; LEOPOLDO, P. T. G.; FERNANDES, R. P. M.; ARAUJO, B. S.; PORFÍRIO, Z; SANT'ANA, A. E. G. Perfil fitoquímico e ensaio microbiológico dos extratos da entrecasca de *Maytenus rígida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1b, p. 299-303. 2009.

FANNANG, S. V.; KUETE, V.; MBAZOA, C. D.; MOMO, J. I.; VAN-DUFAT, H. T.; TILLEQUIN, F.; SEGUIN, E.; CHOSSON, E.; WANDJI, J. A new acylated triterpene with antimicrobial activity from the leaves of *Rauvolfia vomitoria*. (Report). **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 3, p.404-4. 2011.

FARR, B. M. Prevention and control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, p. 317-22. 2004.

FEENY, P. P. Plant apparency and chemical defense. In: WALLACE, J. W; MANSELL, R. L. eds. **Recent Advances in Phytochemistry**. New York: Plenum Press. 1976. p. 1–40.

FELDBERG, A.R.S.; CHANG, S.C.; KOTIK, T.N.; NADLER, M.; NEUWIRTH, Z.; SUNDSTROM, D. C.; THOMPSON, N. H. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 32, p. 1763–1768. 1988.

FERNÁNDEZ-CUENCA, F.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; PEREA, E. J. In vitro activity of azithromycin in combination with amikacin, ceftazidime, ciprofloxacin or imipenem against clinical isolates of *Acinobacter baumannii*. **Chemotherapy**, v. 49, n. 1-2, p. 24-6. 2003.

FERNANDEZ, F. S.; CARDENAS, C. M.; ELSTER, M. C. Incidencia de resistência constitutiva e inducible a clindamicina en *Staphylococcus* spp. aislados en un centro ambulatorio. **Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, v. 35, n. 2, p. 10-13. 2004.

FERREIRA-JUNIOR, W. S.; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 238-252. 2011.

FERREIRA-JUNIOR, W. S.; SILVA, T. G.; MENEZES, I. R. A.; ALBUQUERQUE, U. P. The role of local disease perception in the selection of medicinal plants: A study of the structure of local medical systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 181, p. 146-157. 2016.

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

- FERREIRA, R. B. R.; IORIO, N. L. P.; MALVAR, K. L.; NUNES, A. P. F.; FONSECA, L. S.; BASTOS, C. C. R.; SANTOS, K. R. N. Coagulase-negative staphylococci: comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the Agar screen test by using different concentrations of oxacillin. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3609-3614. 2003.
- FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230. 2007.
- FLOCK, J. I. HIENZ, S. A.; HEIMDAHL, A.; SCHENNINGS, T. Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 1876-1878. 1996.
- FUHRMAN, B.; VOLKOVA, N.; KAPLAN, M.; PRESSER, D.; ATTIAS, J.; HAYEK, T.; AVIRAM, M. Antiatherosclerotic effects of licorice extract supplementation on hypercholesterolemic patients: increased resistance of LDL to atherogenic modifications; reduced plasma lipid levels; and decreased systolic blood pressure. **Nutrition**, v. 18, p. 268. 2002.
- FUJITA, M., SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; MIZUSHIMA, T.; TSUCHIYA, T. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Microbiology and Immunology**, v. 49, p. 391-396. 2005.
- GANGCUANGCO, L. M.; ALEJANDRIAA, M. K.; HENSONA, E.; ALFARAZA, L.; ATAA, R. M.; LOPEZA, M.; SANIELA, M. Prevalence and risk factors for trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *Escherichia coli* among women with acute uncomplicated urinary tract infection in a developing country. **International Journal of Infectious diseases**, v. 34, p. 55-60. 2015.
- GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P.; D'AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 501-6. 2009.
- GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural products reports**, v. 21, p. 263-277. 2004.
- GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Clonal distribution of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae*. **Diagnostic Microbiology and infectious disease**, v. 81, p. 264-268. 2015.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381. 2007.
- GONÇALVES, A. L., FILHO, A. A., MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 3, p. 353-358. 2005.
- GRIEP, M.A.; BLOOD, S.; LARSON, M.A.; KOEPESELL, S. A.; HINRICHS, S. H. Myricetin inhibits *Escherichia coli* DnaB helicase but not primase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15; p. 7203–7208. 2007.

- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. cap. 1, p. 13-28.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679. 2010.
- GUO, S. Y.; WAKEHAM, D.; BROUWERS, H. J. M.; COBBOLD, R. N.; ABRAHAM, S.; MOLLINGER, J. L.; JOHNSON, J. R.; CHAPMAN, T. A.; GORDON, D. M.; BARRS, V. R.; TROTT, D. J. Human-associated fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* clonal lineages, including ST354, isolated from canine feces and extraintestinal infections in Australia. **Microbes and infection**, v. 17, p. 266-274. 2015.
- GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, J.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; ÁLVAREZ-ALONSO, R.; DEL VALLE, P.; ARRIAGA, D.; RÚA, J. Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 8, pp. 4912-4920. 2013.
- GYLLENHAAL, C.; KADUSHIN, M. R.; SOUTHAVONG, B.; SYDARA, K.; BOUAMANIVONG, S.; XAIVEU, M.; XUAN, L. T.; HIEP, N. T.; HUNG, N. V.; LOC, P. K.; DAC, L. X.; BICH, T. Q.; CUONG, N. M.; LY, H. M.; ZHANG, H. J.; FRANZBLAU, S. G.; XIE, H.; RILEY, M. C.; ELKINGTON, B. G.; NGUYEN, H. T.; WALLER, D. P.; MA, C. Y.; TAMEZ, P.; TAN, G. T.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D. Ethnobotanical approach versus random approach in the search for new bioactive compounds: support of a hypothesis. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 1, p. 30-41. 2012.
- HALL, M. J.; MIDDLETON, R. F.; WESTMACOTT, D. The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 11, n. 5, p. 427-33. 1983.
- HARBONE, J. B. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504. 2000.
- HARTANTI, D.; SUPRIYANTO, J.; SUGIJANTO, N. E. N. Antimicrobial Activity of Fractions of Ethyl Acetate Extract of *Cladosporium oxysporum*, An Endophytic Fungus Derived from *Alyxia reinwardtii*. **Jurnal Kefarmasian Indonesia**, v. 6, n.1, p.1-7. 2016.
- HATANO, T.; KUSUDA, M.; INADA, K. Effect of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2047–2055. 2005.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. (REVIEW). **Phytomedicine**, v. 15, p. 639 – 652. 2008.
- HERNDON, C. N.; UITERLOO, M.; UREMARU, A.; PLOTKIN, M.J.; EMANUELS-SMITH, G.; JITAN, J. Disease concepts and treatment by tribal healers of an Amazonia forest culture. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, p. 27. 2009.

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

JAYARAMAN, P.; SAKHARKAR, M.K.; LIM, C.S.; TANG, T. H.; SAKHARKAR, K. R. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **International Journal of Biological Science**, v. 6, n. 6, p. 556-68. 2010.

JUNG, C. H.; SEOG, H. M.; CHOI, I. W.; PARK, M. W.; CHO, H. Y. Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. **LWT. Food Science and Technology**, v. 39, p. 266. 2006.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. São Paulo, McGraw Brasil, 9. ed., 2007. 1228p.

KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. **Natural Products from Plants**, CRC Press, Boca Raton, FL. 1999.

KHAFAGI, I. K.; DEWEDAR, A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 365-376. 2000.

KITAHARA, T.; AOYAMA Y.; HIRAKATA, Y.; KAMIHIRA, S.; KOHNO, S.; ICHIKAWA, N.; NAKASHIMA, M.; SASAKI, H.; HIGUCHI, S. In vitro activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International journal of antimicrobial agents**, v. 27; n. 1; p. 51-57. 2006.

KOFTERIDIS, D. P.; VALACHIS, A.; DIMOPOULOU, D.; MARAKI, S.; CHRISTIDOU, A.; MANTADAKIS, E.; SAMONIS, G. Risk Factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization: A case-case-control study. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 20, p. 293-297. 2014.

KONATÉ, K.; MAVOUNGOU, J. F.; LEPENGUÉ, A. N.; AWORET-SAMSENY, R. R. R.; HILOU, A.; SOUZA, A.; DICKO, M. H.; M'BATCHI, B. Antibacterial activity against β -lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, p. 18. 2012.

KONEMAN, E. W.; WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas em cor, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 12, parte 1, 2006. p. 593-639.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN-JR, W. C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. México: J. B. Lippincott Co. 1997, 570p.

KREISBERGER, G.; HIMMELSBACH, M.; BUCHBERGER, W.; KLAMPFL, C. W. Identification and semi-quantitative determination of anti-oxidants in lubricants employing thin-layer chromatography-spray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1383, p. 169-174. 2015.

- KRIEF, S.; MARTIN, M. T.; GRELLIER, P.; KASENENE, J.; SEVENET, T. Novel Antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3196-3199. 2004.
- KUMAR, A. S.; VENKATESHWARAN, K.; VANITH, J.; SARAVANAN, V. S.; GANESH, M.; VASUDEVAN, M.; SIVAKUMAR, T. Synergistic activity of methanolic extract of *Thespesia populnea* (Malvaceae) flowers with oxytetracycline. **Bangladesh Journal Pharmacology**, v. 4, p. 13-16. 2009.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins. Patologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 929p.
- LAGO, J. **Mecanismos de Resistência e Seleção de Antibióticos**. Lisboa, Jornadas bioMérieux, 2011. 832p.
- LIU, F. F.; ANG, C. Y. W.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3.364-3.371. 2000.
- LIVERMORE, D. M. B-lactamase in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbial Review**, v. 8, n. 4, p. 557-584. 1995.
- LOOMIS, W. D.; CROTEAU, R. Biochemistry of Terpenoids. In: STUMPF, P. K. (ed). **Lipids: Structure and Function: The Biochemistry of Plants**. Ed. Elsevier. Volume 4, Cap. 13, p. 364-410. 2014
- LOPES, H. V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 7, n. 3, p. 34-36. 2005.
- LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5. ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, p. 1265-1273. 2003.
- LUTZ, L.; MACHADO, A.; KUPLICH, N.; BARTH, A. L. Clinical failure of vancomycin treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 224-8. 2003.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.
- MARANAN, M. C. MOREIRA, B.; BOYLE-VAVRA, S.; DAUM, R. S. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, p. 813-849. 1997.
- MARQUES, M. B.; BROOKINGS, E. S.; MOSER, S. A.; SONKE, P. B.; WAITES, K. B. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 41, n. 5, p. 881-5. 1997.

MARTENS, S.; MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2399-2407. 2005.

MEDLEY. MEDLEY INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA. **Programa de Desenvolvimento Profissional: ao farmacêutico**. Módulo V – Antibióticos. 2008.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.

Farmacognosia: da planta ao medicamento; 3. ed. Ed. UFSC: Porto Alegre. 2001. p. 527-554.

MELO, J. G.; RODRIGUES, M. D.; NASCIMENTO, S. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: A comparison of different selection approaches. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 47-53. 2017.

MENDES, L. P. M.; MACIEL, K. M.; VIEIRA, A. B. R.; MENDONÇA, L. C. V.; SILVA, R. M. F.; ROLIM NETO, P. J.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 121-125. 2011.

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**, v. 39, n. 2, p. 147-150. 2007.

MENEZES, E. A.; MACEDO, F. V. V.; CUNHA, F. A.; ANDRADE, M. S. S.; ROCHA, M. V. P. Perfil de infecção e resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados no Laboratório de Patologia Clínica Dr. Edison Gurgel, Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza-CE. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, n. 4, p. 209-12. 2004.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em Staphylococcus aureus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 399-406. 2007.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Tannis: from chemistry to ecology. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896. 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAUJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173–186. 2006b.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, M. M.; AMORIM, E. L. C. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 338-344. 2006a.

MOODY, J. A. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: H.D. Isenberg (Ed.), **Clinical Micro- biology Procedures**

Handbook. (pp. 5.18.1– 5.18.28). American Society for Microbiology, Washington, DC. 1992.

MOON, J. S.; LEE, A. R.; KANG, H. M.; LEE, E. S.; KIM, M. N.; PAIK, Y. H.; PARK, Y. H.; JOO, Y. S.; KOO, H. C. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin-resistant staphylococci isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1176-1185. 2007.

MORI, K. **Chemical Ecology.** Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, Elsevier. 2013.

MOUSSALLEM, B. C.; KURY, C. M. H.; ACOSTA, E. M. Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. **Revista Científica da FMC**, v. 2, n. 2, 2007.

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

MURRAY P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica.** 6. ed. Elsevier Editora, 2009. 948 p.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 247-256. 2000.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. L. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113. 2007.

NISHIZAWA, K.; NAKATA, I.; KISHIDA, A.; AYER, W. A.; BROWNE, L. M. Some biologically activities tannins of *Nuphar variegatum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2491. 1990.

NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, Supl 2, p. 05-08. 2003.

O'SHEA, E. F.; COTTER, P. D.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; HILL, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 189-205. 2012.

OBIANG-OBOUNOU, B. W.; RYU, G. H. The effect of feed moisture and temperature on tannin content, antioxidant and antimicrobial activities of extruded chestnuts. **Food Chemistry**, v. 141, p. 4166-4170. 2013.

OLIVEIRA, A. O.; OLIVEIRA, A. L. L.; PONTES, E. R. J. C.; OLIVEIRA, S. M. V. L.; CUNHA, R. V. Epidemiologia da infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva. **Revista Panamericana de Infectologia**, v.11, n. 2, p. 32-37. 2009.

OLIVEIRA, C. C.; SIQUEIRA, J. M.; SOUZA, K. C. B.; REZENDE, U. M. Antibacterial activity of rhizomes from *Cochlospermum regium*: preliminary results. **Fitoterapia**, v. 67, n. 2, p. 176-177. 1996:

OLIVEIRA, D. C.; TOMASZ, A.; DE LENCASTRE, H. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 180-189. 2002.

OLIVEIRA, G. A. OKADA, S. S.; GUENTA, R. S.; MAMIZUKA, E. M. Avaliação da tolerância à vancomicina em 365 cepas hospitalares de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 4, p. 239-246. 2001.

OLIVEIRA, L. B. S.; BATISTA, A. H. M.; FERNANDES, F. C.; SALES, G. W. P.; NOGUEIRA, N. A. P. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, p. 511-523. 2016.

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

ORSINI, J.; MAINARDI, C.; MUZYLO, E.; KARKI, N.; COHEN, N.; SAKOULAS, G. Microbiological Profile of Organisms Causing Bloodstream Infection in Critically Ill Patients. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 4, n. 6, p. 371–377. 2012.

OSBURNE, M. S.; ROTHSTEIN, D. M.; FARQUHAR, R.; MURPHY, C. K. 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**, v. 59, n. 2, p. 80–85. 2006.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of ibinimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307. 2008.

OTSUKA, T.; ZARAKET, H.; TAKANO, T.; SAITO, K.; DOHMAE, S.; HIGUCHI, W.; YAMAMOTO, T. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 3, p. 325-7. 2007.

PAIVA-JUNIOR, M. D. S. **Fatores associados ao tempo para o surgimento de bactérias Gram-negativas multidroga resistentes em pacientes críticos: um Estudo Prospectivo**. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2012.

PANKEY, G., SABATH, L. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections. **Oxford Journals**, v. 38, p. 864-865. 2013.

PARK, K. K.; BRODELL, R. T.; HELMS, S. E. Angular Cheilitis, Part 1: Local Etiologies. **Cutis**, v. 87, p. 289-295. 2011.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. New York, Oxford University Press, 2005.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. D.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 683-689. 2008.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; CARDOSO, K. D. M.; GOMES, T. D. B.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Análise da pluviosidade e do efeito de borda sobre os teores de flavonoides em *Bauhinia cheilantha* (Bong.) Steud., Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 3, p. 740-745. 2009.

PESEWU, G.A.; CUTLER, R.R.; HUMBER, D.P. Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 16; n. 1, p. 102-111. 2008.

PETERSEN, P. J.; LABTHAVIKUL, P.; JONES, C. H.; BRADFORD, P. A. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 573-6. 2006.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2. p. 268–280. 2004.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. D.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. D. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61. 2002.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. TAFT, C. A. (ed). **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Research Signpost, Kerala, 2006. Cap. 4. p. 51-78.

RAND, K. H.; HOUCK, H. J.; BROWN, P. D. BENNETT, D. Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 37, n. 3, p. 613–615. 1993.

RAZERA, F.; BONAMIGO, R. R.; DIAS, C. A. G.; DE STEFANI, S.; OLM, G. S.; NARVAEZ, G. A. CA MRSA in furunculosis: Case report of Southern Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 515-518. 2009.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2004. cap. 3, p.45-74.

REMONATTO, G.; CARDOSO, C. M.; MARQUES, C. G.; SILVA, A. E.; GELATTI, L. C.; LEITE, C. F. CA-MRSA: um patógeno emergente. **NewsLab**. v. 80. p.94-96, 2007.

REYES-GARCÍA, V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, n. 32. 2010.

- RICARDO, S. B. Emergência de *Staphylococcus aureus* Meticilina-Resistente na Comunidade. **Prática Hospitalar**, v. 34, p. 131-134. 2004.
- ROCCARO, A.S., BLANCO, A.R., GIULIANI, F.; RUSCIANO, D.; ENEA, V. Epigallocatechin gallate enhances the activity of tetracycline in *Staphylococci* by inhibitory its efflux from bacterial cells. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 48, p. 1968–1973. 2004.
- ROCHA, B. A.; MELO-FILHO, M. R.; SIMÕES, A. Antimicrobial Photodynamic Therapy to treat chemotherapy-induced oral lesions: Report of three cases. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 350-352. 2015.
- ROODE, J. C.; LEFÈVRE, T.; HUNTER, M. D. Self-medication in animals. **Science**, v. 340, p. 150-151. 2013.
- ROSADO-VALLADO, N.; BRITO-LOEZA, W.; MENA-REJON, G. J.; QUINTERO-MARMOL, E.; FLORES-GUIDO, J. S. Antimicrobial activity of fabaceae species used in Yucatan traditional medicine. **Fitoterapia**, v. 71, p. 570-573. 2000.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana**: interpretando o Antibiograma. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.
- ROWINSKY, E. K.; CAZENAVE, L. A.; DONEHOWER, R. C. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. **Journal of the Nacional Cancer Institute**. v. 82, n. 15, p. 1247-1259. 1990.
- SADO-KAMDEM, S. L.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E. Effect of α -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 3, pp.288-294. 2009.
- SANTOS, A. D. H.; MARTÍNEZ, J. E.; ROMÁN, C. G. S.; ANDREU, J. A. L. Bronchitis obliterans due to Influenza B pneumonia complicated with *Staphylococcus aureus* infection. **Archivos de Bronconeumologia**, v. 53, n. 8, p. 463-464. 2017.
- SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.), **Farmacognosia**: da planta ao medicamento, 4. ed. Editora Universitária/UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2002. p. 517–543.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.), **Farmacognosia**: da planta ao medicamento, 5. ed. Editora Universitária/UFRGS/UFSC, 2004. pp. 615–656.
- SARAIVA, A. M.; SARAIVA, C. L.; CORDEIRO, R. P.; SOARES, R. R.; XAVIER, H. S.; CAETANO, N. A. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 2, p. 199-207. 2013.

- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3875. 1991.
- SCHWALBE, R. S. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative Staphylococci. **New England Journal of Medicine**, v. 316, p. 925-930. 1987.
- SCRIVANTI, L. R.; ZUNINO, M. P.; ZYGADLO, J. A. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 563–572. 2003.
- SEIDL, P. R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 145, 2002.
- SHIMIZU, M.; SHIOTA, S.; MIZUSHIMA, T.; ITO, H.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; TSUCHIYA, T. Marked potentiation of activity of β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by corilagin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 45; p. 3198–3201. 2001.
- SIERRA R., C. I.; GUEVARA, E.; GUEVARA-PATIÑO, A. Actividad in vitro de piperacilina-tazobactam en combinación con aminoglucósidos y fluoroquinolonas en *Pseudomonas aeruginosa* productoras de metalo- β -lactamasas. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 31, p. 13-19. 2011.
- SILVA, A. C. O.; SANTANA, E. F.; SARAIVA, A. M.; COUTINHO, F. N.; CASTRO, R. H. A.; PISCIOTTANO, M. N. C.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Which Approach Is More Effective in the Selection of Plants with Antimicrobial Activity?. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-9. 2013.
- SILVA, C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, F.; VELOZO, E. S. Evaluation of the antimicrobial activity of two Rutaceae species from the Brazilian Northeast. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360. 2010.
- SILVA, F. S.; RAMOS, M. A.; HANAZAKI, N.; ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of traditional knowledge of medicinal plants in a rural community in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 382-391. 2011.
- SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista de Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 32-40. 2004.
- SILVEIRA, L. M. S.; OLEA, R. S. G.; MESQUITA, J. S.; DA CRUZ, A. L. N.; MENDES, J. C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 2, p. 124-128. 2009.
- SIQUEIRA, C. F. Q.; CABRAL, D. L. V.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. D.; AMORIM, E. L. C.; MELO, J. G.; ARAUJO, T. A. D.; ALBUQUERQUE, U. P. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7. 2012.
- SOLON, S.; CAROLLO, C. A.; BRANDÃO, L. F. G.; MACEDO, C. S.; KLEIN, A.; DIAS-JUNIOR, C. A.; SIQUEIRA, J. M. Phenolic derivatives and other chemical compounds from *Cochlospermum regium*. *Quimica Nova*, v. 35, n. 6, p. 1169-1172. 2012.

SOUSA JUNIOR, F. C.; NUNES, É. W. F.; NASCIMENTO, E. D.; OLIVEIRA, S. M.; MELO, M. C. N.; FERNANDES, M. J. B. C. Prevalência de *Staphylococcus* spp resistentes à metilicina isolados em uma maternidade escola da Cidade de Natal, Estado do Rio Grande do Norte. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 179-182. 2009.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 308-312. 2004.

SPJUT, R. W. Relationships between plant folklore and antitumor activity: an historical review. **SIDA, Contributions to Botany**, v. 21, n. 4, p. 2205-2241. 2005.

STAMBOULIAN, D.; PAGANINI, H. **Estado Actual del uso de la Clindamicina**. Fundación Centros de Estudios Infectológicos (FUNCEI). French 3085-1425. Bs. As. Argentina, 2004.

SÜZGEÇ, S.; MERİÇLİ, A. H.; HOUGHTON, P. J.; ÇUBUKÇU, B. Flavonoids of *Helichrysum compactum* and their antioxidant and antibacterial activity. **Fitoterapia**, v. 76, p. 269. 2005.

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2226-2235. 2006.

TAMOKOU, J. D.; MPETGA, D. J. S.; LUNGA, P. K.; TENE, M.; TANE, P.; KUIATE, J. R. Antioxidant and antimicrobial activities of ethyl acetate extract, fractions and compounds from stem bark of *Albizia adianthifolia* (Mimosoideae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, p. 99. 2012.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, p. 834-837. 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301. 2000.

TELLAROLLI, D. N. FERREIRA, N. C.; RADDI, M. S. G.; SOARES, C. P. Avaliação citológica da mucosa nasal de portadores de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 3, p. 151-153. 2003.

TENOVER, F. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The **American Journal of Medicine**, v. 119 (6 Suppl 1), p. S3-10; discussion S62-70. 2006.

TONG, W.; WANG, R.; CHAI, D.; LI, Z.; PEI, F. In vitro activity of cefepime combined with sulbactam against clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, n. 5, p. 454-6. 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Artmed Editora, 10. ed., 2012. 938p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia Médica**. Atheneu, 4. ed., 2005a. 718p.

- TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia. *Staphylococcus aureus***. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005b.
- TRAMPER-STRANDERS, G. A.; VAN DER ENT, C. K.; GERRITSEN, S. A.; FLEER, A.; KIMPEN, J. L.; WOLFS, T. F. Macrolide-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in cystic fibrosis patients: Is there transmission to household contacts? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 665-668. 2007.
- TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; ZIMMER, K. R.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. D.; BAUMVOL, I. J. R.; MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 327-335. 2011.
- USAI, M.; PINTORE, G.; CHESSA, M.; TIRILLINI, B. Essential Oil Composition of Different Aerial Parts of *Pistacia terebinthus* L. Growing Wild in Sardinia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 4, p. 383-385. 2006.
- VANDENESCH, F. NAIMI, T.; ENRIGHT, M. C.; LINA, G.; NIMMO, G. R.; HEFFERNAN, H.; LIASSINE, N. BES, M.; GREENLAND, T. REVERDY, M. E.; ETIENNE, J. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carrying Panton-Valentine Leukocidin Genes: Worldwide Emergence. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 8, p. 978-984. 2003.
- VARELA, A. V.; HERNÁNDEZ, M. E.; ALARCÓN, R. C.; PINEDA, A. B. A. Evaluación de la resistencia a los antimicrobianos por el sistema DIRAMIC. **Revista Panamericana de Infectología**, v. 7, n. 4, p. 28-32. 2005.
- VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-387. 2005.
- VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238. 1998.
- VIAGGI, B.; SBRANA, F.; MALACARNE, P.; TASCINI, C. Ventilator-associated pneumonia caused by colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: A case report and literature review. **Respiratory Investigation**, v. 53, p. 124-128. 2015.
- VIEIRA, D. R. P.; AMARAL, F. M. M.; MACIEL, M. C. G.; NASCIMENTO, F. R. F.; LIBÉRIO, S. A.; RODRIGUES, V. P. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, p. 1441-1449. 2014.
- VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209-1214. 2011.
- VOSS, A.; MILATOVIC, D.; WALLRAUCH-SCHWARZ, C.; ROSDAHL, V. T.; BRAVENY, I. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 13, p. 50-55. 1994.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin Heidelberg: Springer Verlag p. 384, 1996.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110. 2009.

WALSH, C.T. Where will new antibiotics come from? **Natural Reviews Microbiology**, v. 1, p. 65-70. 2003.

WALTER, J. B.; HAMILTON, M. C.; ISRAEL, M. S. **Patologia em odontologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1981.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibioticos e Resistência microbiana: uma guerra perdida?. **Uso racional de Medicamento**. v. 1, n. 4, p. 1-6. 2004.

WEIDENBORNER, M.; HINDORF, H.; JHA, H. C.; TSOTSONOS, P. Antifungal Activity of Flavonoids Against Storage Fungi of the Genus *Aspergillus*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1103-1105. 1989.

WHITE, R. L.; BURGESS, D. S.; MANDURU, M.; BOSSO, J. A. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 8, p. 1914-8. 1996.

WHO. World Health Organization. **Infection control programmes to control antimicrobial resistance**. Printed in France. 53p. 2011.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Printed in France. 256p. 2014a.

WHO. World Health Organization. **World health statistics 2014**. Printed in France. 180p. 2014b.

YOSHINO, Y.; OKUGAWA, S.; KIMURA, S.; MAKITA, E.; SEO, K.; KOGA, I.; MATSUNAGA, N.; KITAZAWA, T.; OTA, Y. Infective endocarditis due to *Enterobacter cloacae* resistant to third- and fourth-generation cephalosporins. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, p. 226-228. 2015.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES, A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 828-833. 2009.

ZRIRA, S.; ELAMRANI, A.; BENJILALI, B. Chemical composition of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. from Morocco - a seasonal variation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 6, p. 475-480. 2003.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANM, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. e amp. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; cap. 23; p. 577-614. 2004.

APÊNDICE

ARE THERE LIMITATIONS REGARDING ETHNODIRECTED ANTIMICROBIAL PLANT SELECTION?

Allan Jonathan Chernichiarro Corrêa^{a*}; Bruno de Almeida Andrade^a; Patrícia Maria da Silva Neri^a; Valerium Thijan Nobre de Almeida e Castro^{a,b}; Rosilma Oliveira Araújo^c; Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena^c; Thiago Antônio de Sousa Araújo^{a,b}; Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho^d; Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim^a

^a*Department of Pharmaceutical Sciences - Federal University of Pernambuco - Av. Professor Artur de Sá, 50740-521, Recife - Brazil*

^b*Pharmacy Course - University Center Mauricio de Nassau – Rua Dr. Osvaldo Lima, 130, 52010-180, Recife – Brazil*

^c*Department of Antibiotics - Federal University of Pernambuco - Cidade Universitária, 52171-011, Recife – Brazil*

^d*Nursing Course - University Center Valley Ipojuca – Rua Adjar da Silva Casé, 800, 55024-740 Caruaru – Brazil*

*Corresponding author

Allan Jonathan C. Corrêa – Department of Pharmaceutical Sciences - Federal University of Pernambuco - Av. Professor Artur de Sá, 50740-521, Recife – Brazil
E-mail address: allan_jonathan2003@hotmail.com

Authors e-mail addresses

Bruno de Almeida Andrade: *brunoalmeida1986@hotmail.com*

Patrícia Maria da Silva Neri: *patricia_neri_13@hotmail.com*

Valerium Thijan Nobre de Almeida e Castro: *valeriumcastro@gmail.com*

Rosilma Oliveira Araújo: *rosilma23@hotmail.com*

Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena: *k.xisto@gmail.com*

Thiago Antônio de Sousa Araújo: *thiogocaruaru@hotmail.com*

Tadeu José da Silva Peixoto Sobrinho: *tadeu1903@yahoo.com.br*

Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim: *elba@ufpe.br*

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance

The inflammatory response is the organism's first defense against tissue damage. Ethnopharmacological reports of botanical species with possible anti-inflammatory and antimicrobial properties confuse the two, in so far as symptoms of infection are often associated with inflammatory disease.

Aim of the Study

The study aims to evaluate the antimicrobial properties of three groups of plants selected using the ethnopharmacological method, reported as having antimicrobial and/or anti-inflammatory properties by a rural community in the Brazilian State of Pernambuco.

Materials and Methods

The samples of the selected species were divided into groups of seven plants reported as having antimicrobial properties (GI), seven reported as having anti-inflammatory properties (GII) and another group of eight plants reported to have both (GIII). The antimicrobial properties of these groups were compared using the disc-diffusion method for nine micro-organisms: Gram-positive and Gram-negative bacteria, acid-alcohol resistant bacillus (BAAR) and yeast.

Results

Of the plants reported to have antimicrobial properties (GI), 28.6% demonstrated activity against the micro-organisms tested, compared with 57.1% of the plants and 100% of GIII.

Conclusions

The present study shows that greater care should be taken in selecting species recommended by ethnopharmacological reports for studies of antimicrobial properties, since plants reported to have anti-inflammatory properties may be more active than those reported as being antimicrobial. It is suggested that this occurs because of lack of sufficient knowledge on the part of the population to identify the true cause of the disease (infection or inflammation) and ethnobotany should also therefore pay attention to the interpretation of the results.

Key-words: Antiinflammatory x antimicrobial activity; ethnopharmacology; caatinga; medicinal plants; phenolic compounds

1. Introduction

In Brazil, there are around 46,000 of plant species distributed across various biogeographical zones, including the Amazon Rainforest, the Pantanal, the Cerrado, the Caatinga and the Atlantic Forest (FLORA DO BRASIL, 2018). In view of this diversity, one of the current difficulties for development of new drugs is adequate

selection of medicinal species that have a greater chance of success in production of medicine or the discovery of novel drugs, especially in the case of plants endemic to Brazil (PINTO et al., 2002). Researchers are equipped with a number of selection methods based on well-established criteria, such as ethology, chemosystematics and an ethnodirected approach (CRAWFORD; GIANNASI, 1982; ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; COSTA, 2017).

The ethnobotanical approach has pointed to the importance of cultural criteria in selecting species and, in some cases, these classification take into consideration their efficacy in treating disease and the value accorded to the species in the local community under study (NASCIMENTO et al., 2000; PEDROLLO et al., 2016). This is an increasingly common method for studying species, particularly because it involves selection tools that take into consideration traditional knowledge as a predictor of more promising species from a pharmacological point of view (ARAÚJO et al., 2008; SILVA et al., 2013). It is also important not to overlook the wealth of experimental data gathered in these communities, since these can provide evidence-based treatment discoveries (CHOUDHARI et al., 2013).

However, the ethnodirected approach is prone to a number of shortcomings: superficial or flawed data collection and misguided interpretations, such as erroneous association of local diseases with those recognized by the traditional medical establishment. Another difficulty may be presented by small sample sizes that make it impossible to make inferences regarding the general population (BEIERSMANN et al., 2007; FERREIRA JÚNIOR et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2014). It is therefore important to consider the difficulty of interpreting responses in ethnobotany interviews and establishing the species to be studied from a biological point of view (FERREIRA JUNIOR et al., 2016).

As the inflammatory response is the organism's first response to tissue damage caused by a physical or microbial injury, there will be an improvement in the inflammation cause by an infection when the pathogen has been eliminated (COELHO-CASTELO et al., 2009; CABRAL, 2014). This may be a confounding factor in the selection of species, since a plant reported to have anti-inflammatory properties may, in fact, be an antimicrobial.

The present study thus aims to evaluate the antimicrobial properties of three groups of plants selected using the ethnodirected method: GI - plants reported as having antimicrobial properties; GII – plants reported as having anti-inflammatory

properties and GIII – plants reported as having both antimicrobial and anti-inflammatory properties, according to one rural community.

2. Materials and Methods

2.1. Species Selection

The species were selected from a database formed by the survey of traditional knowledge, carried out by the application of the main techniques of ethnopharmacological data collection, such as free-list and semi-structured interviews, described in Araujo et al. (2008). This database, previously developed by the Laboratory of Ecology and Evolution of Socio-Ecological Systems (LEA-UFPE), has already been used in several studies, among other indications, for anti-inflammatory and antimicrobial purposes (ALENCAR et al. 2009; SILVA et al. 2011; FERREIRA JUNIOR et al. 2011; ALBUQUERQUE et al., 2012; SIQUEIRA et al. 2012; MELO et al. 2017).

Considering the database mentioned above, the plants were grouped as follows. First, GI group – plants reported as having only antimicrobial properties, indicated, for example, for treatment of tuberculosis, bronchitis, boils, cold sores, pneumonia and general infections. Second, GII group – plants reported as having only anti-inflammatory properties. Finally, the GIII group – plants reported as having both antimicrobial and anti-inflammatory properties, covering both of the above sets of descriptors. Species were excluded if there were less than three reports per person, to ensure minimal consensus among informants (ARAÚJO et al., 2008). These criteria produced a total of 22 species, which are listed in Table 1. The part selected was the one with most reports for the species.

Collection of species was carried out in spiny deciduous vegetation (Caatinga), in the Carão community, in the municipality of Altinho/PE (08°35'13.5"S x 36°05'34.6"W) in January 2014. A minimum of three samples of each were collected and these mixed together in order to minimize idiosyncratic effects (ARAÚJO et al., 2008).

Table 1 - Selection of plants by the ethnodirected method in the Carão community, Altinho-PE reported as antimicrobials and/or anti-inflammatories

	Used plants	Family	Popular name	Used part	Voucher
GI	<i>Dysphania ambrosioides</i> (L.) Mosyakin & Clemants	Amaranthaceae	mastruz	leaf	IPA 81001
	<i>Chloroleucon extortum</i> Barneby & J.W. Grimes	Fabaceae	jurema branca	bark	UFP 53492
	<i>Citrus x aurantium</i> L.	Rutaceae	laranjeira	leaf	IPA 89972
	<i>Cleome spinosa</i> Jacq.	Cleomaceae	mussambê	flower	UFP 46366
	<i>Lippia origanoides</i> Kunth	Verbenaceae	alecrim de caboclo	leaf	IPA 91588
	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Lamiaceae	hortelã folha grande	leaf	IPA 91000
	<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart.	Rhamnaceae	juazeiro	bark	UFP 46186
GII	<i>Boerhavia diffusa</i> L.	Nyctaginaceae	pega pinto	root	IPA 91066
	<i>Libidibia ferrea</i> (Mart.) L.P. Queiroz	Caesalpinaceae	jucá	bark	UFP 46664
	<i>Cedrela odorata</i> L.	Meliaceae	cedro	bark	UFP 54186
	<i>Cereus jamacaru</i> DC.	Cactaceae	mandacaru	root	UFP 58750
	<i>Crateva tapia</i> L.	Capparaceae	trapiá	bark	UFP 46188
	<i>Schinopsis brasiliensis</i> Engl.	Anacardiaceae	baraúna	bark	IPA 91044
	<i>Spondias tuberosa</i> Arruda	Anacardiaceae	umbu	bark	UFP 54171
GIII	<i>Amburana cearensis</i> (Allemão) A.C. Sm.	Fabaceae	imburana açu	bark	PEUFR 50486
	<i>Anacardium occidentale</i> L.	Anacardiaceae	caju roxo	bark	HST 20410
	<i>Anadenanthera colubrina</i> (Vell.) Brenan	Fabaceae	angico	bark	UFP 46181
	<i>Erythrina velutina</i> Willd.	Fabaceae	mulungu	bark	UFP 46180
	<i>Maytenus rigida</i> Mart.	Celastraceae	bom nome	bark	UFP 46182
	<i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.	Fabaceae	jurema preta	bark	IPA 91039
	<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão	Anacardiaceae	aroeira	bark	IPA 91068
	<i>Handroanthus impetiginosus</i> (Mart. Ex DC.) Mattos	Bignoniaceae	pau d'arco roxo	bark	UFP 17536

GI- Plants reported as antimicrobials, **GII-** Plants reported as anti-inflammatories, **GIII-** Plants reported as antimicrobials and anti-inflammatories

2.2. Preparation and Chemical Characterization of Extracts

The samples were dried, ground in a vertical Wiley-type knife mill and cut into standard 20 mesh granules. The samples then underwent extraction by maceration for 48 hours at a proportion of 1:10 (m/v) in 80% ethanol. The extraction liquid was renewed twice, giving a total of three macerations. The extracts were then put together, filtered and evaporated under reduced pressure at a temperature of 40 ± 2 °C until fully desiccated.

Qualitative analysis of extracts (10 mg/mL) was carried out using thin-layer chromatography with eluent systems and specific revealers (WAGNER; BLADT, 1996), with a view to identifying the principal secondary metabolism groups.

2.3. Determination of the total phenolic content (TPC) and total tannin content (TTC)

The TPC of the extracts was determined by the Folin-Ciocalteu method and the residual phenolic content was determined by the method of precipitation of casein followed by Folin-Ciocalteu, where the TTC is the difference between the levels of total and residual phenols (AMORIM et al., 2008).

The TPC was calculated from 0.2 mL of diluted extract (1 mg/mL, w/v), 0.5 mL of aqueous solution of Folin-Ciocalteu (10%, v/v), 1 mL of aqueous solution of sodium carbonate (7.5%, w/v) and 8.3 mL of distilled water. The solution was allowed to stand in the dark for 30 minutes and the absorbance was measured at 760 nm. To calculate the residual phenolic content, 6 mL of diluted extract (1 mg/mL, w/v) and 12 mL of distilled water was agitated for 3 hours with 1 g of casein, filtered and adjusted to a final volume of 25 mL with distilled water. The residual phenolic content was determined with 1 mL of the filtrate by the Folin-Ciocalteu method. The TTC was calculated as the difference between the content of total phenols and residual phenols. TPC and TTC were expressed as one milligram of tannic acid per each gram of sample (mg TAE/g). The samples were evaluated with three replicates.

2.4. Determination of total flavonoid content (TFC)

The TFC of the extracts was estimated by a colorimetric method based on the formation of a flavonoid-aluminum complex (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008). The TFC was calculated using 0.2 mL of diluted extract (1 mg/mL, w/v), 0.12 mL of glacial acetic acid, 2 mL of pyridine in methanol (20%, v/v), 0.5 mL of aluminum chloride in methanol (5%, w/v) and 7.18 mL of distilled water. The solution was allowed to stand in the dark for 30 minutes and the absorbance was measured at 420 nm. The results

were expressed as one milligram of rutin per each gram of sample (mg RE/g). Three replicated samples were evaluated.

2.5. Antimicrobial Properties

2.5.1. Test Micro-organisms

Antimicrobial assays were carried out for nine micro-organisms from the Federal University of Pernambuco's Antibiotics Department Micro-Organism Collection. The organisms were the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138), and *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06); the Gram-negative bacteria *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39) and *Serratia marcescens* (UFPEDA 398); the acid-alcohol resistant bacillus *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71); and the yeast *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

2.5.2. Disc Diffusion Test

Antimicrobial activity was confirmed in vitro using the disc diffusion method (BAUER et al., modified 1966). The concentration of extract was 200.000 µg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the 6 mm diameter paper discs were soaked in 10 µL of solution corresponding to 2.000 µg of raw extract per disc. The suspensions were standardized at 0.5 on the McFarland scale (BARRY, 1986; KONEMAN et al., 1997), corresponding to a concentration of approximately 10⁸ UFC/mL.

Results with haloes of less than 9 mm indicated inactivity, 9-12 mm partial activity, 13-18 mm activity and greater than 18 high activity (ALVES et al. 2000).

The antibiotic gentamycin and the antifungal cetoconazol were used in the tests as standard drugs, at concentrations of 10 µg/disc and 30 µg/disc, respectively.

2.5.3. Minimum inhibitory concentration - MIC

The MIC was calculated using extracts presented disc test haloes ≥ 15 mm, using 96-well plates evaluated according to the criteria adopted by the Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2015). A suspension of 0.5 on the MacFarland scale was used for *S. aureus*, *B. subtilis* and *M. luteus* in the tests. Each well received 180 µL of the Müller Hinton agar medium, 10 µL of inoculum and 20 µL of extract, to obtain final concentrations of 3,9-2.000 µg/well. The controls used were 100 µL of Müller Hinton agar (sterility control) and 100 µL of Müller Hinton agar added to 10 µL of standardized microbial suspension (positive control). The plate was incubated

for 24 hours and a revealing coloring (resazurin) was then added to more precisely show whether or not there was turbidity in the well.

Plant extracts were considered to show good antimicrobial activity with MIC < 100 µg/mL, moderate activity with MIC from 100 to 500 µg/mL, low activity with MIC from 500 to 1.000 µg/mL and to be inactive with MIC > 1.000 µg/mL (TANAKA et al., 2005).

2.6. Statistical Analysis

The degree of similarity of the phytochemical profile of the 22 plants studied was investigated. In a paired combinatorial analysis, the extracts were considered similar when one same compound was present (+) or absent (-) in both species. The similarity was expressed as a percentage, relating the number of common metabolites to the total (13 groups of secondary metabolites) and was tested qualitatively (ARAUJO et al., 2015). The species were only considered similar when the similarity percentage similarity was equal to or greater than 75%.

The Shapiro-Wilk test confirmed the normality of the data obtained by quantification of content. The data were expressed as mean ± standard deviation and analyzed using ANOVA followed by the Tukey test. Pearson's test of correlation could only be used to compare the total phenol compound content and tannins of GIII with the respective means for the haloes obtained in the disc tests for Gram-positive micro-organisms. The BioEstat 5.3 software package was used for statistical analysis.

3. Results

3.1. Chemical Characterization of Extracts

The thin-layer chromatography (TLC) tests revealed the presence of alkaloids, anthrone and anthranol, anthraquinones, anthracene derivatives, naphthoquinones, phenol compounds (simple phenols, flavonoids, tannins and coumarins), saponins, terpenoids, steroids and xanthines. All metabolite groups were present in at least one of the species evaluated and phenol compounds, anthracene derivatives and saponins were present in the largest number of samples: all except *B. diffusa* and *C. tapia*. The species which contained the greatest diversity of compounds were *A. cearensis* and *E. velutina*, which lacked only anthracene derivatives and xanthines (Table 2).

D. ambrosioides was phytochemically 100% similar to *C. aurantium*, as were *S. brasiliensis* x *A. colubrina*, *A. cearensis* x *E. velutina* and *A. occidentale* x *E. velutina*.

C. jamacaru was the species that was most similar to other plants (5 species). The similarity percentages of the groups studied show that the GIII plants had 7 similar combinations of 28 possible combinations for the group as a whole, while GI and GII had 4 and 1 similar combinations out of 21 possible combinations, respectively.

3.2. Determination of Phenol Content

The total phenol, tannin and flavonoid content of species of plant reported as active against infections caused by fungi and bacteria and inflammation are presented in Table 3.

Overall, a wide variation was found between levels of phenol compounds in the extracts analyzed. For total phenols, the results varied from $27,6 \pm 2,6$ to $497,1 \pm 12,1$ mg/g EAT, with the highest level found in the extract of bark of *Myracrodruon urundeuva*, although no statistically significant difference was found for another five species (*A. occidentale*, *A. colubrina*, *M. tenuiflora*, *C. odorata* and *S. brasiliensis*) and no total phenols were identified in extracts of *D. ambrosioides*, *Z. joazeiro*, *B. diffusa*, *C. jamacaru* and *C. tapia*.

The extract of bark of *A. occidentale* had the highest mean tannin content ($460,8 \pm 15,9$ mg/g EAT), but the results for another three species provided no statistically significant results (*M. urundeuva*, *C. odorata* and *S. tuberosa*). The extracts of *D. ambrosioides*, *C. extortum*, *C. aurantium*, *P. amboinicus*, *Z. joazeiro*, *B. diffusa*, *C. jamacaru* and *C. tapia* contained no tannins.

The extracts of *C. extortum*, *P. amboinicus*, *A. occidentale*, *A. colubrina*, *M. tenuiflora*, *H. impetiginosus*, *B. diffusa*, *C. tapia*, *S. brasiliensis* and *S. tuberosa* contained no flavonoids, while the extract of bark of *E. velutina* presented the highest levels of this metabolite ($257,4 \pm 11,9$ mg/g ER). This variation between samples was expected as the extracts came from different plant species/organs and different phenol compounds were present.

The group of plants that were reported as having both antimicrobial and anti-inflammatory properties had higher levels of phenol compounds and tannins, with 376,0 and 305,3 mg/g EAT, respectively, as the mean for the species in this group. In the case of flavonoids, GI had higher mean levels (74,41 mg/g ER), principally because it contained more herbaceous species and leaf extracts, although *E. velutina*, from GIII, had the highest levels of this class of metabolite.

Table 2. Phytochemical characterization of extracts of plants selected by the ethnodirected method in the Carão community, Altinho-PE reported as antimicrobials and anti-inflammatories

Species/Metabolic Group		Alkaloids	Antrona and Anthranol	Anthraquinone	Phenolic compounds	Coumarins	Anthracene derivatives	Flavonoids	Tannins	Mono, sesqui and diterpenes	Naphthoquinones	Saponins	Triterpenes and steroids	Xanthines
GI	<i>Dysphania ambrosioides</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
	<i>Chloroleucon extortum</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
	<i>Citrus x aurantium</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
	<i>Cleome spinosa</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-
	<i>Lippia origanoides</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Plectranthus amboinicus</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-
	<i>Ziziphus joazeiro</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
GII	<i>Boerhavia diffusa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cedrela odorata</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	<i>Cereus jamacaru</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	<i>Crateva tapia</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
	<i>Libidibia ferrea</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
	<i>Spondias tuberosa</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
GIII	<i>Amburana cearensis</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Anacardium occidentale</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
	<i>Erythrina velutina</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Maytenus rigida</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+

GI- Plants reported as antimicrobials, **GII-** Plants reported as anti-inflammatories, **GIII-** Plants reported as antimicrobials and anti-inflammatories; (-) = absence; (+) = presence

Table 3. Concentration of total phenols, tannins and flavonoids obtained from hydro-alcoholic extracts of plants selected using the ethnodirected method in the Carão community, Altinho-PE, reported as antimicrobials and/or anti-inflammatories.

Species/Phenolic Compounds		Total Phenolic Content $\pm$ SD	Total Tannins Content $\pm$ SD	Total Flavonoids Content $\pm$ SD
GI	<i>Dysphania ambrosioides</i>	N/D	N/D	46,15 $\pm$ 2,75 i
	<i>Chloroleucon extortum</i>	67,87 $\pm$ 6,03 j	N/D	N/D
	<i>Citrus x aurantium</i>	115,89 $\pm$ 5,75 h	N/D	101,20 $\pm$ 4,04 h
	<i>Cleome spinosa</i>	81,84 $\pm$ 1,81dj	14,80 $\pm$ 1,22 h	122,84 $\pm$ 3,88 g
	<i>Lippia origanoides</i>	326,17 $\pm$ 4,99 g	204,33 $\pm$ 6,89 g	196,37 $\pm$ 18,20 f
	<i>Plectranthus amboinicus</i>	27,64 $\pm$ 2,64 i	N/D	N/D
	<i>Ziziphus joazeiro</i>	N/D	N/D	54,33 $\pm$ 4,66 i
	Mean GI	88,49	31,30	74,41
GII	<i>Boerhavia diffusa</i>	N/D	N/D	N/D
	<i>Cedrela odorata</i>	477,78 $\pm$ 28,24 be	447,53 $\pm$ 28,69 c	31,80 $\pm$ 2,37 c
	<i>Cereus jamacaru</i>	N/D	N/D	69,11 $\pm$ 6,05 e
	<i>Crateva tapia</i>	N/D	N/D	N/D
	<i>Libidibia ferrea</i>	370,33 $\pm$ 35,28 c	370,33 $\pm$ 35,28 b	13,41 $\pm$ 1,30
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	493,88 $\pm$ 13,23 b	367,12 $\pm$ 21,35 b	N/D
	<i>Spondias tuberosa</i>	452,56 $\pm$ 29,33 e	452,10 $\pm$ 7,23 c	N/D
	Mean GII	256,36	233,87	16,33
GIII	<i>Amburana cearensis</i>	216,63 $\pm$ 17,92 f	186,31 $\pm$ 17,79 g	150,77 $\pm$ 11,10 d
	<i>Anacardium occidentale</i>	488,43 $\pm$ 6,58 b	460,85 $\pm$ 15,90 c	N/D
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	492,09 $\pm$ 3,57 b	331,24 $\pm$ 3,52 d	N/D
	<i>Erythrina velutina</i>	186,28 $\pm$ 12,51 a	147,88 $\pm$ 13,83 a	257,14 $\pm$ 11,95 a
	<i>Maytenus rigida</i>	382,43 $\pm$ 8,33 c	296,20 $\pm$ 9,37 e	42,20 $\pm$ 1,87 ci
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	478,46 $\pm$ 11,62 be	379,50 $\pm$ 17,28 b	N/D
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	497,07 $\pm$ 12,13 b	441,66 $\pm$ 30,52 c	13,33 $\pm$ 1,26 b
	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	107,22 $\pm$ 10,46 dh	79,78 $\pm$ 6,28 f	N/D
	Mean GIII	376,00	305,30	44,67

GI- Plants reported as antimicrobials, **GII-** Plants reported as anti-inflammatories, **GIII-** Plants reported as antimicrobials and anti-inflammatories; Means followed by the same letter in the column do not differ significantly from one another ($p < 0.05$); **Content** = mg/g tannic acid or rutin per extract; **DP** = Standard Deviation; **N/D** = not detected.

3.3. Antimicrobial Activity

3.3.1. Disc Diffusion Test

The hydroalcoholic extracts of *Lippia origanoides*, *A. colubrina*, *M. urundeuva*, *M. rigida*, *A. occidentale*, *M. tenuiflora* were most active against the strains tested and Gram-positive bacteria were most sensitive to these extracts, while Gram-negative bacteria and the yeast were resistant to the phytocomplexes (Table 4).

Analysis of the parameters suggested by Alves et al. (2000), showed the extracts of *D. ambrosioides*, *C. extortum*, *C. aurantium*, *C. spinosa*, *P. amboinicus*, *B. difusa*, *C. jamae* and *C. tapia* not to be active against any of the strains under study. Gram-negative bacteria and *C. albicans* were resistant to all the extracts tested.

Extracts shown to be partially active were: *A. cearenses*, *A. occidentale*, *M. rigida* and *M. tenuiflora* against *B. subtilis*, with haloes of $11,3 \pm 0,6$ mm, $12,3 \pm 0,6$ mm, $10,7 \pm 0,6$ mm and $12,3 \pm 0,6$ mm, respectively. The extracts of *A. cearenses* ($12,3 \pm 0,6$ mm) and *E. velutina* ($12,3 \pm 0,6$ mm) were also partially active against *M. luteus*.

Extracts of *L. origanoides* were found to have haloes of $25,7 \pm 0,6$ mm (*M. luteus*), $23,0 \pm 2,0$ mm (*B. subtilis*) and $21,0 \pm 1,7$ mm (*S. aureus*); *A. colubrina* haloes of $23,3 \pm 0,6$ mm (*M. luteus*), $23,3 \pm 0,6$ mm (*M. smegmatis*) and $18,0 \pm 1,0$ mm (*S. aureus*); *M. rigida* a halo of $18,0 \pm 1,0$ mm (*M. smegmatis*); *M. tenuiflora* a halo of $19,3 \pm 1,2$ mm (*S. aureus*), *M. urundeuva* a halo of $19,3 \pm 1,2$ mm (*S. aureus*); *L. ferrea* haloes of $19,3 \pm 0,6$ mm (*S. aureus*) and $20,3 \pm 0,6$ mm (*M. smegmatis*) and *S. brasiliensis* a halo of $18,0 \pm 1,7$ mm for *S. aureus*. All were classified as highly active for the parameters described by Alves et al. (2000).

Analysis of the correlation between the phenol compounds in plants in GIII and antimicrobial activity found a positive correlation between phenol content and strains of *S. aureus* ($r=0.8866$; $p=0.0033$), *E. faecalis* ($r=0.8176$; $p=0.0131$) and *M. luteus* ($r=0.8176$; $p=0.0131$) in the disc test. Likewise, a correlation was found between tannins and antimicrobial activity, as the plant extracts from GIII had a positive correlation for *S. aureus* ($r=0.8565$; $p=0.0066$) and *M. luteus* ($r=0.7227$; $p=0.428$) in the disc tests.

Table 4. Mean antimicrobial inhibition haloes (in mm) for hydro-alcoholic extracts of plants selected by the ethnodirected method in the Carão community, Altinho-PE, reported as antimicrobials and anti-inflammatories.

Species/Micro-organisms		Hydroalcoholic Extracts (2.000 µg/disc) (mean of haloes in mm)								
		Gram-positives bacteria				Gram-negatives bacteria			BAAR	Y
		Sa	Bs	Ef	MI	Ec	Pa	Sm	Ms	Ca
GI	<i>Dysphania ambrosioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Chloroleucon extortum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Citrus x aurantium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cleome spinosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Lippia organoides</i>	21,0	23,0	-	25,7	-	-	-	17,0	-
	<i>Plectranthus amboinicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Ziziphus joazeiro</i>	-	-	-	13,3	-	-	-	14,7	-
GII	<i>Boerhavia diffusa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Cedrela odorata</i>	15,7	-	-	16,7	-	-	-	-	-
	<i>Cereus jamacaru</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Crateva tapia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Libidibia ferrea</i>	19,3	14,7	14,7	16,3	-	-	-	20,3	-
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	18,0	16,7	16,7	15,0	-	-	-	16,7	-
	<i>Spondias tuberosa</i>	13,3	13,0	13,0	14,0	-	-	-	12,0	-
GIII	<i>Amburana cearensis</i>	14,3	11,3	14,7	12,3	-	-	-	12,0	-
	<i>Anacardium occidentale</i>	17,7	12,3	16,0	17,0	-	-	-	16,0	-
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	18,0	16,7	15,0	23,3	-	-	-	23,3	-
	<i>Erythrina velutina</i>	-	-	-	12,3	-	-	-	-	-
	<i>Maytenus rigida</i>	17,7	10,7	13,7	17,3	-	-	-	18,0	-
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	19,3	12,3	17,7	14,0	-	-	-	15,0	-
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	19,3	13,7	17,3	17,3	-	-	-	17,0	-
Padrão	<i>Handroanthus impetiginosus</i>	-	14,7	14,7	-	-	-	-	17,0	-
	Gentamicin (10 µg/disc)	22,7	27,7	14,7	30,7	22,7	21,3	15,0	33,3	-
	Ketoconazole (30 µg/disc)	-	-	-	-	-	-	-	-	39,7

GI- Plants reported as antimicrobials, **GII-** Plants reported as anti-inflammatories, **GIII-** Plants reported as antimicrobials and anti-inflammatories; **BAAR** – Acid-Alcohol Resistant Bacillus, **Y** - Yeast; **Sa** - *Staphylococcus aureus*, **Bs** – *Bacillus subtilis*, **Ef** - *Enterococcus faecalis*, **MI** - *Micrococcus luteus*, **Ec** - *Escherichia coli*, **Pa** - *Pseudomonas aeruginosa*, **Sm** - *Serratia marcescens*, **Ms** - *Mycobacterium smegmatis*, **Ca** - *Candida albicans*; (-) – No activity

3.3.2. Minimum Inhibitory Concentration - MIC

According to the parameters developed by Tanaka et al. (2005), all the extracts selected, except *L. origanoides* (250 µg/mL), were inactive in relation to *B. subtilis*. The results for *S. aureus* showed moderate activity with the following MICs: *L. origanoides* (500 µg/mL), *C. odorata* (500 µg/mL), *L. ferrea* (250 µg/mL), *S. brasiliensis* (500 µg/mL), *A. occidentale* (250 µg/mL), *A. colubrina* (500 µg/mL), *M. rigida* (500 µg/mL), *M. tenuiflora* (500 µg/mL) and *M. urundeuva* (250 µg/mL).

Within the stipulated parameters, the *M. luteus* micro-organism was found to be most sensitive to the extracts tested, with moderate activity for extracts of *L. origanoides* (125 µg/mL), *A. colubrina* (250 µg/mL) and *M. rigida* (250 µg/mL) and good activity for extracts of *M. urundeuva*, *M. tenuiflora*, *C. odorata* and *S. brasiliensis* (MIC 62,5 µg/mL) and extracts of *L. ferrea* and *S. tuberosa* (MIC 31,25 µg/mL) (Table 5).

4. Discussion

It can be seen that there is a need for greater care to be taken when interpreting ethnobotanical results in relation to the selection of plants with antimicrobial activity, since the group of plants reported as possessing antimicrobial properties obtained less promising results for antimicrobial activity than the plants reported as having anti-inflammatory properties or those reported as possessing both properties.

Phenol compounds in general, tannins, flavonoids, coumarins and terpenoids are responsible for antibacterial action in most studies cited in the literature. Phenols are the most abundant secondary metabolites in plants and have been described by various authors as the components responsible for the antimicrobial activity of some species (DAGLIA, 2012; SILVA et al, 2010). The present study also found a positive correlation between the phenol content of plants in GIII and antimicrobial activity against some strains investigated using the disc test.

Table 5. Minimum inhibitory and bactericidal concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of hydro-alcoholic extracts of plants used to cure infections caused by fungi and bacteria showing haloes $>15\text{mm}$ on the disc test.

Species/Micro-organisms	Gram-Positives Bacteria (mean of concentrations in $\mu\text{g/mL}$)		
	Sa	Bs	MI
GI	<i>Lippia origanoides</i>	500 $\pm$ 0,0	250 $\pm$ 0,0
	<i>Cedrela odorata</i>	500 $\pm$ 0,0	>2000
GII	<i>Libidibia ferrea</i>	250 $\pm$ 0,0	2000
	<i>Schinopsis brasiliensis</i>	500 $\pm$ 0,0	>2000
GIII	<i>Anacardium occidentale</i>	250 $\pm$ 0,0	>2000
	<i>Anadenanthera colubrina</i>	500 $\pm$ 0,0	1000 $\pm$ 0,0
	<i>Maytenus rigida</i>	500 $\pm$ 0,0	>2000
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	500 $\pm$ 0,0	>2000
	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	250 $\pm$ 0,0	>2000

GI- Plants reported as antimicrobials, **GII-** Plants reported as anti-inflammatories, **GIII-** Plants reported as antimicrobials and anti-inflammatories; **Sa-** *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), **Bs** – *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16), **MI** - *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06) (-) – No activity

In so far as they are able to precipitate proteins, tannins enhance antimicrobial and antifungal activity in in extracts in which this is the most abundant metabolite (SANTOS; MELLO, 2004; MONTEIRO et al., 2005). *L. origanoides*, *A. colubrina*, *M. urundeuva*, *M. rigida*, *A. occidentale* and *M. tenuiflora* were thus selected to determine the MIC, as these six species were those that were found to have the highest levels of tannins. A positive correlation between tannin content and antimicrobial activity against strains investigated using the disc test was also found for plants in GIII. This result is corroborated by data in the literature that indicate that such activity is characteristic of this group of secondary metabolites (SCALBERT, 1991; SANTOS; MELLO, 2002; ALMEIDA et al., 2005; OBIANG-OBOUNOU; RYU, 2013).

Using the calculation developed by Araújo et al. (2015) to determine the percentage of chemical similarity between bark and leaves of *Anacardium humile*, *Brosimum gaudichaudii* and *Tabebuia avellanedae*, the present study found a larger number of phytochemically similar species in GIII. This was also the group with the broadest spectrum of activity, with all species showing antimicrobial activity against at least one of the Gram-positive bacteria tested.

Bennett and Prance (2000) introduced evaluation of the versatility of species in communities using the relative importance (RI) index, according to which a plant is more important the larger number of indications it receives for different body systems. Three plants in the present study's GIII (*M. urundeuva*, *A. occidentale* and *A. colubrina*) have been shown in the literature to have high RI values (SILVA; ALBUQUERQUE, 2005; MONTEIRO et al., 2011 e SOUZA; SOUZA; LUCENA, 2016), thereby corroborating their inclusion in the group of plants cited as useful for treating both inflammations and diseases caused by fungi or bacteria.

Of the Gram-positive micro-organisms used, *Staphylococcus aureus* was the main cause of various diseases cited in the ethnopharmacological research that preceded the present study, including boils (RAZERA et al., 2009; ARNAIZ-GARCIA; ARNAIZ-GARCIA; ARNAIZ, 2015), cold sores (PARK; BRODELL; HELMS, 2011; ROCHA, MELO-FILHO, SIMOES, 2015) and bronchitis (SANTOS et al., 2017). The results presented in the present study provide further evidence of the antimicrobial properties of the plants analyzed against Gram-positive micro-organisms, including *S. aureus*, according to the disc diffusion test.

The MIC is used in the literature as a standard method for quantifying the susceptibility of organisms to possible antimicrobials and also helps to refine the results of other susceptibility tests, such as the disc diffusion test (ANDREWS, 2002). The MICs of the present study thus corroborate the results of the disc diffusion test, with the best results obtained for plants in GIII and GII but those in GI, which were indicated by the local population for treatment only of diseases caused by fungi and bacteria.

Although some studies in the literature have compared existing methods of plant selection and found ethnodirected approaches to be more effective (SILVA et al., 2013), others have sought to evaluate the antimicrobial activity of plants reported as treatments for infections (VIEIRA et al., 2014; CHANDER et al., 2016) that have not been found to be fully effective. Not all plants, therefore, are in fact active and this

suggests some placebo effect or some combination of species that the informant failed to mention during data collection or misinterpretation on the part of the researcher regarding the indication for treatment.

Our results may point to a misinterpretation of the data, showing that plants commonly indicated as anti-inflammatories may, in fact, serve an antimicrobial function rather than acting on the cascade of inflammatory mediators (CABRAL, 2014).

It is known that inflammation plays an important role in defending the body from harmful agents by diluting, destroying or neutralizing them. Various kinds of molecules and cells are essential for inflammatory processes, including plasma proteins, macrophages, monocytes and polymorphonuclear leukocytes. In the case of infection-related inflammatory processes, these molecules circulate in the blood stream and are brought by inflammatory reactions to the site of the infection to eliminate the micro-organisms present (KUMAR et al., 2008). When the pathogen has been eliminated, either by the action of the immune system itself or by the administration of antibiotics, the inflammation subsides. Characteristic symptoms of inflammation, such as edema, heat, flushing and pain, are then relieved and it is possible that, after the use of an antimicrobial plant, local people believe that the effect has been anti-inflammatory.

Difficulties regarding interpretation of the data collected from local populations are thus beginning to be seen to be important, since the perception of diseases may affect evaluation of the responses obtained and consequently also affect selection of medicinal plants (HERNDON et al., 2009; REYS-GARCIA, 2010). Starting out from the assumption that interpretation of ethnopharmacological studies is complex, Ferreira-Junior et al. (2011) agree that inflammation may be confused with other medical processes, since they found a variation in plants used to treat inflammation according to the type of inflammation perceived by the informant.

5. Conclusions

The present article thus suggests that there are in fact limitations regarding the ethnodirected approach to the selection of antimicrobial plants. Plants that are “genuinely” anti-inflammatory were found to be more effective as antimicrobials than “genuine” antimicrobials. This may suggest three mutually compatible scenarios: (i) people cannot easily distinguish different kinds of inflammation; (ii) researchers do not do enough to collect information on the local medical system; and (iii) plants may go

through a process of evolution in popular knowledge and be used initially as anti-inflammatories, since inflammation has more visible symptoms, and only later perceived to be antimicrobials.

It is suggested that researchers bioprospecting antimicrobial plants using an ethnodirected approach also include in their list of possible study candidates those plants reported by the population to be anti-inflammatories, so as not to overlook a potential antimicrobial species. However, studies using the same model need to be carried out to evaluation whether those species reported as being anti-inflammatories which in fact act as antibiotics do also have anti-inflammatory properties demonstrated by the models existing in the literature, as suggested by the hypotheses raised in the present paper.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) (IBPG-1228-4.03/12) and Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil.

Authors` Contributions

ELCAmorim, TASAraujo and AJCCorrêa designed the research and managed the project; AJCCorrêa, BAAndrade and PMSNeri wrote the manuscript and performed the phytochemical tests; AJCCorrêa, ROAraujo and KXFRSena conducted the antimicrobial activity tests; TASAraujo, VTNACastro and TJSPeixoto-Sobrinho provided useful comments for the discussion, performed statistical analysis and reviewed this manuscript; ELCAmorim had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Albuquerque, U.P., Hanazaki, N., 2006. Ethnodirected research in the discovery of new drugs of medical and pharmaceutical interest: flaws and perspectives. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16 (Supl), 678-689.
- Albuquerque, U.P., Medeiros, P.M., Ramos, M.A., Ferreira, W.S., Nascimento, A.L.B., Avilez, W.M.T., Melo, J.G., 2014. Are ethnopharmacological surveys useful for the

discovery and development of drugs from medicinal plants?. **Rev. Bras. Farmacogn.** 24 (2), 110-115.

Albuquerque, U.P., Nascimento, L.G.S., Vieira, F.J., Almeida, C.M.A.D., Ramos, M.A., Silva, A.C.O., 2012. "Return" and Extension Actions After Ethnobotanical Research: The Perceptions and Expectations of a Rural Community in Semi-arid Northeastern Brazil. **J. Agric. Environ. Ethics.** 25, 19–32.

Alencar, N.L., Araujo, T.A.S., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2009. Can the Apparency Hypothesis explain the selection of medicinal plants in an area of caatinga vegetation? A chemical perspective. **Acta Bot. Bras.** 23 (3), 908-909.

Almeida, C.F.C.B.R., Silva, T.C.D.E., Amorim, E.L.C., Maia, M.B.D., Albuquerque, U.P., 2005. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the Caatinga (Northeast Brazil). **J. Arid Environ.** 62, 127-142.

Alves, T.M.D., Silva, A.F., Brandao, M., Grandi, T.S.M., Smania, E.D.A., Junior, A.S., Zani, C.L., 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 95 (3), 367-373.

Amorim, E.L.C., Nascimento, J.E., Monteiro, J.M., Peixoto-Sobrinho, T.J.S., Araújo, T.A.S., Albuquerque, U.P., 2008. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Funct. Ecosyst. Commun.** 2 (1), 88-94.

Andrews, J.M., 2002. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antimicrob. Chemother.** 49 (6), 1049.

Araujo, T.A.S., Alencar, N.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2008. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **J. Ethnopharmacol.** 120 (1), 72-80.

Araújo, T.A.S., Peixoto-Sobrinho, T.J.S., Aguiar, J.S.; Silva, A.C.O., Brito, F.U., Silva, T.G., Amorim, E.L.C., Pranchevicius, M.C.S., 2015. Phytochemical, antioxidant and cytotoxic analysis of Brazilian cerrado plants: Preliminary evidence of their antitumor activity. **J. Med. Plant. Res.** 9 (9), 310-319.

Arnáiz-García, A.M., Arnáiz-García, M.E., Arnáiz, J., 2015. Management of furuncle, furunculosis and anthrax. **Med Clin (Barc)**.144, 376–378.

Barry, A.L., 1986. **Procedure goes testing antimicrobial agents in Agar measures: theoretical considerations.** Antibiotics in Laboratory Medicine. Baltimore: Williams & Williams, p. 13.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by the standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45 (4), 493-496.

Beiersmann, C., Sanou A., Wladarsch, E., De Allegri, M., Kouyaté, B., Müller O., 2007. Malaria in rural Burkina Faso: local illness concepts, patterns of traditional treatment and influence on health-seeking behavior. **Mal. J.** 6, 106.

Bennet, B.C., Prance, G.T., 2000. Introduced plants in the indigenous pharmacopoeia of northern south America. **Econ. Bot.** 54 (1), 90-102.

Cabral, D.L.V., 2014. **Potencial antimicrobiano de plantas da caatinga utilizadas na medicina tradicional como anti-inflamatórias** (Doctoral dissertation). Federal University of Pernambuco, Brazil.

Chander, M. P., Pillai, C.R., Sunish, I.P., Vijayachari, P., 2016. Antimicrobial and antimalarial properties of medicinal plants used by the indigenous tribes of Andaman and Nicobar Islands, India. **Microb. Pathog.** 96, 85-88.

Choudhari, A.S., 2013. Evaluating the anti-inflammatory potential of *Tectaria cicutaria* L. rhizome extract in vitro as well as in vivo. **J. Ethnopharmacol.** 150, 215-222.

CLSI - **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; approved standard - tenth edition. Document: M07 – A10.

Coelho-Castelo, A.A.M., Trombone, A.P.F., Rocha, C.D., Lorenzi, J.C.C., 2009. Immune response to infectious diseases. **Medicina (Ribeirão Preto)**. 42 (2), 127-142.

Costa, M.J.R.P. **Etologia e produtividade animal**. Published on the Internet. <<http://www.uff.br/webvideoquest/CS/etologia%20animal.pdf>> (last accessed Setember 2017).

Crawford, D.J.; Giannasi, D.E., 1982. Plant Chemosystematics. **BioScience**. 32 (2), 114-118+123-124.

Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agentes. **Curr. Opin. Biotechnol.** 23, 174-181.

Ferreira-Junior, W.S., Ladio, A.H., Albuquerque, U.P., 2011. Resilience and adaptation in the use of medicinal plants with suspected anti-inflammatory activity in the Brazilian Northeast. **J. Ethnopharmacol.** 138, 238-252.

Ferreira-Junior, W.S., Silva, T.G., Menezes, I.R.A., Albuquerque, U.P., 2016. The role of local disease perception in the selection of medicinal plants: A study of the structure of local medical systems. **J. Ethnopharmacol.** 181, 146-157.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Published on the Internet. <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. (last accessed January 2018)

Herndon, C.N., Uiterloo, M., Uremaru, A., Plotkin, M.J., Emanuels-Smith, G., Jitan, J., 2009. Disease concepts and treatment by tribal healers of an Amazonia forest culture. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** 5, 27.

Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn-JR, W.C., 1997. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. México: J. B. Lippincott Co., 570p.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., Mitchell, R.N., 2008. **Robbins. Patologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 929p.

Melo, J.G., Rodrigues, M.D., Nascimento, S.C., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2017. Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: A comparison of different selection approaches. **S. African J. Bot.** 113, 47-53.

- Monteiro, J.M., Albuquerque, U.P., Araujo, E.L., Amorim, E.L.C., 2005. Tannis: from chemistry to ecology. **Quím. Nova.** 28 (5), 892-896.
- Monteiro, J.M., Ramos, M.A., Araújo, E.L., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2011. Dynamics of medicinal plants knowledge and commerce in an urban ecosystem (Pernambuco, Northeast Brazil). **Environ Monit Assess** 178, 179–202.
- Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C., Silva, G.L., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.** 31 (2), 247-256.
- Obiang-Obounou, B.W., Ryu, G.H., 2013. The effect of feed moisture and temperature on tannin content, antioxidant and antimicrobial activities of extruded chestnuts. **Food Chem.** 141, 4166-70.
- Park, K.K., Brodell, R.T., Helms, S.E., 2011. Angular Cheilitis, Part 1: Local Etiologies. **Cutis.** 87, 289-295.
- Pedrollo, C.T., Kinupp, V.F., Shepard Jr, G., Heinrich, M., 2016. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **J. Ethnopharmacol.** 186, 111-124.
- Peixoto-Sobrinho, T.J.D.; Silva, C.H.T.P.; Nascimento, J.E.; Monteiro, J.M.; Albuquerque, U.P.; Amorim, E.L.C., 2008. Validation of spectrophotometric methodology for quantify flavonoid content in *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** 44 (4), 683-689.
- Pinto, A.C., Silva, D.H.S., Bolzani, V.D., Lopes, N.P., Epifanio, R.D., 2002. Produtos Naturais: atualidade, desafios e Perspectivas. **Quím. Nova.** 25, Supl. 1, 45-61.
- Razera, F., Bonamigo, R.R., Dias, C.A.G., De Stefani, S., Olm, G.S., Narvaez, G.A., 2009. CA MRSA in furunculosis: Case report of Southern Brazil. *An. Bras. Dermatol.* 84 (5), 515-518.
- Reyes-García, V., 2010. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. **J. Ethnobiol. Ethnomed.** 6, 32.
- Rocha, B.A., Melo-Filho, M.R., Simões, A., 2015. Antimicrobial Photodynamic Therapy to treat chemotherapy-induced oral lesions: Report of three cases. **Photodiagnosis Photodyn. Ther.** 13, 350-352.
- Santos, A.D.H., Martínez, J.E., Román, C.G.S., Andreu, J.A.L., 2017. Bronchitis obliterans due to *Influenza B* pneumonia complicated with *Staphylococcus aureus* infection. **Arch Bronconeumol.** 53 (8), 463-464.
- Santos, S.C., Mello, J.C.P., 2002. **Taninos**. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmanm, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 4ed. Editora Universitária/UFRGS/UFSC, pp. 517–543.
- Santos, S.C., Mello, J.C.P., 2004. **Taninos**. In: Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmanm, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Eds.), *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5ed. Editora Universitária/UFRGS/UFSC, pp. 615–656.

- Scalbert, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**. 30, 3875.
- Silva, A.C.O., Albuquerque, U.P., 2005. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). *Acta Bot. Bras.* 19 (1), 17-26.
- Silva, A.C.O., Santana, E.F., Saraiva, A.M., Coutinho, F.N., Castro, R.H.A., Pisciotto, M.N.C., Amorim, E.L.C., Albuquerque, U.P., 2013. Which Approach Is More Effective in the Selection of Plants with Antimicrobial Activity? **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.** 2013, doi: 10.1155/2013/308980.
- Silva, C.V., Reis, A.L.V., Ferrer, S.R., Guerreiro, H.M.N., Barros, F., Velozo, E.S., 2010. Evaluation of the antimicrobial activity of two Rutaceae species from the Brazilian Northeast. **Rev. Bras. Farmacogn.** 20 (3), 355-360.
- Silva, F.S., Ramos, M.A., Hanazaki, N., Albuquerque, U.P., 2011. Dynamics of traditional knowledge of medicinal plants in a rural community in the Brazilian semi-arid region. **Rev. Bras. Farmacogn.** 21 (3), 382-391.
- Siqueira, C.F.Q., Cabral, D.L.V., Peixoto Sobrinho, T.J.S., Amorim, E.L.C., Melo, J.G., Araujo, T.A.S., Albuquerque, U.P., 2012. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.** 2012, doi:10.1155/2012/434782
- Souza, A.S., Souza, A.P.B., Lucena, R.F.P., 2016. Relative importance of medicinal plants in the Semi-Arid Region of Paraíba: a case study in the Municipality of Congo (Paraíba, Northeast Brazil). **Braz. J. Biolog. Sciences**, 3 (5), 83-96.
- Tanaka, J.C.A., Silva, C.C., Dias, B.P., Nakamura, C.V., Carvalho, J.E., Foglio, M.A., 2005. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Quím Nova**. 28, 834-837.
- Vieira, D.R.P., Amaral, F.M.M., Maciel, M.C.G., Nascimento, F.R.F., Libério, S.A., Rodrigues, V.P., 2014. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation **J. Ethnopharmacol.** 155, 1441-1449.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin Heidelberg: Springer Verlag, pp. 384.

ANEXO

Manuscript Details

Manuscript number	JEP_2018_122
Title	ARE THERE LIMITATIONS REGARDING ETHNODIRECTED ANTIMICROBIAL PLANT SELECTION?
Article type	Research Paper

Abstract

Ethnopharmacological Importance The inflammatory response is the organism's first defense against tissue damage. Ethnopharmacological reports of botanical species with possible anti-inflammatory and anti-microbial properties confuse the two, in so far as symptoms of infection are often associated with inflammatory disease. **Aim of the Study** The study aims to evaluate the antimicrobial properties of three groups of plants selected using the ethnopharmacological method, reported as having antimicrobial and/or anti-inflammatory properties by a rural community in the Brazilian State of Pernambuco. **Materials and Methods** The samples of the selected species were divided into groups of seven plants reported as having antimicrobial properties (GI), seven reported as having anti-inflammatory properties (GII) and another group of eight plants reported to have both (GIII). The antimicrobial properties of these groups were compared using the disc-diffusion method for nine micro-organisms: Gram-positive and Gram-negative bacteria, acid-alcohol resistant bacillus (BAAR) and yeast. **Results** Of the plants reported to have antimicrobial properties (GI), 28.6% demonstrated activity against the micro-organisms tested, compared with 57.1% of the plants and 100% of GIII. **Conclusions** The present study shows that greater care should be taken in selecting species recommended by ethnopharmacological reports for studies of antimicrobial properties, since plants reported to have anti-inflammatory properties may be more active than those reported as being antimicrobial. It is suggested that this occurs because of lack of sufficient knowledge on the part of the population to identify the true cause of the disease (infection or inflammation) and ethnobotany should also therefore pay attention to the interpretation of the results.

Keywords	Antiinflammatory x antimicrobial activity; ethnopharmacology; caatinga; medicinal plants; phenolic compounds.
Taxonomy	Ethnopharmacology, Antiinflammatory Activity, Antimicrobial
Corresponding Author	Allan Correa
Order of Authors	Allan Correa, Bruno de Almeida Andrade, Patricia Maria da Silva Neri, VALERIUM CASTRO, Rosilma Oliveira Araujo, Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena, thiago araujo, Tadeu Peixoto Sobrinho, Elba Amorim

Submission Files Included in this PDF

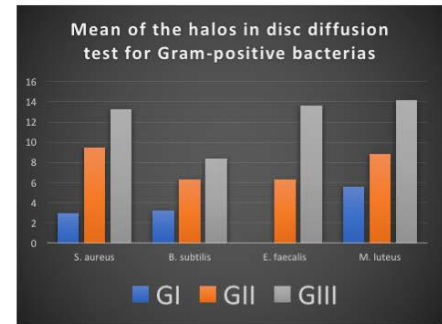
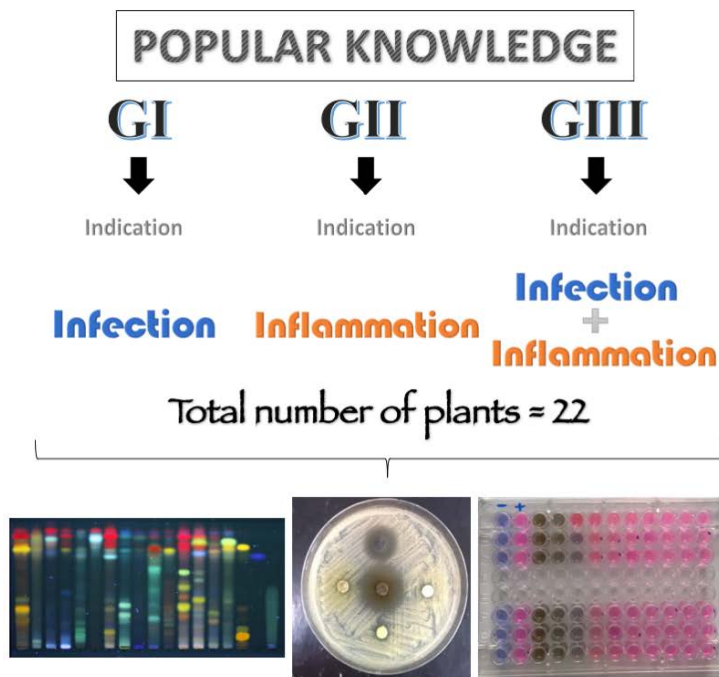
File Name [File Type]

Author Declaration.pdf [Cover Letter]

Graphic abstract.pdf [Graphical Abstract]

Correa_2018 RESUBMISSION.docx [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.



Are we selecting antimicrobial plants correctly?