

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ELYS KARINE CARVALHO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS METANÓLICO E AQUOSO DE GALHOS
DA *Anadenanthera colubrina* (Vell.) BRENAN**

Recife
2020

ELYS KARINE CARVALHO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS METANÓLICO E AQUOSO DE GALHOS
DA *Anadenanthera Colubrina* (Vell.) BRENAN**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva

Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Silva, Elys Karine Carvalho da

Avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e antioxidante de extratos metanólico e aquoso de galhos da *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan / Elys Karine Carvalho da Silva – 2020.

63 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva

Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.

Inclui referências.

1. Plantas medicinais 2. Compostos fenólicos 3. *Staphylococcus aureus* I. Silva, Márcia Vanusa da (orient.) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient.) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020-117

ELYS KARINE CARVALHO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E
ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS METANÓLICO E AQUOSO DE GALHOS DA
Anadenanthera Colubrina (Vell.) BRENAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Márcia Vanusa da Silva
Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Departamento de Bioquímica- Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Ana Paula Sant'Anna da Silva
Departamento de Bioquímica-Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Márcia Vanusa por ter acompanhado todo meu desenvolvimento científico até aqui, sendo, principalmente, uma fonte de inspiração por ser uma mulher cientista, apaixonada pela academia e por causas sociais.

Aos colegas que fiz durante a caminhada e que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização do meu trabalho, participaram da minha rotina de experimentos, dividiram comigo seus aprendizados e experiências e muitas vezes tornaram meus dias mais leves e descontraídos. Agradeço especialmente a Roger Luis e Clovis Macedo por terem desenvolvido ao meu lado este trabalho, cada um a sua maneira.

Agradeço aos meus pais por nunca medirem esforços para investir em mim, principalmente na minha educação, e por todo o apoio que recebo, vocês são sempre minha base mais sólida. Essa é a forma que retribuo, dedicando minhas vitórias a vocês. Muito obrigada, amo vocês.

Aos meus amigos, desde os mais antigos até os mais recentes, pois vocês são meus companheiros da vida e eu sou muito feliz por tê-los comigo. Amo vocês!

A toda minha família que sempre incentivou meus estudos e mesmo com distância física sempre fizeram questão de estar presentes de alguma forma.

A todos aqueles que contribuíram para a concretização deste trabalho, muita obrigada!

Eu quero ser tudo que sou capaz de me tornar.

Katherine Mansfield

RESUMO

A população brasileira tem uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças. Dentre as espécies com importância etnomedicinal destaca-se a *Anadenanthera colubrina*, conhecida popularmente como angico. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo determinar as atividades antioxidante, antimicrobiana e antivirulência dos extratos aquoso e metanólico de galhos da *A. colubrina*. A coleta dos galhos foi realizada no Parque Nacional do Vale do Catimbau, localizado no município de Buíque-PE. A análise fitoquímica dos extratos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram determinados os conteúdos de fenóis e flavonoides totais, e o potencial da atividade antioxidante foi avaliado pelos métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico) (ABTS) e atividade antioxidante total. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da concentração mínima inibitória (CMI), de ensaios de virulência (produção de estafilocantina, hemólise bacteriana e resistência ao peróxido de hidrogênio) e testes *in vivo* com a aplicação dos extratos em larvas infectadas de *Tenebrio molitor* para avaliar sua capacidade de tratar infecções bacterianas. A possível citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo teste da atividade hemolítica. A análise fitoquímica mostrou que o extrato aquoso apresentou derivados cinâmicos na sua composição e o extrato metanólico alguns derivados cinâmicos e flavonoides. A média do teor de compostos fenólicos foi maior para o extrato aquoso (218,22 mgEAG/g), o que pode estar relacionado com sua alta porcentagem de inibição do radical ABTS e de atividade antioxidante total. Os extratos apresentaram o menor CMI (0,125 mg/mL) quando testados contra a cepa UFPEDA 683 de *Staphylococcus aureus*, resistente a diversos antibióticos. Os tratamentos com os extratos em larvas de *T. molitor* não apresentaram toxicidade significativa e aumentaram a sobrevivência dessas larvas infectadas. A cepa UFPEDA 683 diminuiu aproximadamente 50% da produção da estafilocantina quando tratada com o extrato aquoso (0,0625-0,015 mg/mL). No teste de resistência ao peróxido de hidrogênio, a cepa UFPEDA 683 tratada apresentou menor resistência às espécies reativas. Os extratos foram capazes de reduzir a hemólise causada pelo *S. aureus* e não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações testadas (1,0-5,0 mg/mL). Com isso, foi concluído que os extratos, destacando-se o aquoso, demonstram potencial antimicrobiano, corroborando com a utilização popular, além da significativa ação antivirulência.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. *Staphylococcus aureus*. Antibacterianos. Fatores de virulência.

ABSTRACT

The Brazilian population has a long tradition of using medicinal plants to treat different diseases. *Anadenanthera colubrina*, popularly known as angico, is one of the most important species in ethnomedicine. The present work aimed to determine the antioxidant, antimicrobial and antivirulence activities of the aqueous and methanolic extracts of branches of *A. colubrina*. The collection of branches was performed in the Parque Nacional do Vale do Catimbau, located in Buíque-PE. Phytochemical analysis of the extracts was performed by high performance liquid chromatography. The contents of total phenols and flavonoids were determined, and the potential for antioxidant activity was evaluated by the methods 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) and total antioxidant activity. An antimicrobial activity was assessed by the minimum inhibitory concentration (MIC), virulence assays (staphyloxanthin production, bacterial hemolysis assay and hydrogen peroxide resistance) and in vivo tests with the application of extracts on infected *Tenebrio molitor* larvae to assess their ability to treat bacterial infections. The possible cytotoxicity of the extracts was evaluated by hemolytic activity. The phytochemical analysis showed that the aqueous extract presented cinnamic derivatives in its composition and the methanolic extract some cinnamic derivatives and flavonoids. The average content of phenolic compounds was higher for aqueous extract (218.22 mg EAG/g¹), which may be related to its high percentage of ABTS radical inhibition and total antioxidant activity. The extracts showed the lowest MIC (0.125 mg/mL) when tested against the strain UFPEDA 683 of *Staphylococcus aureus*, resistant to several antibiotics. The treatments with extracts in *T. molitor* larvae did not present significant toxicity and increased the survival of these larvae. The UFPEDA 683 strain decreased approximately 50% of staphyloxanthin production when treated with aqueous extract (0.0625-0.015 mg/mL). In the hydrogen peroxide resistance test the treated UFPEDA 683 strain presented lower resistance to the reactive species. The extracts were able to reduce hemolysis caused by *S. aureus* and did not show hemolytic activity at the tested concentrations (5-1 mg/mL). It was concluded that extracts, standing out the aqueous, demonstrated antimicrobial potential, corroborating the popular use, in addition to the significant antivirulence action.

Keywords: Phenolic Compounds. *Staphylococcus aureus*. Anti-Bacterial Agents. Virulence Factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Região da Caatinga.....	16
Figura 2 - Tronco da <i>Anadenanthera colubrina</i>	22
Figura 3 - Imagem tridimensional de <i>S. aureus</i> gerada computacionalmente.....	27

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 -	Teor de Fenóis e Flavonóides Totais e Atividades Antioxidantes (média $\pm$ DP, n=3).....	46
Tabela 2 -	Atividade antimicrobiana dos extratos da <i>A. colubrina</i> contra isolados de <i>S. aureus</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT	Atividade Antioxidante Total
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico)
Agr	Regulador de Genes Acessórios
ATCC	American Type Culture Collection
AMP	Peptídeos Antimicrobianos
BHI	Brain Heart Infusion
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Especificidade
C10	Monoterpenos
C15	Sesquiterpenos
C20	Diterpenos
C25	Sesterterpenos
C30	Triterpenos
C40	Tetraterpenos
C18 ~ 30	Esteróides
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
mg EAG/g	miligrama de Equivalentes de Ácido Gálico por grama
mg EQ/g	Miligrama de Equivalentes da Quercetina por grama
MH	Mueller Hinton
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MRSA	<i>S. aureus</i> Resistente à Meticilina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP2a	Proteína de Ligação à Penicilina 2a
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RAM	Resistência Antimicrobiana
SarA	Regulador Acessório Estafilocócico A

SaPI	Ilhas de patogenicidade
SCCmec	Cassete Cromossômico Estafilocócico mec
SigB	Fator Sigma Alternativo Estafilocócico B
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	CAATINGA	16
2.2	PLANTAS MEDICINAIS	17
2.3	METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS	19
2.4	<i>Anadenanthera colubrina</i>	21
2.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
2.6	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	24
2.7	GÊNERO <i>Staphylococcus</i>	25
2.8	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
3	METODOLOGIA	30
3.1	MATERIAL VEGETAL	30
3.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	30
3.3	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA	30
3.3.1	Cromatografia Líquida de Alta Especificidade (CLAE)	30
3.4	ENSAIOS ANTIMICROBIANOS	31
3.4.1	Cepas bacterianas	31
3.4.2	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	31
3.4.3	Aplicações em modelos <i>in vivo</i>	32
3.4.3.1	Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> (<i>T. molitor</i>)	32
3.4.3.2	<i>T. molitor</i> x infecção de <i>S. aureus</i>	32
3.5	ENSAIOS DE VIRULÊNCIA	32

3.5.1 Ensaio de hemólise bacteriana.....	32
3.5.2 Ensaio de produção da estafiloxantina.....	33
3.5.3 Ensaio de resistência ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	33
3.6 ENSAIOS ANTIOXIDANTES.....	33
3.6.1 Dosagem de compostos fenólicos	33
3.6.2 Dosagem de flavonoides	34
3.6.3 Método de DPPH.....	34
3.6.4 Método de ABTS	35
3.6.5 Método de fosfomolibdênio ou atividade antioxidante total	35
3.7 ATIVIDADE HEMOLÍTICA	36
4 RESULTADOS	37
ARTIGO - AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS METANÓLICO E AQUOSO DE GALHOS DA <i>Anadenanthera Colubrina</i> (Vell.) BRENAN	37
5 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO.....	60

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 85% das pessoas do mundo utilizam plantas medicinais para tratamento de doenças, e embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida, grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para atenção primária, principalmente por meio do uso de extratos de plantas (OLIVEIRA, 2010; BRASIL, 2006). A população brasileira tem uma longa tradição no uso de plantas para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas, isto se deve principalmente ao baixo custo, o benefício terapêutico, a falta de tratamento para determinadas patologias e o fácil acesso a essas espécies medicinais (MENALE et al., 2016).

Os vegetais superiores podem ser usados de forma terapêutica devido principalmente aos seus metabólitos secundários. A maioria destes compostos é responsável por características como odor e cor dos vegetais. Por causa da sua enorme variação estrutural, consequentemente, eles exibem uma ampla gama de atividades biológicas (LEICACH; CHLUDIL, 2014).

Muitas plantas medicinais da Caatinga, como a *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (*A. colubrina*), são extensivamente utilizadas como terapêuticos. Por ser um ecossistema exclusivamente brasileiro, essa região semiárida de maior diversidade biológica do mundo apresenta condições climáticas únicas que proporcionam características adaptativas singulares, o que leva as espécies ali presentes a desenvolverem um comportamento fisiológico específico, são descritas, por exemplo, atividades antiinflamatória, antinociceptiva, antiproliferativa, antioxidante e antimicrobiana (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002; DA SILVA et al., 2012).

Apesar das pesquisas e dos esforços, as próprias drogas que ajudaram a reduzir a mortalidade por doenças infecciosas na segunda metade do século XX estão perdendo sua eficácia. A Resistência Antimicrobiana (RAM) está em ascensão em grande parte do mundo, e as “superbactérias” passaram a representar uma ameaça (The Review on Antimicrobial Resistance, 2014). A maioria das infecções envolvidas com RAM são bacterianas, muitas geralmente contraídas como infecções hospitalares sendo os microrganismos mais frequentemente isolados *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (ZARB et al., 2012). O *S. aureus* é um importante patógeno humano que possui diversos fatores de virulência e capacidade de adquirir resistência à muitos antibióticos utilizados na prática clínica. Esta capacidade é aumentada ainda mais pelo surgimento constante de novos clones (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Estudos mostram que uma das possíveis ações da *A. colubrina* contra *S. aureus* se dá, provavelmente, pela alteração na parede celular e/ou membrana plasmática desta bactéria. O

que justifica o uso tradicional desta espécie, sua indicação de potencial biotecnológico e a possibilidade de utilização sustentável dos recursos naturais da Caatinga (DA SILVA et al., 2012).

Diante do potencial biotecnológico da *A. colubrina* e da sua utilização no tratamento tradicional contra infecções, justifica-se a realização de testes que indiquem o uso de extratos desta espécie, visando aplicar o conhecimento popular e científico no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas focando na capacidade de redução da virulência para combater as infecções causadas pelo *S. aureus*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de extratos aquoso e metanólico de galhos da *A. colubrina*, além dos efeitos causados nos mecanismos de virulência das cepas de *S. aureus* testadas.

1.1.2 Objetivos específicos

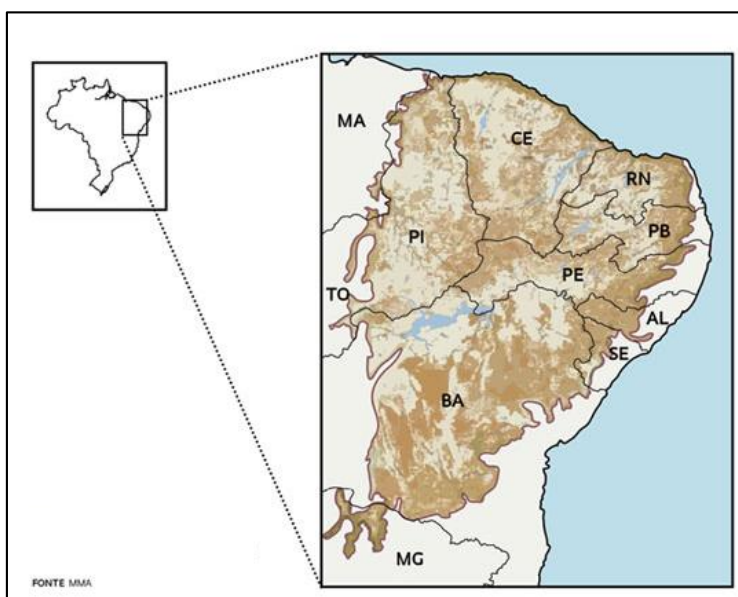
- Realizar caracterização fitoquímica dos extratos aquoso e metanólico da *A. colubrina*;
- Determinar a atividade antioxidante dos extratos através de metodologias *in vitro*: dosagem de Fenóis totais e Flavonoides totais, Radical 2,2-difenil1-pricrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) e Fosfomolibdênio;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos mediante a quantificação da atividade hemolítica *in vitro*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos contra *S. aureus*;
- Investigar o efeito dos extratos nos mecanismos de virulência de cepas de *S. aureus* através dos ensaios de produção do pigmento estafiloxantina, resistência ao peróxido de hidrogênio e hemólise bacteriana;
- Estudar a sobrevivência de larvas de *Tenebrio molitor* infectadas por linhagens de *S. aureus* após tratamento com os extratos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CAATINGA

A Caatinga ocupa cerca de 11% do território nacional, abrangendo os Estados do Piauí, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Maranhão, Ceará, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais, como mostra a figura 1 (MMA, 2015). Nessa região, o clima predominante é tropical seco com a evaporação excedendo a precipitação e os índices pluviométricos são baixos, chovendo em média 350 a 700 mm/ano de forma mal distribuída. Os tipos de solo mais comuns são os sedimentares arenosos ou de origem arqueana. Sua vegetação caracteriza-se por ser espinhenta, de folhas pequenas e caducas, constituída por arbustos e árvores de pequeno porte, rica em cactáceas, bromeliáceas, euforbiáceas e leguminosas (ANDRADE; COSTA; SANTOS, 2010). Intercalados entre essas superfícies, há planaltos que podem atingir até 1000m de altura, onde a vegetação é composta por florestas úmidas, cerrados e campos rupestres, com temperaturas médias que podem ser mais baixas e precipitação podendo chegar a 1800 mm por ano (TABARELLI et al., 2018). Por isso, trata-se da região semiárida mais biodiversa do mundo, com presença de 932 espécies de plantas, 178 de mamíferos e 590 de aves, muitas destas ocorrendo somente na Caatinga (MMA, 2012).

Figura 1 Região da Caatinga



Fonte: Ministério do Meio Ambiente (2015)

Apesar da sua importância, o desmatamento tem crescido de forma acelerada por causa da ideia de improdutividade e devido principalmente ao consumo de lenha nativa, explorada de forma ilegal e insustentável, para fins domésticos e industriais, e a conversão de áreas naturais para pastagens e agricultura. Cerca de 27 milhões de pessoas vivem na área original da Caatinga sendo grande parte da população carente e com necessidade dos recursos da biodiversidade local para sobreviver. Estes mesmos recursos, se conservados e explorados de forma sustentável, podem impulsionar o desenvolvimento da região (DE ALBUQUERQUE et al., 2002; MMA, 2012).

As plantas da Caatinga também são utilizadas pelas comunidades locais para combater suas enfermidades, pois algumas vezes acabam sendo o único recurso disponível. Este conhecimento sobre terapias com plantas é repassado de geração a geração nas comunidades tradicionais e pode ser aplicado como um instrumento importante para indústria farmacêutica na elaboração de novos medicamentos (SANTOS et al., 2017).

No estudo realizado por Santos et al. (2017), foram registradas 42 espécies medicinais nativas da Caatinga pertencentes a 34 gêneros e 24 famílias. As famílias Fabaceae e Euphorbiaceae tiveram o maior número de espécies relatadas, sugerindo que representantes dessas famílias são extremamente importantes para uso medicinal e têm grande potencial para extração de compostos bioativos importantes (ALMEIDA et al., 2012; MOERMAN; ESTABROOK, 2003; SANTOS et al., 2017).

2.2 PLANTAS MEDICINAIS

Desde os primórdios, as plantas com propriedades medicinais são utilizadas em prol da saúde humana, atrelando a cultura e o saber empírico transmitido de geração à geração. O uso terapêutico das plantas é difundido por todo o mundo, contudo, sua maior utilização é evidenciada nos países em desenvolvimento pelo fato de parte da população ser de baixa renda (FERREIRA, 2019).

Além de atualmente serem usados como terapia, os compostos derivados de plantas desempenham um importante papel na síntese de algumas moléculas mais complexas. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos terapêuticos disponíveis são derivados de fontes naturais, principalmente de plantas e microrganismos. Em áreas específicas, como a Oncologia, esta porcentagem chega a 60% (DUTRA et al., 2016; MISHRA; TIWARI, 2011).

Um dos marcos no uso de plantas para desenvolvimento de fármacos, foi a descoberta em 1832 da salicilina, um composto presente na *Salix alba* com propriedade analgésica e

antipirética. Em 1839, foi feita a primeira modificação estrutural da salicilina levando à produção do ácido salicílico, que passou a ser usado no tratamento da artrite reumatoide. A partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a aspirina (ácido acetilsalicílico) em 1897 e foi feita a primeira patente na área das drogas (DUTRA et al., 2016).

No Brasil, vários estudos são desenvolvidos na área dos fitoterápicos principalmente por causa da grande biodiversidade e da influência do saber popular das antigas comunidades. Estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos mostraram algumas plantas com uso consolidado entre as comunidades, por exemplo: a folha de *Schinus terebinthifolius* Raddi, conhecida popularmente como aroeira que tem atividade anti-inflamatória e antipirético (BALEN, 2015); a casca da *Araucaria angustifolia* (Bertol.), conhecida popularmente como araucária, com ação antimicrobiana e antineoplásica (RAMOS et al. 2010); a casca do *Stryphnodendron barbatimam* Mart., conhecida popularmente como barbatimão, com ação cicatrizante (BRASIL, 2016), entre diversas outras que já estão catalogadas.

Por causa do uso frequente das plantas medicinais, houve a necessidade de criação pela OMS do Programa de Medicina Tradicional no final da década de 1970, objetivando a formulação de políticas públicas na área. No Brasil, a legitimação e a institucionalização dessas abordagens de atenção à saúde iniciaram-se a partir da década de 1980, após a criação do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2015). Neste sentido, destaca-se a implementação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), ambas aprovadas no ano de 2006 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Com o passar dos anos e com a legislação bem fundamentada, o Brasil passou a ser referência mundial na área de práticas integrativas e complementares na atenção básica. Atualmente, o SUS oferece, de forma integral e gratuita, 29 procedimentos que utilizam recursos terapêuticos baseados em conhecimentos tradicionais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Por isso, é importante que o saber popular seja utilizado como base para a pesquisa científica sobre plantas medicinais com a finalidade de introdução das espécies em programas de fitoterapia na rede de atendimento básico, além de contribuir para o sistema local de saúde, no desenvolvimento de possíveis fármacos e ajudar na consolidação do potencial econômico inerente às plantas de valor medicinal.

2.3 METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS

Compostos orgânicos, classificados como metabólitos primários e secundários, são abundantemente sintetizados pelas plantas. Os metabólitos primários, como, por exemplo, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, são necessários para processos básicos como fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento. Já os metabólitos secundários são um grupo diversificado de compostos orgânicos que são produzidos geralmente em espécies relacionadas taxonomicamente e que se distinguem dos metabólitos primários, pois são especificamente acumulados, não muito intermediários de processos químicos, auxiliam as plantas a interagir com o meio biótico e abiótico e a estabelecer mecanismos de defesa, como por exemplo, com o acúmulo de compostos antimicrobianos em resposta a microrganismos patogênicos (GANDHI; MAHAJAN; BEDI, 2015; MURTHY; LEE; PAEK, 2014).

Cerca de 100.000 metabólitos secundários já foram isolados e eles apresentam uma variedade de atividades de importância econômica, como a fitoterapia, com isso, surge o interesse em elucidar a biossíntese e a funcionalidade desses compostos (GANDHI; MAHAJAN; BEDI, 2015). Com o avanço da ciência, novas ferramentas podem ser aplicadas para melhorar a produção de biomassa, aumentar a tolerância ao estresse e permitir a produção em grande escala desses compostos com importância farmacêutica, afim de enfrentar os desafios de uma população crescente, mudanças climáticas e bioenergia (WILLIAM, CHEZEM; CLAY, 2017).

Os principais metabólitos secundários produzidos são os compostos polifenólicos, terpenos e alcaloides. Os compostos fenólicos representam um dos maiores grupos de metabólitos secundários produzidos por plantas e apresentam uma ampla gama de aplicações (KABERA et al., 2014). Eles têm pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxila e são biossintetizados através da via do ácido chiquímico. Alguns deles têm propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antibacterianas, antissépticas, anti-helmínticas, entre outras (CUEVA et al., 2010; O'CONNOR, 2015; STANKOVIĆ, 2011).

A maioria dos fenólicos é polimerizada em moléculas maiores, conhecidos como polifenóis, que são muito importantes devido à sua maior abundância na natureza, sua diversidade e seu provável papel na prevenção de doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005; VARDHAN; SHUKLA, 2017).

Com base nas diferenças da estrutura química, os polifenóis podem ser subdivididos em duas classes: flavonoides e não flavonoides (GALEOTTI et al., 2008). Além disso, os flavonoides também podem ser divididos em três grupos: antocianinas, flavonas e flavonóis. As antocianinas são de natureza hidrofílica, com cor vermelha a azul, que confere a algumas plantas uma cor típica e promovem a saúde cardiovascular, têm atividade anticâncer e propriedades anti-inflamatórias (KRUGER et al., 2014; WALLACE; SLAVIN; FRANKENFELD, 2016; ZHU et al., 2012). As flavonas são cetonas aromáticas cristalinas insolúveis em água, ocorrem como pigmentos vegetais amarelos na forma de glicosídeos e são usadas como corantes, além de estarem associadas a benefícios antioxidantes (CERMAK, 2008; ROY et al., 2015). Os flavonóis são um subgrupo amplamente distribuído de flavonoides que inclui quercetina e kaempferol. Eles estão associados a atividades anti-histamínicas, anti-inflamatórias e antioxidantes que levam à prevenção de doenças crônicas (WANG et al., 2016). E os polifenóis não flavonoides são representados, por exemplo, por ácidos fenólicos e taninos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancer e cardioprotetoras (SMERIGLIO et al., 2017).

Os terpenos são conhecidos como o grupo mais importante e diversificado de metabólitos secundários, que compreende mais de 25.000 compostos ativos conhecidos até 2007 (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007). Eles são derivados poliméricos de isopreno biossintetizados a partir do acetato pela via do ácido mevalônico, classificados como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40, carotenoides) e esteroides (C18 ~ 30). Muitos deles têm propriedades biológicas e farmacológicas e são usados para o tratamento de doenças em humanos e animais (NASSAR, 2010; THOPPIL; BISHAYEE, 2011; TOLSTIKOVA et al., 2006). Nas plantas, os terpenos apresentam inúmeras funções bioquímicas que incluem: cadeia transportadora de elétrons, direcionamento e regulação subcelular, pigmentos fotossintéticos (carotenoides), hormônios (giberelinas, brassinosteroides, ácido abscísico, citocininas), compostos de defesa vegetal e atrativos para polinizadores (BOHLMANN; KEELING, 2008; MCGARVEY; CROTEAU, 2007; NCUBE; VAN STADEN, 2015).

Os alcaloides são sintetizados a partir de aminoácidos comuns, particularmente lisina, tirosina ou triptofano e representam a maior classe de metabólitos secundários de baixo peso molecular contendo nitrogênio e são encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas vasculares (ASHOK; LATHIYA; MURUGESAN, 2015). Esse grupo é subdividido em: protoalcaloides, alcaloides verdadeiros e pseudo alcaloides (VARDHAN; SHUKLA, 2017). A maioria dos alcaloides tem fortes atividades biológicas e, devido à sua natureza tóxica, sua

biossíntese fornece um mecanismo defensivo geral para o organismo produtor, um exemplo é a cafeína, que demonstrou agir como um inseticida natural em plantas (NCUBE; VAN STADEN, 2015). Para os humanos, alguns têm usos medicinais, como por exemplo, a vincristina e vinblastina, produzidas pela *Catharanthus roseus* utilizadas na medicina como anticâncer, e a morfina de papoula, produzida pela *Papaver somniferum* utilizada como analgésico (SHITAN, 2016).

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais. Mais recentemente, além disto, a biotecnologia passou a oferecer várias opções através das quais o metabolismo secundário pode ser alterado de maneiras inovadoras, para superproduzir fitoquímicos de interesse ou para reduzir o conteúdo de compostos tóxicos. Além disso, o enorme potencial biossintético das plantas ainda não foi totalmente explorado e a biotecnologia poderia ser usada para gerar novos compostos químicos, com bioatividades de interesse aprimorado (GANDHI; MAHAJAN; BEDI, 2015).

2.4 *Anadenanthera colubrina*

Anadenanthera é um pequeno gênero neotropical da América do Sul com apenas duas espécies: *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Ele pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, e as espécies podem crescer em áreas de savana e floresta tropical seca (ALTSCHUL, 1964).

Ambas as espécies têm uma forte similaridade morfológica, por isso, em 1955, elas consistiam em cinco espécies, anteriormente incluídas no gênero *Piptadenia* (CARVALHO, 1994; PESSOA, 2008). Embora as características macroscópicas externas das cascas sejam importantes e frequentemente utilizadas para identificação, no caso de espécies muito semelhantes, como é o caso de *A. peregrina* e *A. colubrina*, é necessário ter um conhecimento microscópico da estrutura interna ou da composição química das cascas. Com esta análise, diferenças importantes para a identificação foram encontradas no teor de extrativos polares das cascas de *A. peregrina*, que apresentou maior teor de taninos, e da *A. colubrina*, com maior teor de compostos fenólicos totais e flavonoides (MOTA et al., 2017).

No mundo, a espécie *A. colubrina* ocorre ao sul da linha do Equador, sendo típica da Caatinga na região Nordeste do Brasil, mas é presente também na região Sudeste. No Parque Nacional do Catimbau, onde foi coletada, ela é popularmente conhecida como angico de caroço, por causa do aspecto que o seu tronco apresenta, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 Tronco da *Anadenanthera colubrina*



Fonte: A autora (2018)

A. colubrina é considerada uma das plantas mais usadas na medicina popular, pois pode tratar problemas respiratórios, inflamação, diarreia, tosse, bronquite, gripe e dor de dente (MONTEIRO et al., 2006). Sua casca é a parte mais comumente utilizada da planta, cuja disponibilidade não é limitada por variações de condições climáticas. As comunidades fazem maceração com um litro de vinho ou cachaça e consomem três vezes ao dia até que os sintomas desapareçam (AGRA et al., 2008; DE SOUSA ARAÚJO et al., 2008; LIMA et al., 2014).

Estudos recentes sugerem que *A. colubrina* possui compostos com atividade antifúngica, capazes de inibir o crescimento de células de *Candida albicans* e a formação de biofilmes, o que faz do extrato hidroalcoólico da casca dessa planta uma possível fonte para o desenvolvimento de formulações antifúngicas. Além disso, também observaram atividade antiproliferativa, pois o extrato demonstrou capacidade de diminuir o crescimento de células tumorais e provou ser inativo contra células normais (LIMA et al., 2014; SILVA et al., 2019).

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O estresse oxidativo ocorre quando o balanço entre compostos antioxidantes e pró-oxidantes é alterado e as espécies reativas de oxigênio (EROS) superam as defesas antioxidantes do organismo, levando à modificação oxidativa de macromoléculas biológicas, lesão tecidual e morte celular acelerada. Essas espécies reativas são moléculas instáveis que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, sendo sua formação

determinada pela perda ou ganho de um elétron ou hidrogênio, ficando com um elétron desemparelhado (APAK et al., 2016). Sua produção ocorre em condições fisiológicas do metabolismo, mas também pode ser induzida por vários fatores externos, como radiação gama, ultravioleta (UV) e raios-X, estresse psicoemocional, condições ambientais adversas, intensivo esforço físico, tabagismo, alcoolismo e dependência de drogas (YASHIN et al., 2017).

As EROS são capazes de atacar a membrana celular, causando, por exemplo, mudanças estruturais na composição dos ácidos graxos; inativar a expressão de proteínas, com a carbonilação e oxidação de certas unidades de aminoácidos; modificar ácidos nucleicos, alterando a base nitrogenada ou as cadeias simples/duplas, eventualmente levando à apoptose celular. Além de ter sido relatado que o estresse oxidativo crônico leva a uma variedade de doenças, incluindo câncer e cardiopatias (WANG et al., 2017; YASHIN et al., 2017).

Porém, os níveis basais de EROS e outras espécies reativas são essenciais em processos fisiológicos, como por exemplo, no processo de cicatrização de feridas (KURAHASHI; FUJII, 2015). Durante a hemostase, elas regulam a constrição dos vasos sanguíneos para limitar a perda de sangue, facilitam a migração de neutrófilos e monócitos dos vasos sanguíneos adjacentes para o local da lesão e fazem o controle da infecção e manutenção geral da esterilidade (GULUMIAN; YAHAYA; STEENKAMP, 2018).

Os primeiros sistemas de defesa antioxidante com ação contra o dano oxidativo são os responsáveis pela prevenção da ocorrência de espécies reativas e aqueles que bloqueiam ou capturam as EROS já formadas. Estes sistemas, presentes tanto em compartimentos hidrofóbicos das membranas celulares quanto em ambientes aquosos, podem ser enzimáticos e não enzimáticos (PISOSCHI; POP, 2015).

Os antioxidantes enzimáticos são representados por enzimas redutase, por exemplo, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione redutase (GSH-Rx) e catalase, e seus cofatores, que limitam a concentração celular de EROS e impedem o excesso de oxidação (APAK et al., 2016).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser encontrados, por exemplo, nas plantas, pois estas apresentam uma grande variedade de moléculas sequestrantes de EROS, como compostos fenólicos das classes dos flavonoides, quinonas, cumarinas, lignanas e taninos (HENNIA; MIGUEL; NEMMICHE, 2018).

O uso de antioxidantes naturais é um campo de interesse crescente, especialmente em ciência de alimentos e medicamentos complementares. Ao longo dos anos, diversos métodos foram criados para determinar as propriedades antioxidantes dos extratos e compostos de plantas medicinais (APAK et al., 2016). Esta avaliação é uma questão crucial, porque as plantas

contêm dois tipos principais de antioxidantes, polares, por exemplo, compostos fenólicos e não polares, por exemplo, vitamina E, e não existe um método único adequado para avaliação de ambos os tipos. Por isso, pelo menos dois métodos para essa avaliação são recomendados (HENNIA; MIGUEL; NEMMICHE, 2018).

Os ensaios de DPPH e ABTS são os métodos comumente utilizados para a avaliação de antioxidantes doadores de prótons, como compostos fenólicos. O ensaio de DPPH utiliza este radical estável que sofre redução pelos antioxidantes presentes nos extratos por causa da sua estrutura que o permite aceitar um elétron ou hidrogênio, o que causa uma mudança de coloração violeta para amarela. O ensaio de ABTS ocorre com a formação do radical ABTS[•], que apresenta coloração esverdeada. Este aceita átomos de hidrogênio ou elétrons fornecidos por compostos antioxidantes e na medida em que são misturados ocorre a sua redução, provocando a perda da coloração do meio reacional (APAK et al., 2016).

A atividade antioxidante total (AAT) ou o método de fosfomolibdênio é baseado na redução do Mo(VI) para Mo(V) pela ação da amostra analisada e a subsequente formação de um complexo fosfato/Mo(V) de coloração verde em pH ácido. Como resultado, a capacidade antioxidante total está diretamente relacionado com o aumento da absorbância das amostras testadas (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

2.6 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os antibióticos trouxeram uma revolução na sociedade, pois antes da descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 e seu subsequente desenvolvimento como um medicamento por Howard Florey e Ernst Chain, infecções poderiam ser ainda mais letais que nos dias atuais. Porém, devido à seleção natural, já era sabido que as bactérias poderiam se tornar resistentes. Hoje, o uso dos antibióticos já existentes está em risco e isto foi recentemente classificado como tendo um impacto sobre os seres humanos semelhante ao da mudança climática global (O'NEILL, 2016).

A resistência ocorre quando bactérias, vírus, fungos e parasitas se adaptam a drogas antimicrobianas, resultando em ineficiência e infecções persistentes, tendo como resultado o aumento do risco de doenças e sua transmissão (HAY et al., 2018). Uma das principais razões para o desenvolvimento da resistência é o uso inadequado dos antibióticos pelos pacientes e na prescrição dos médicos, como por exemplo, durante infecções virais, ou no uso em criadouros de animais (O'NEILL, 2016).

O uso de um antibiótico pode não apenas selecionar a resistência contra si mesmo como co-selecionar para outros antibióticos (POUWELS et al., 2018). A expansão dessas infecções multiresistentes aumenta os custos para o sistema de saúde, pois exigem o uso de diferentes gerações de antibióticos tornando os tratamentos mais caros e as internações hospitalares prolongadas. Além disso, estima-se que mundialmente a RAM seja reponsável por 700.000 mortes anuais (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2016; POORAN et al., 2013; THORPE; JOSKI; JOHNSTON, 2018).

Atualmente ainda existe necessidade da expansão do acesso a antimicrobianos em países de baixa e média renda, onde continuam havendo mortes por doenças infecciosas que são facilmente tratadas em países desenvolvidos. Em contrapartida, cada dose consumida coloca pressão sobre as populações alvo para desenvolver e proliferar mecanismos de resistência (LAXMINARAYAN et al., 2016).

Existem também barreiras científicas específicas para o desenvolvimento de respostas eficazes para RAM. As bactérias desenvolveram numerosos mecanismos para evitar antibióticos, como por exemplo, a modificação ou destruição enzimática do antibiótico (ex: destruição dos agentes β -lactâmicos pelas enzimas β -lactamases e produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos pelo *S. aureus*); a prevenção da acumulação intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular (ex: resistência da *P. aeruginosa* ao imipenem) ou da existência de bombas de efluxo dos antibióticos das células bacterianas (ex: resistência da família das enterobacteriáceas às tetraciclinas); e a produção de moléculas diferentes que se tornam alvos alternativos não sendo inibidas pelo antibiótico, enquanto se continua a produzir as moléculas alvo originais, contornando desse modo a inibição induzida pelo antibiótico (ex: resistência da bactéria *S. aureus* à meticilina) (HAWKEY, 1998; KAPOOR, 2017; MUNITA et al., 2016).

O desenvolvimento de um novo antibiótico que corresponda à eficácia dos já existentes, mas que aja contra as bactérias por um mecanismo diferente, é valioso se permanecer eficaz no futuro, uma vez que os existentes poderão se tornar clinicamente inutilizáveis (LIVERMORE, 2018).

2.7 GÊNERO *Staphylococcus*

Historicamente, as espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* foram consideradas pertencentes aos gêneros *Stomatococcus* e *Planococcus* como

parte da família Micrococcaceae. Com o advento da análise molecular e de dados filogenéticos e quimiotaxonômicos, foi descoberto que os *Staphylococcus* e *Micrococcus* não estão intimamente relacionados (STACKEBRANDT; WARD-RAINEY, 1997). Por isso, a 2ª edição do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* passou a classificar o gênero *Staphylococcus* em uma nova família, denominada Staphylococcaceae. No total, 45 espécies e 24 subespécies foram descritas nesse gênero (BOND; LOEFFLER, 2012).

Os *Staphylococcus* são cocos Gram positivos e imóveis que, após exame microscópico, aparecem como aglomerados, com uma parede celular típica de bactérias Gram positivas, contendo ácido teicóico e peptidoglicano (WORTMAN, 1994). Também são anaeróbios facultativos, com exceção das espécies *S. saccharolyticus* e *S. aureus subsp. Anaerobius*, e embora sejam geralmente catalase positivas, cepas raras catalase negativas têm sido relatadas. Estas espécies são amplamente distribuídas em pele e membranas mucosas de humanos e animais, bem como solo, areia e água (GHERARDI; DI BONAVENTURA; SAVINI, 2018).

Staphylococcus coagulase positivos representam as principais espécies patogênicas dentro do gênero, sendo causadoras de infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos e com dispositivos médicos implantados (KRAWCZYK; KUR, 2018).

Espécies deste gênero, incluindo *S. aureus*, geralmente são patógenos oportunistas ou comensais, pois se tornam patogênicas a partir do momento que conseguem entrar no hospedeiro através de traumas cutâneos, inoculação ou implante de dispositivo, em pacientes imunocomprometidos ou que apresentem microbiota alterada (KLOOS; BANNERMAN, 1986; KLOOS; BANNERMAN, 1994).

A diferenciação entre as espécies do gênero é de extrema importância para a determinação do melhor tratamento a ser administrado. As espécies clinicamente mais significativas na medicina humana podem ser identificadas com base nas suas características-chave que foram incorporadas em sistemas bioquímicos manuais e automatizados. Porém, uma identificação precisa dos *Staphylococcus* ao nível da espécie é bastante laboriosa. Os métodos fenotípicos podem não identificar corretamente e, por isso, vários métodos de biologia molecular foram introduzidos, como por exemplo PCR, hibridização *in situ* e sequenciamento gênico (GHERARDI; DI BONAVENTURA; SAVINI, 2018; KRAWCZYK; KUR, 2018).

2.8 *Staphylococcus aureus*

Na década de 1880 o *S. aureus* foi identificado no líquido purulento de um abscesso de perna pelo cirurgião britânico Alexander Ogston. Esta bactéria é considerada um comensal, seu

habitat primário é o epitélio escamoso úmido das narinas anteriores, por causa das suas adesinas que permitem a ligação entre a bactéria e as células epiteliais (VAN BELKUM et al., 2009). Por isso, em seres humanos, mais de 80% das doenças de *S. aureus* adquiridas no hospital são infecções endógenas causadas por cepas transportadas no nariz do paciente (DELEO et al., 2010; TURNER et al., 2019).

É considerada uma bactéria esférica, sem movimento de esporos e sem motilidade, que se divide em mais de um plano formando aglomerados irregulares, como mostra a Figura 3. Caracteriza-se por ser anaeróbia facultativa, catalase positiva, coagulase positiva, oxidase negativa e pode crescer em 10% de NaCl (LEUNG, 2014).

Figura 3 Imagem tridimensional de *S. aureus* gerada computacionalmente



Fonte: Public Health Image Library (PHIL)

A partir do momento que se estabelece como uma infecção localizada, ela pode se tornar invasiva principalmente em casos de indivíduos com imunodeficiência (LEUNG, 2014). Ela é tida como uma das principais causas de infecções profundas, como endocardite, osteomielite e abscessos e de infecções superficiais de pele e dos tecidos moles, como impetigo, pioderma ou infecções sistêmicas, como bacteremias (TURNER et al., 2019).

A penicilina surgiu como uma solução para estas infecções causadas por *S. aureus*, mas rapidamente algumas cepas adquiriram resistência mediada pelo gene da beta-lactamase blaZ. As primeiras penicilinas antiestafilocócicas semissintéticas foram desenvolvidas por volta de 1960 e o *S. aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) foi observado dentro de um ano após seu primeiro uso clínico (HARKINS et al., 2017).

A resistência à meticilina é mediada pelo gene *mecA* e acontece por meio da transferência horizontal do Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCCmec). O gene

mecA codifica a proteína de ligação à penicilina 2a (PBP2a), que é uma enzima responsável por reticular os peptidoglicanos na parede celular bacteriana, e por causa da sua baixa afinidade por β -lactâmicos, esse metabolismo acaba resultando em resistência a toda essa classe de antibióticos (DELEO et al., 2010).

Desde a década de 1990, o MRSA se espalhou rapidamente na comunidade e apesar de ter sido registrada globalmente, não existe apenas uma cepa pandêmica, ocorrendo ondas de infecção, muitas vezes caracterizadas pela emergência serial de cepas predominantes. Por apresentarem cinco tipos distintos de elementos genéticos móveis, como: plasmídeos, transposons, fagos lisogênicos, ilhas de patogenicidade (SaPI) e o SCCmec, é muito eficiente a forma como cepas de *S. aureus* se tornam resistentes (LINDSAY, 2010; MALACHOWA; DELEO, 2010).

Uma das chaves para a patogenicidade do *S. aureus* é sua capacidade de sobreviver em ambientes adversos. Sua patogênese é um processo multifatorial que depende da expressão de uma ampla gama de fatores de virulência. Estes fatores podem estar presentes no genoma central ou acessório de uma cepa, sendo incluídos toxinas (hemolisinas e leucocidinas), fatores imunossupressores de superfície (cápsula e proteína A) e enzimas que promovem invasão tecidual (hialuronidase) (TURNER et al., 2019). A expressão dos fatores é controlada por múltiplos sistemas regulatórios, como o sistema Regulador de Genes Acessórios (Agr), que responde a sinais ambientais, como densidade celular, estado nutricional e disponibilidade de energia; o Regulador Acessório Estafilocócico A (SarA) que codifica fatores de virulência, como β - e δ -hemolisinas, exotoxina estafilocócica e a maioria das proteínas; além do fator sigma alternativo estafilocócico B (SigB), que atua de forma coordenada com a expressão de sarA (CHEUNG et al., 1992; ROUX et al., 2014).

Entre os fatores de virulência existentes, é conhecido que a estafiloxantina regula a virulência estafilocócica. Ela é um pigmento carotenóide responsável pela coloração amarela encontrada nas cepas de *S. aureus* e que desempenha um papel importante para a manutenção da infecção dessa bactéria no hospedeiro, pois confere proteção às células bacterianas contra agentes oxidantes produzidos no interior das células fagocíticas do sistema imune (LIU et al., 2005). Dessa forma, células de *S. aureus* deficientes em estafiloxantina são mais suscetíveis à morte por neutrófilos e são mais facilmente eliminadas dos tecidos infectados (LAN et al., 2010; LIU et al., 2005; THOMSEN; LIU, 2018).

Por isso, novos estudos são desenvolvidos para testar terapias alternativas com compostos antivirulência que tenham como foco as vias metabólicas críticas para a sobrevivência e a virulência do *S. aureus* como formas de reduzir as infecções e sua gravidade.

Uma das características principais de um composto antivirulência é que a viabilidade ou o crescimento bacteriano não são afetados, pois genes não essenciais são o foco da terapia e, por isso, desencadeia uma redução na pressão seletiva, minimizando a probabilidade de desenvolvimento de resistência. Acredita-se que inibindo as características de virulência bacteriana, as bactérias são menos capazes de colonizar o hospedeiro permitindo que a imunidade natural erradique o patógeno atenuado. Além disso, uma combinação de medicamentos antivirulência que visam diferentes tipos de fatores de virulência, juntamente com um ambiente de tratamento adequado, seria uma solução mais eficaz para as infecções bacterianas (ALLEN et al., 2014; KONG; NEOH; NATHAN, 2016).

3 METODOLOGIA

3.1 MATERIAL VEGETAL

Os galhos foram coletados na Caatinga (Parque Nacional do Vale do Catimbau, Buíque-PE), em Abril de 2018. Em seguida identificados no herbário do Instituto Agronômico de Pernambuco, onde o seu voucher (IPA 84.039) está depositado.

3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para o preparo dos extratos metanólico e aquoso da *A. colubrina*, os galhos coletados ficaram por um período de sete dias secando a temperatura ambiente e em seguida, foram moídos para um pó, de onde foi possível fazer a extração.

O processo de extração foi realizado misturando-se 10 g dos galhos moídos com 100mL de metanol ou água, solventes responsáveis por fazer a extração metanólica e aquosa, respectivamente, em diferentes erlenmeyers. Foi feita agitação por uma hora em um shaker, onde se formou um sobrenadante que foi filtrado em papel filtro. Este processo foi repetido por três vezes para ambos os solventes.

O extrato metanólico adquirido foi colocado em balão de fundo redondo e submetido à rotaevaporação e o extrato aquoso foi submetido à liofilização. Isto foi realizado com a finalidade de concentrar esses extratos.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

3.3.1 Cromatografia Líquida de Alta Especificidade (CLAE)

Foram pesados 5 mg dos extratos e transferidos para balões volumétricos de 10 mL, sendo solubilizados em etanol 50% (v/v). Por fim, foram filtrados para *vials* utilizando filtros de PVDF (0,45 µm).

Condições cromatográficas: a análise por CLAE foi realizada no sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific), desgaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm para a

detecção. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex[®] equipada com pré-coluna (C₁₈ de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex[®]). As separações foram efetuadas a temperatura de 28 ± 1°C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-10 min, 12,5-25% de B; 10-17 min, 25-40% de B; 17-30 min, 40-75% de B; 30-33 min, 75% de B; 33-38 min, 75-12,5% de B. Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA).

3.4 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

3.4.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas para o estudo cepas sensíveis do *S. aureus*: ATCC 29213 e UFPEDA 02 e isolados clínicos resistentes a antibióticos: UFPEDA 683 (exsudato purulento) e 705 (ferida operatória), fornecidas pelo Departamento de Antibióticos, UFPE, Brasil, mantidas em meio Mueller Hinton (MH) sólido e líquido durante experimentos e estocadas em Glicerol 100% e meio Brain Heart Infusion (BHI) a 4°C.

3.4.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A CMI foi determinada pelo método de microdiluição (CLSI, 2015). As cepas bacterianas estudadas foram repicadas em placas contendo meio MH e colocadas na estufa para crescimento durante 24h. As suspensões bacterianas ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foram inoculadas nas placas de 96 poços já com 160 µL do meio MH caldo e 20 µL dos extratos em diferentes concentrações (0,125-4 mg/mL), seguida de incubação por 24h a 37°C. A taxa de crescimento foi obtida através da leitura em 600nm no espectrofotômetro. A CMI foi determinada como a menor concentração dos extratos capaz de inibir 50% do crescimento bacteriano em comparação com o controle de crescimento (20µL da cepa bacteriana crescida em 180 µL de MH).

3.4.3 Aplicações em modelos *in vivo*

3.4.3.1 Larvas de *Tenebrio molitor* (*T. molitor*)

Larvas de *T. molitor* foram adquiridas de um fornecedor comercial e mantidas em bandejas plásticas em geladeira. Estes indivíduos foram alimentados *ad libitum* com ração composta por farelo de trigo, pedaços de cana e chuchu.

3.4.3.2 *T. molitor* x infecção de *S. aureus*

A ação antimicrobiana dos extratos foi avaliada em um modelo de infecção *in vivo* induzida por *S. aureus* em larvas de *T. molitor*. Dez larvas saudáveis foram selecionadas aleatoriamente e divididas em 3 grupos experimentais ($n = 10/\text{grupo}$). Cada larva foi infectada com 10 μl da suspensão bacteriana ativa ($1,0 \times 10^5$ UFC). Após 2h, as larvas foram tratadas com os extratos na dose de $\frac{1}{2}$ CMI e mantidas a temperatura ambiente. A mortalidade foi observada por contagens até o quinto dia após a infecção.

3.5 ENSAIOS DE VIRULÊNCIA

3.5.1 Ensaio de hemólise bacteriana

A análise da hemólise bacteriana foi realizada de acordo com (LEE et al., 2013). A eficácia da lise das hemácias humanas por cepas de *S. aureus* foi medida com o cultivo destas na presença, e ausência, no caso dos controles, dos extratos em concentração $\frac{1}{2}$ CMI durante 24h em estufa. O sangue utilizado para o experimento foi obtido a partir da coleta em tubo de citrato de voluntário saudável e não fumante.

O tubo coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 6 min. O plasma e a camada leucoplaquetária foram removidos e os eritrócitos restantes foram lavados por três vezes com tampão fosfato-salino e ressuspensos com a mesma solução.

Para a atividade hemolítica, as cepas crescidas anteriormente foram incubadas a 37°C por 1h com agitação de 250 rpm. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min e pipetado em uma placa de 96 poços. A densidade óptica foi medida em um

comprimento de onda de 543 nm a fim de determinar o percentual de lise dos eritrócitos causado pelas bactérias tratadas pelos extratos em comparação com as não tratadas.

3.5.2 Ensaio de produção da estafiloxantina

O ensaio da estafiloxantina foi realizado segundo Lee et al. (2013), com as cepas UFPEDA 02, UFPEDA 683 e UFPEDA 705, que apresentaram CMI mais baixos. As células cultivadas durante 24h em caldo MH foram re-inoculadas em mesmo meio na presença dos extratos testados nas concentrações $\frac{1}{2}$ CMI, $\frac{1}{4}$ CMI e $\frac{1}{8}$ CMI, e incubadas sob agitação de 220 rpm durante 24h a 37 °C. As células (1 mL) foram submetidas a centrifugação (5.000 rpm durante 10 min) e lavadas com 1 mL de PBS. Para a extração do pigmento carotenóide, os *pellets* foram ressuspensos em metanol, aquecidos em banho maria a 55° C por 3 min e centrifugados novamente, sendo repetida essas etapas por 3 vezes. Em seguida, 200 µL do sobrenadante de cada lavagem foi adicionado a uma placa de 96 poços e suas densidades ópticas foram medidas a um comprimento de onda de 465 nm.

3.5.3 Ensaio de resistência ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O ensaio de resistência ao H₂O₂ foi realizado de acordo com Liu et al. (2005). As culturas incubadas *overnight* por 16h em meio MH foram crescidas até a fase intermediária (turbidez de 1 a 600 nm). Em seguida, 0,1 mL de cada cultura foi adicionado a H₂O₂ a uma concentração final de 1,5% e incubados durante 60 min a 250 rpm. A porcentagem de células que sobreviveram aos estresses provocados pelo H₂O₂ foi calculada utilizando o número de UFC/mL restantes após cada estresse provocado dividido pela UFC inicial/mL.

3.6 ENSAIOS ANTIOXIDANTES

3.6.1 Dosagem de compostos fenólicos

O método de dosagem dos compostos fenólicos foi realizado de acordo com a metodologia previamente descrita por Hua-Bin (2007) com algumas modificações. Foram pipetados 20 µL dos extratos ou do ácido gálico (1 mg/mL), utilizado como padrão, em uma placa de 96 poços junto com 100 µL do reagente de Folin em ambiente escuro e após 3 min

adicionou-se 80 µL do Na₂CO₃. O metanol e água foram usados como controle negativo da reação em substituição aos extratos. Após 30 min de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 765 nm.

Os fenóis totais contidos nas amostras foram calculados usando a curva de ácido gálico como referência e os resultados foram expressos em miligrama Equivalente de Ácido Gálico por grama do extrato (mgEAG/g extrato).

3.6.2 Dosagem de flavonoides

Os flavonoides contidos nos extratos foram mensurados através da metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998). O procedimento foi feito em triplicata em uma placa de 96 poços, onde foram pipetados 100 µL dos extratos ou do padrão quercetina (10 a 100 µg/mL) juntamente com 100 µL do reagente. Após uma hora de incubação no escuro, as absorbâncias foram lidas em um comprimento de onda de 420 nm.

Os flavonoides contidos foram estimados usando a curva padrão da quercetina, realizada seguindo a mesma metodologia, e os resultados foram expressos em miligrama Equivalente da Quercetina por grama do extrato (mgEQ/g extrato).

3.6.3 Método de DPPH

O método utilizado foi baseado na metodologia de Blois (1958), utilizando o radical estável DPPH. Para este experimento, primeiro diluiu-se 1 mg do DPPH em 1 mL de metanol para se obter a solução de trabalho com sua absorbância entre 0,600 - 0,700 utilizando-se o comprimento de onda de 517 nm.

Em seguida, 1 mg dos extratos metanólico e aquoso foi diluído em 1 mL dos seus respectivos solventes, dos quais foi feita uma diluição seriada para se obter concentrações de 15,625 µg/mL-500 µg/mL; 40 µL destas concentrações foram adicionadas a 250 µL do reagente DPPH em uma placa de 96 poços. Após 30 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas no mesmo comprimento de onda mencionado anteriormente. O controle corresponde à solução de DPPH sem a amostra e o padrão utilizado foi o ácido gálico.

Calculou-se a porcentagem de atividade de eliminação de radical DPPH pela seguinte fórmula:

$$\text{Eliminação [DPPH] (\%)} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde Abs corresponde a absorbância.

Com os resultados da aplicação da fórmula, foi traçado um gráfico da atividade de eliminação do DPPH contra as diferentes concentrações dos dois extratos e obteve-se a IC₅₀, que denota a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração inicial de radicais DPPH em 50%.

3.6.4 Método de ABTS

O ensaio de eliminação de radicais ABTS foi realizado de acordo com Re et al. (1999) com modificações. Foi preparada uma solução do radical ABTS dissolvendo 7 mM do ABTS em 2,45 mM de persulfato de potássio (K₂S₂O₈). A mistura foi deixada em repouso durante 16 horas (tempo necessário para a formação do radical) no escuro e à temperatura ambiente antes da utilização. Esta solução previamente preparada foi diluída em etanol para se obter uma absorbância de 0,70 ± 0,02 a 734 nm.

Foram misturados 20 µL dos extratos vegetais (1 mg/mL) com a solução de ABTS e deixados em repouso durante 6 min antes de se medir a absorbância a 734 nm contra uma solução controle (solução de trabalho adicionada a metanol e água) e o trolox foi aplicado como padrão. A eliminação dos radicais ABTS foi estimada em porcentagem após o cálculo da inibição dos radicais, calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde Abs corresponde a absorbância.

3.6.5 Método de fosfomolibdênio ou atividade antioxidante total

O método de fosfomolibdênio foi realizado seguindo a metodologia de Prieto et al. (1999) com modificações. Os extratos testados e o ácido ascórbico (C₆H₈O₆), considerada como padrão para o teste, foram utilizados na concentração de 1 mg/mL. Após o preparo das soluções e do reagente, adicionou-se 1 mL da solução de fosfomolibdênio em 100 µL dos extratos, repetindo-se essa ação com o controle (solução de trabalho adicionada a metanol e água) e o ácido ascórbico, em triplicata. Após incubá-los por 90 min a 95°C no banho seco, 200 µL foram colocados em uma placa de 96 poços e a leitura foi feita no comprimento de onda de 695 nm.

A AAT foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{AAT (\%)} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs controle}}{\text{Abs ác. ascórbico} - \text{Abs controle}} \times 100$$

Onde Abs corresponde a absorbância.

3.7 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado de acordo com Oliveira et al. (2012). O sangue utilizado para o experimento foi obtido a partir da coleta em tubo de citrato de voluntário saudável e não fumante.

O tubo coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 6 min. O plasma e a camada leucoplaquetária foram removidos e os eritrócitos restantes foram lavados por três vezes com tampão fosfato-salino e ressuspensos com a mesma solução.

Cada eppendorf recebeu 1,1 mL da suspensão de eritrócitos e 0,4 mL dos extratos em concentrações de 1,0 – 5,0 mg/mL. O controle negativo continha apenas o tampão fosfato-salina e 1,1 mL de suspensão de eritrócitos e o controle positivo recebeu 0,4 mL de Triton X-100.

Após incubação durante 60 min a temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi utilizado para medir a absorbância da hemoglobina liberada em um comprimento de onda de 540nm. O teste foi feito em triplicata. A atividade hemolítica foi expressa em relação à atividade do Triton X-100 e do tampão fosfato-salina e calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Atividade Hemolítica (\%)}: \frac{(\text{abs extrato} - \text{abs controle negativo}) \times 100}{\text{abs controle positivo} - \text{abs controle negativo}}$$

Onde Abs corresponde a absorbância.

4 RESULTADOS

ARTIGO - AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS METANÓLICO E AQUOSO DE GALHOS DA *Anadenanthera Colubrina* (Vell.) BRENAN

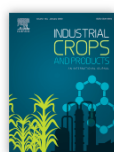
Este artigo será traduzido e submetido a Revista Industrial Crops and Products.

Classificação Qualis A1.



SEARCH MENU

Home > Journals > Industrial Crops and Products



ISSN: 0926-6690

Submit Your Paper

Supports Open Access

View Articles

Guide for Authors

Abstracting/ Indexing

Industrial Crops and Products

An International Journal

Editors-in-Chief: N. Belgacem, M.T. Berti, E. Frollini, O. Koul, R.C. Sun

> View Editorial Board

Industrial Crops and Products is an International Journal publishing academic and industrial research on industrial (defined as **non-food/non-feed**) crops and products. Papers concern both crop-oriented and bio-based materials from crops-oriented research, and should be of interest to an international...

Read more

Most Downloaded Recent Articles Most Cited Open Access Articles

Influence of solvent selection and extraction temperature on yield and composition of lipids extracted from spent coffee grounds - Open access

Ioannis Efthymiopoulos | Paul Hellier | ...

Feedback

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA, CITOTÓXICA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS METANÓLICO E AQUOSO DE GALHOS DA *Anadenanthera Colubrina* (Vell.) BRENAN

Elys Karine Carvalho da Silva^a, Roger Luis da Silva^a, Clovis Macedo Bezerra Filho^b, Alisson Macário de Oliveira^a, Wendee Kennedy Costa^a, Maria Tereza dos Santos Correia^a, Márcia Vanusa da Silva^a

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Laboratório de Química e função de proteínas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

RESUMO

O presente trabalho foi realizado para avaliar biotividades dos extratos de galhos da *Anadenanthera colubrina*, e seu efeito em mecanismos de virulência de cepas de *Staphylococcus aureus*. A coleta foi realizada no Parque Nacional do Vale do Catimbau e os extratos metanólico e aquoso, analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Foram determinados os conteúdos de fenóis e flavonoides totais, e o potencial da atividade antioxidante foi avaliado pelos métodos 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico) (ABTS) e atividade antioxidante total. A avaliação da possível citotoxicidade dos extratos foi feita por atividade hemolítica. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI). Os extratos foram aplicados em larvas infectadas de *Tenebrio molitor* para avaliar a capacidade de tratar infecções bacterianas. Ensaio de virulência, como produção de estafiloxantina, ensaio de hemólise bacteriana e resistência ao peróxido de hidrogênio foram realizados. A análise fitoquímica mostrou que o extrato aquoso apresentou derivados cinâmicos na sua composição e o extrato metanólico derivados cinâmicos e flavonoides. A média do teor de compostos fenólicos foi maior para o extrato aquoso (218,22 mg EAG/g) o que pode estar relacionado com sua alta porcentagem de inibição do radical ABTS e de atividade antioxidante total. Os extratos apresentaram o menor CMI (0,125 mg/mL) quando testados contra a cepa UFPEDA 683 de *Staphylococcus aureus*. Os extratos testados no *T. molitor* foram capazes de aumentar a sobrevivência das larvas infectadas em comparação com as sem tratamento. A cepa UFPEDA 683 diminuiu mais de 50% da produção da estafiloxantina quando tratada com o extrato aquoso (0,0625-0,015 mg/mL). No teste de resistência ao peróxido de hidrogênio a cepa UFPEDA 683 tratada apresentou menor resistência às espécies reativas. Os extratos foram capazes de reduzir a hemólise causada pelo *S. aureus*. E não apresentaram ação hemolítica nas concentrações testadas (1,0-5,0 mg/mL). Com isso, foi concluído que os extratos, destacando-se o aquoso, demonstram potencial antimicrobiano, corroborando com a utilização popular, além da significativa ação antivirulência.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. *Staphylococcus aureus*. Antibacterianos. Fatores de virulência.

1. Introdução

O uso de plantas medicinais e aromáticas no tratamento de doenças infecciosas humanas data de milhares de anos, devido às suas propriedades conservantes e farmacológicas (BROOKS; BROOKS, 2014; NAFIS et al., 2019). No Brasil plantas medicinais apresentam um importante papel, principalmente em comunidades tradicionais. A Caatinga, ecossistema exclusivamente brasileiro e região semiárida localizada no Nordeste, é conhecidamente rica em plantas e animais de diversas espécies, porém, até os dias atuais não é alvo de muitos estudos e têm seu potencial pouco valorizado (VIEIRA et al., 2016). Caracterizada por apresentar altas temperaturas e florestas sazonais secas por causa do regime irregular de chuvas, essa região provoca adaptações fisiológicas únicas nas espécies presentes (SOUZA et al., 2017).

Muitos metabólitos secundários extraídos dessas plantas com potencial farmacológico demonstram possuir importantes atividades biológicas, como por exemplo, ação antimicrobiana (TRENTIN et al., 2011), antifúngica (BIASI-GARBIN et al., 2016), anti-inflamatória, antinociceptiva (DAMASCENA et al., 2014), antiproliferativa e antioxidante (DE MELO et al., 2010). Por causa disso, as comunidades locais utilizam essas plantas para tratamento de diversas doenças. Uma das espécies com uso popular bem estabelecido é a *Anadenanthera colubrina*, popularmente conhecida como angico de caroço, pertencente à família Fabaceae (ALTSCHUL, 1964), a sua casca misturada com cachaça é usada para tratar problemas respiratórios, inflamações e diarreia (MONTEIRO et al., 2006). Já foram descritas na literatura diversas atividades dessa espécie, dentre elas, antinociceptivo e anti-inflamatório, antiproliferativo e antimicrobiano (BIASI-GARBIN et al., 2016; DAMASCENA et al., 2014; DE MELO et al., 2010; TRENTIN et al., 2011).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são alvos de pesquisas devido à sua prevalência como patógenos e ao aumento da resistência a antibióticos (MOLLER; LINDSAY; READ, 2019). *Staphylococcus aureus* é um comensal humano, mas também tem potencial como patógeno oportunista (CONNOLLY et al., 2017). A virulência dessa bactéria Gram-positiva requer uma infinidade de fatores que são intrinsecamente coordenados e regulados (GORDON; LOWY, 2008; POWERS; WARDENBURG, 2014). Além dos fatores de virulência mais "clássicos", como toxinas, essa bactéria também apresenta enzimas, adesinas e outras proteínas que permitem a esse patógeno sobreviver sob condições extremas, se proteger do sistema imunológico do hospedeiro e desenvolver resistência aos antibióticos (CONNOLLY et al., 2017; KONG; NEOH; NATHAN, 2016). Considerando as preocupações atuais sobre a multirresistência bacteriana, as pesquisas para o desenvolvimento de novas terapias

antimicrobianas são importantes. Agentes antivirulência que neutralizem as toxinas de *S. aureus* ou bloqueiem as vias que regulam a produção de toxinas mostram potencial para impedir a aquisição de resistência a antibióticos pelas bactérias (KONG; NEOH; NATHAN, 2016).

Não há estudos publicados sobre a possível ação antivirulência dos extratos de *A. colubrina*. Nesse contexto, diante do potencial biotecnológico da *A. colubrina* e do seu uso tradicional contra infecções bacterianas, justifica-se a realização de testes visando aplicar os conhecimentos popular e científico no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas focando na capacidade de redução da virulência para combater as infecções causadas pela bactéria *S. aureus*.

2. Materiais e métodos

2.1 Material vegetal e preparação dos extratos

Os galhos foram coletados no Parque Nacional do Vale do Catimbau, Buíque- PE, região de Caatinga, em Abril de 2018. Em seguida identificados no herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco, onde o seu voucher (IPA 84.039) está depositado. Os galhos foram moídos em liquidificador até virar pó, de onde foi possível fazer a extração misturando 10 g dos galhos moídos com 100 mL de metanol ou de água, solventes responsáveis por fazer a extração metanólica e aquosa, respectivamente, em diferentes erlenmeyers. Foi feita agitação por uma hora onde se formou um sobrenadante que foi filtrado em papel filtro e o pó residual foi misturado novamente com 100 mL de cada solvente e este processo foi repetido por três vezes para ambos os solventes.

O extrato metanólico adquirido foi colocado em balão de fundo redondo e submetido à rotaevaporação e o extrato aquoso foi submetido à liofilização. Isto foi realizado com a finalidade de concentrar esses extratos.

2.2 Análise fitoquímica por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Foram pesados 5 mg dos extratos e transferidos para balões volumétricos de 10 mL, sendo solubilizados em etanol 50% (v/v). Por fim, foram filtrados para *vials* utilizando filtros de PVDF (0,45 µm). A análise por CLAE foi realizada no sistema de HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA), acoplado a um detector arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific),

desgaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific). O comprimento de onda foi fixado em 270 nm para a detecção. As separações cromatográficas foram obtidas com uma coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex[®] equipada com pré-coluna (C₁₈ de 4 mm x 3,9 m; Phenomenex[®]). As separações foram efetuadas a temperatura de 28 ± 1°C. A fase móvel foi constituída por água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados com ácido trifluoroacético a 0,05%, e fluxo ajustado a 0,8 mL/min. Um programa de gradiente foi aplicado como segue: 0-10 min, 12,5-25% de B; 10-17 min, 25-40% de B; 17-30 min, 40-75% de B; 30-33 min, 75% de B; 33-38 min, 75-12,5% de B. Os dados foram analisados, após a injeção em triplicata, e processados usando o software Chromeleon 6.8 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.3 *Ensaio antioxidantes*

2.3.1 *Dosagem de Fenóis e Flavonoides totais*

A análise dos compostos fenólicos e flavonoides foi realizada de acordo com a metodologia previamente descrita por Hua-Bin (2007) e Woisky e Salatino (1998) com pequenas modificações, respectivamente.

Os extratos (20 µL) foram adicionados em uma placa de 96 poços junto com 100 µL do reagente de Folin Ciocalteu e, em seguida, 80 µL do carbonato de sódio. Após 30 min de incubação no escuro e à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 765 nm. Os fenóis totais contidos nas amostras foram calculados usando a curva do ácido gálico como referência e os resultados foram expressos em miligrama Equivalente de Ácido Gálico por grama do extrato (mgEAG/g extrato).

Os flavonoides foram analisados utilizando 100 µL dos extratos e do reagente em uma placa de 96 poços. Após uma hora de incubação no escuro, as absorbâncias foram lidas em um comprimento de onda de 420 nm. Os flavonóides contidos foram estimados usando a curva padrão da quercetina como referência e os resultados foram expressos em miligrama Equivalente da Quercetina por grama do extrato (mgEQ/g extrato).

2.3.2 *Determinação da capacidade antioxidante*

A capacidade antioxidante dos extratos foi analisada por três metodologias: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (BLOIS, 1958), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfônico)

(ABTS) (RE et al., 1999) e Fosfomolibdênio ou Atividade Antioxidante Total (AAT) (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

No método de DPPH, 1 mg dos extratos foi diluído em 1 mL dos seus respectivos solventes, dos quais foi realizada uma diluição seriada nas concentrações de 15,625 µg/mL - 500 µg/mL. 40 µL destas concentrações foram adicionadas a 250 µL do reagente DPPH em uma placa de 96 poços. Após 30 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 517 nm. Calculou-se a porcentagem de atividade de eliminação de radical DPPH pela seguinte fórmula: $\text{Eliminação DPPH (\%)} = (Ac - Ae)/Ac \times 100$. Com os resultados da aplicação da fórmula, foi traçado um gráfico da atividade de eliminação do DPPH contra as diferentes concentrações dos dois extratos e obteve-se o IC₅₀, que denota a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração inicial de radicais DPPH em 50%.

Para o método de ABTS, foram misturados 20 µL dos extratos com a solução de ABTS e deixados em repouso durante 6 min. Em seguida, foi lida a absorbância a 734 nm. A eliminação dos radicais ABTS foi estimada em porcentagem após o cálculo da inibição dos radicais, feito pela seguinte fórmula: $\text{Inibição do ABTS (\%)} = (Ac - Ae)/Ac \times 100$.

Na AAT, adicionou-se 1 mL da solução de fosfomolibdênio em 100 µL dos extratos. Após incubá-los por 90 min a 95°C no banho seco, 200 µL foram colocados em uma placa de 96 poços e a leitura foi feita no comprimento de onda de 695 nm. A AAT foi expressa em relação ao ácido ascórbico e calculada pela seguinte fórmula: $\text{AAT (\%)} = (Ae - Ac)/(Aaa - Ac) \times 100$.

Onde Ac é a absorbância do controle (branco, sem extrato), Ae é a absorbância dos extratos e Aaa, absorbância do ácido ascórbico para todos os testes.

2.4 Ensaios antimicrobianos

A atividade antimicrobiana dos extratos da *A. colubrina* foi testada contra cepas sensíveis de *Staphylococcus aureus*: ATCC 29213 e UFPEDA 02 e isolados clínicos resistentes a antibióticos: UFPEDA 683 (coletada de exsudato purulento) e 705 (ferida operatória), fornecidas pelo Departamento de Antibióticos, UFPE, mantidas em meio Mueller Hinton (MH) sólido e líquido durante experimentos e estocadas em Glicerol 100% e meio Brain Heart Infusion (BHI) a 4°C. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada pelo método de microdiluição (CLSI, 2015). As suspensões bacterianas ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) foram inoculadas nas placas de 96 poços com 160 µL do meio MH caldo e 20 µL dos extratos em

diferentes concentrações (0,125-4 mg/mL), seguida de incubação por 24h a 37°C. A taxa de crescimento foi obtida através da leitura da absorbância em 600 nm. A CMI foi determinada como a menor concentração dos extratos capaz de inibir 50% do crescimento bacteriano na densidade óptica em comparação com o controle de crescimento (20µL das cepas bacterianas crescidas em 180 µL de MH).

2.4.1 *T. molitor* x infecção de *S. aureus*

A ação antimicrobiana dos extratos foi avaliada em um modelo de infecção *in vivo* induzida por *S. aureus* em larvas de *T. molitor*. Antes da infecção, foi realizada a avaliação da toxicidade dos extratos nas larvas não infectadas para observar a possibilidade de os extratos tratarem as infecções sem causar morte. Neste teste, 10 µL dos extratos na dose de ½ CMI foram injetados nas larvas. Para a infecção, dez larvas saudáveis foram selecionadas aleatoriamente e divididas em 3 grupos experimentais (n = 10/grupo). Cada larva foi infectada com 10 µL da suspensão bacteriana ($1,0 \times 10^5$ UFC) e incubadas a 37°C. Após 2h, as larvas foram tratadas com 10 µL dos extratos na dose de ½ CMI e mantidas a temperatura ambiente. A mortalidade foi observada por contagens até o quinto dia nos dois testes.

2.5 Ensaios de virulência

2.5.1 Produção da estafiloxantina

O ensaio da estafiloxantina foi realizado segundo Lee et al. (2013), com as cepas UFPEDA 02, UFPEDA 683 e UFPEDA 705, que apresentaram CMI mais baixos. Neste trabalho, a inibição do pigmento foi avaliada qualitativamente, as concentrações dos extratos correspondem aos valores de ½ CMI, ¼ CMI e 1/8 CMI para cada cepa. As células cultivadas durante 24h em caldo MH foram re-inoculadas na presença dos extratos testados em suas respectivas concentrações de CMI e incubadas sob agitação de 220 rpm durante 24h a 37° C. As células (1 mL) foram submetidas a centrifugação (5.000 rpm durante 10 min) e lavadas com 1 mL de PBS. Para a extração do pigmento carotenóide, os *pellets* foram ressuspensos em metanol, aquecidos em banho maria a 55° C por 3 min e centrifugados novamente, sendo repetida essas etapas por 3 vezes. Em seguida, 200 µL do sobrenadante de cada lavagem foi adicionado a uma placa de 96 poços e suas absorbâncias foram medidas em comprimento de onda de 465 nm.

2.5.2 Resistência ao Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O ensaio de resistência ao H_2O_2 foi realizado de acordo com Liu et al. (2005). As culturas foram incubadas *overnight* por 16h em meio MH e foram crescidas até a *fase intermediária* (turbidez de 1 a 600 nm). Em seguida, 0,1 mL das culturas tratadas e não tratadas com os extratos em concentração de $\frac{1}{2}$ CMI foram misturadas com H_2O_2 a uma concentração final de 1,5% e incubados durante 60 min a 250 rpm. Em seguida, amostras foram coletadas e cultivadas em MH sólido, após 24h de incubação a 37°C, as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foram contadas e a porcentagem de células que sobreviveram aos estresses provocados pelo H_2O_2 foi calculada utilizando o número de UFC/mL restantes após cada estresse provocado dividido pela UFC inicial/mL.

2.5.3 Hemólise bacteriana

A análise da hemólise bacteriana foi realizada de acordo com (LEE et al., 2013). A eficácia da lise das hemácias humanas por cepas de *S. aureus* foi medida com o cultivo destas na presença, e ausência, no caso dos controles, dos extratos em concentração $\frac{1}{2}$ CMI durante 24h em estufa. O sangue utilizado para o experimento foi obtido a partir da coleta em tubo de citrato de voluntário saudável e não fumante. As cepas (500 mL) foram adicionadas ao sangue e incubadas a 37°C por 1h com agitação de 250 rpm. O sobrenadante foi separado por centrifugação a 3000 rpm durante 10 min e pipetado em uma placa de 96 poços. A densidade óptica foi medida em um comprimento de onda de 543 nm afim de determinar o percentual de lise dos eritrócitos em comparação com as bactérias não tratadas pelos extratos.

2.6 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi analisada de acordo com Oliveira et al. (2012). O sangue utilizado para o experimento foi obtido a partir da coleta em tubo de citrato de voluntário saudável e não fumante. O tubo coletado foi centrifugado a 3000 rpm por 6 min. O plasma e a camada leucoplaquetária foram removidos e os eritrócitos restantes foram lavados por três vezes com tampão fosfato-salino e ressuspensos com a mesma solução. Foram misturados 1,1 mL da suspensão de eritrócitos e 0,4 mL dos extratos em concentrações de 1,0 – 5,0 mg/mL. Após incubação durante 60 min, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes foram utilizados para medir a absorbância da hemoglobina liberada em comprimento de onda de 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa em relação à atividade do Triton X-100 e do tampão

fosfato-salina e calculada pela seguinte fórmula: Atividade Hemolítica (%) = $(A_e - A_b) \times 100 / (A_c - A_b)$. Onde A_e é a absorbância do extrato, A_b é a absorbância do controle negativo (branco, sem extrato) e A_c é a absorbância do controle positivo (Triton X-100).

2.7 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística e a representação gráfica dos dados foram realizadas no GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software). Os dados foram analisados por ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. Resultados e Discussão

3.1 Análise fitoquímica

A impressão digital (*fingerprint*) por CLAE dos extratos aquoso e metanólico estão representados nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. O extrato aquoso evidenciou a presença de três picos com espectros de varredura característicos de derivados cinâmicos, com tempos de retenção de 11,73 min (fig. 2A), 22,20 min (Fig. 2 B) e 23,27 min (Fig. 2 C). Já no extrato metanólico foram identificados mais picos mostrando que ele apresentou um maior número de compostos. No espectro de varredura desta amostra, foram observados três espectros típicos de flavonoides com duas bandas de absorção a 250-290 nm e 340-370 nm, apresentando tempos de retenção de 19,24 min, 25,15 min e 30,52min (Fig. 3A, 3C e 3D), e um espectro típico de derivados cinâmicos com tempo de retenção de 22,21 min (Fig. 3B). A partir dessas análises, os teores dos compostos encontrados foram calculados segundo a equação da reta do padrão de rutina (>94%, Sigma-Aldrich®) e do padrão de ácido clorogênico (>97%, Sigma-Aldrich®). O extrato metanólico apresentou 0,44 g% de flavonoides totais e 0,014 g% de derivados cinâmicos totais e o extrato aquoso mostrou 0,038 g% de derivados cinâmicos totais. Outros estudos onde foram feitas análises fitoquímicas dos extratos de acetato de etila e hidroalcoólico de folhas da *A. colubrina*, indicaram a presença de quercetina, ácido gálico e baixos níveis de catequina e ácido *p*-cumarínico. No extrato de acetato de etila dos frutos, a análise por HPLC mostrou a presença de compostos fenólicos (DE ARAÚJO et al., 2017, 2019; DE SOUZA et al., 2017).

3.2 Ensaios antioxidantes

Os resultados da atividade antioxidante estão presentes na tabela 1. O extrato aquoso apresentou um maior teor de fenóis totais, provavelmente sendo de maioria derivados cinâmicos encontrados na análise por HPLC. Estes polifenóis são muito citados na literatura como princípios ativos com notável ação antioxidante e, por isso, podem ser atribuídos primariamente a alta porcentagem de atividade antioxidante total encontrada no método de fosfomolibdênio e ABTS (MARTINS et al., 2018; TODOROVIC et al., 2017). O extrato metanólico também apresentou fenóis totais na sua composição e um maior teor de flavonoides totais, corroborando com os espectros de varredura dos picos encontrados na análise fitoquímica. Esses flavonoides podem estar relacionados a sua boa atividade no método de ABTS (ZHOU et al., 2019). Os dados mostraram que os dois extratos têm a presença de compostos relacionados com atividades biológicas importantes, por isso, nos métodos realizados, os extratos exibiram potencial antioxidante, como já é esperado para o gênero (DE ARAÚJO et al., 2019; MOTA et al., 2017; SILVA et al., 2011).

Tabela 1 Teor de fenóis totais, flavonoides e atividades antioxidantes (média $\pm$ DP, n=3).

Extratos	Fenóis Totais ^a	Flavonoides ^b	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (%)	Fosfomolibdênio (%)
Aquoso	218,22 $\pm$ 0,55	1,31 $\pm$ 0,04	290,46 $\pm$ 0,08	82,99 $\pm$ 0,01	137,65 $\pm$ 0,02
Metanólico	104,06 $\pm$ 2,99	2,88 $\pm$ 0,01	391,19 $\pm$ 1,02	82,2 $\pm$ 0,51	34,35 $\pm$ 0,01
Controle positivo	-	-	32,97 ^c $\pm$ 0,02	80 ^d $\pm$ 0,63	100 ^e $\pm$ 0,01

a: Teor de fenóis totais expresso como mgEAG/g extrato, b: Teor de flavonóides totais expresso como mgEQ/g extrato; c: Ácido ascórbico; d: Trolox; e: Ácido ascórbico.

3.3 Ensaios antimicrobianos

Os resultados do potencial antimicrobiano dos extratos da *A. colubrina* contra *S. aureus* estão demonstrados na tabela 2. Os dados mostraram que os dois extratos apresentaram forte inibição frente a cepa UFPEDA 683 (CMI = 0,125 mg/mL). Notavelmente, esta cepa é resistente a diversos antibióticos, dentre eles: ampicilina, oxacilina, vancomicina, cefoxitina e ciprofloxacina. Os extratos aquoso e metanólico também exibiram moderado potencial de inibição contra as cepas UFPEDA 02 (CMI = 0,5 e 1 mg/mL, respectivamente) e inibição fraca contra a cepa UFPEDA 705 (CMI = 2 mg/mL).

Tabela 2 Atividade antimicrobiana dos extratos da *A. colubrina* contra isolados de *S. aureus*.

Microrganismos	Extrato aquoso	Extrato metanólico
	CMI (mg/mL)	CMI (mg/mL)
UFPEDA 02	0,5	1
ATCC 29213	> 2	>2
UFPEDA 683	0,125	0,125
UFPEDA 705	2	2

O potencial antimicrobiano observado no presente estudo já foi observado anteriormente em outra pesquisa realizada com extratos de folhas e frutos da *A. colubrina* (DE ARAÚJO et al., 2014). A capacidade de inibição do crescimento bacteriano dos extratos pode estar relacionada ao conteúdo de flavonoides e derivados cinâmicos encontrados, estes polifenóis apresentam atividade antimicrobiana bem documentada na literatura (GUTIÉRREZ-DEL-RÍO; FERNÁNDEZ; LOMBÓ, 2018; VELOZ; ALVEAR; SALAZAR, 2019).

3.4 *Tenebrio molitor* x Infecção por *S. aureus*

A larva de *T. molitor* apresenta sua resposta imune em dois estágios: componentes celulares atuam como meio de reação rápida e a resposta imune por liberação de peptídeos antimicrobianos (AMP), uma característica da defesa imunológica de insetos (MAKAROVA et al., 2016; ZANCHI; JOHNSTON; ROLFF, 2017). Por causa da sua atividade imunológica, essas larvas têm sido amplamente utilizadas como modelo em experimentos envolvendo infecção por microrganismos patogênicos (DOBSON et al., 2014; SEO et al., 2016). Os extratos foram previamente testados em larvas não infectadas e não houve toxicidade. As larvas foram observadas até o quinto dia após a infecção por *S. aureus* e se mostraram susceptíveis a infecção. O tempo de sobrevivência foi maior no caso das larvas infectadas com as cepas UFPEDA 683 após tratamento com os dois extratos ($\frac{1}{2}$ CMI = 62,5 µg/mL), com UFPEDA 705 tratada com extrato metanólico ($\frac{1}{2}$ CMI = 1000 µg/mL) e com UFPEDA 02 tratada com extrato aquoso ($\frac{1}{2}$ CMI = 250 µg/mL), como mostra a Figura 4.

3.5 Ensaios de virulência

S. aureus possui uma vasta gama de fatores de virulência que o permitem infectar qualquer parte do corpo humano e escapar eficientemente do sistema imunológico do hospedeiro. Suas colônias são alaranjadas a douradas e o pigmento carotenoide responsável, chamado estafiloxantina, diferencia essa espécie de outros *Staphylococcus* e cocos Gram-

positivos relacionados (HALL et al., 2017). Lennette et al. (1985) relataram que 90% dos isolados de *S. aureus* de infecções humanas são pigmentados, por isso, a estafiloxantina se tornou alvo de estudos. Neste trabalho, a inibição do pigmento foi avaliada de forma quantitativa. As concentrações dos extratos testadas correspondem aos valores de ½ CMI, ¼ CMI e 1/8 CMI e os dados indicaram que os dois extratos foram capazes de reduzir a produção desse carotenoide (Fig. 5), principalmente pela cepa UFPEDA 683, onde o extrato aquoso, na maior concentração testada (0,0625 mg/mL) resultou em uma redução de cerca de 80%, e nas duas concentrações menores (0,031 e 0,015) a redução foi de aproximadamente 50%.

Foi relatado que cepas produtoras do pigmento possuem capacidade de resistência a espécies reativas de oxigênio produzidas pelas células fagocitárias do organismo hospedeiro, e, por tanto, apresentam capacidade antioxidante (LEEJAE; HASAP; VORAVUTHIKUNCHAI, 2013). Por isso, um experimento para comparar a capacidade de resistência ao peróxido de hidrogênio de células tratadas e não tratadas com os extratos foi realizado. Os resultados mostraram que a diminuição da capacidade de produção da estafiloxantina pela cepa UFPEDA 683 tratada resultou em um aumento da sua susceptibilidade ao H₂O₂ (Fig. 6). Estudos citam que carotenoides no geral, produzidos por outros microrganismos, frutas e vegetais, possuem alto potencial antioxidante por causa da sua capacidade de eliminação de espécies reativas, justificando, dessa forma, a correlação entre a estafiloxantina e a resistência ao H₂O₂ (BETA; HWANG, 2017; HOU; LIN, 2017; ROJAS-GARBANZO et al., 2017).

Além de evitar a imunidade inata do hospedeiro, *S. aureus* produz hemolisinas, dentre elas, a α -hemolisina, uma toxina capaz de formar poros na membrana das hemácias garantindo o crescimento bacteriano. A inibição na produção do pigmento estafiloxantina também está relacionada com a menor capacidade de sobrevivência das células bacterianas em sangue total humano (BADARAU; TRSTENJAK; NAGY, 2017; LEEJAE; HASAP; VORAVUTHIKUNCHAI, 2013). Por isso, foi realizado o ensaio de hemólise bacteriana, onde observou-se que os extratos foram capazes de diminuir a hemólise causada pelas cepas tratadas em comparação com as cepas controles não tratadas (Fig. 7), principalmente o extrato aquoso da *A. colubrina*.

3.6 Atividade hemolítica

Compostos naturais antes de serem aplicados na indústria farmacêutica precisam ser avaliados quanto a sua toxicidade. A atividade hemolítica é uma das análises realizadas para mensurar a citotoxicidade de uma amostra que pode ser resultado de vários mecanismos, dentre

eles, a formação de poros e permeabilização da membrana eritrocitária (DE ARAÚJO et al., 2014; NGOC et al., 2016).

O extrato aquoso apresentou baixa toxicidade mesmo em concentrações maiores que os valores de CMI utilizados para os demais testes do estudo. Na sua maior concentração testada (5 mg/mL) foi calculado apenas 5,9% de hemólise. O extrato metanólico se apresentou seguro para utilização até a concentração de 2 mg/mL, onde a hemólise observada foi de 2,8%, a partir dessa concentração, o extrato indicou hemólise significativa com porcentagem de 22,4%, porém as concentrações mais altas não foram utilizadas para os testes realizados no trabalho.

4. Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que os extratos da *A. colubrina* apresentaram composição diferente de acordo com o líquido extrator utilizado. O extrato aquoso é caracterizado pela predominância de derivados cinâmicos e o extrato metanólico de flavonoides. Os ensaios antioxidantes mostraram que os extratos exibiram potencial para esta atividade. Os extratos também demonstraram inibição contra a maioria das cepas bacterianas testadas e capacidade de aumentar a sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com *S. aureus*. Além disso, cepas de *S. aureus* tratadas com os extratos, principalmente o aquoso, exibiram redução do pigmento estafiloxantina e esse tratamento pode ter causado um aumento na susceptibilidade do patógeno ao H_2O_2 e a diminuição na capacidade de causar hemólise. Os extratos não apresentaram atividade hemolítica nas concentrações importantes para o estudo.

5 CONCLUSÃO

- O extrato aquoso é caracterizado pela predominância de derivados cinâmicos e o extrato metanólico apresentou mais espectros típicos de flavonoides.
- Os ensaios antioxidantes mostraram que os extratos exibiram potencial para esta atividade.
- Os extratos não apresentaram capacidade de hemólise nas concentrações testadas nos demais experimentos do estudo.
- Os extratos demonstraram inibição contra a maioria das cepas bacterianas testadas e capacidade de aumentar a sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com *S. aureus*.
- Cepas de *S. aureus* tratadas com os extratos, principalmente o aquoso, exibiram redução do pigmento estafiloxantina e esse tratamento pode ter causado um aumento na susceptibilidade do patógeno ao H₂O₂ e a diminuição na capacidade de causar hemólise.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. DE F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil Revisão. **Brazilian journal of pharmacognosy**, v. 18, n. March, p. 472–508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. DE H. C. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga. **Acta bot. bras.**, v. 16, n. 3, p. 273–285, 2002.
- ALLEN, R. C. et al. Targeting virulence : can we make evolution-proof drugs? **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 4, p. 300–308, 2014.
- ALMEIDA, L. S. DE et al. Fitossociologia e uso múltiplo de espécies arbóreas em floresta manejada, comunidade Santo Antônio, município de Santarém, estado do Pará. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 2, p. 185–194, 2012.
- ALTSCHUL, S. VON R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University**, v. 193, n. 193, p. 3–65, 1964.
- ANDRADE, A. P. DE; COSTA, R. G.; SANTOS, E. M. Produção animal no semiárido : o desafio de disponibilizar forragem , em quantidade e com qualidade , na estação seca Animal production in the semiarid : the challenge of forage availability , in amount and with quality , during the dry season. **Animal Production**, p. 01–14, 2010.
- APAK, R. et al. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997–1027, 2016.
- ASHOK, P.; LATHIYA, H.; MURUGESAN, S. Manzamine alkaloids as antileishmanial agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 928–936, 2015.
- BADARAU, A.; TRSTENJAK, N.; NAGY, E. Structure and Function of the Two-Component Cytotoxins of *Staphylococcus aureus* – Learnings for Designing Novel Therapeutics. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 966, p. 15–35, 2017.
- BETA, T.; HWANG, T. Influence of heat and moisture treatment on carotenoids, phenolic content, and antioxidant capacity of orange maize flour. **Food Chemistry**, v. 246, p. 58–64, 2017.
- BIASI-GARBIN, R. P. et al. Antifungal potential of plant species from Brazilian caatinga against dermatophytes. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 18–22, 2016.
- BLOIS, M. S. © 1958 Nature Publishing Group. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 1958.
- BOHLMANN, J.; KEELING, C. I. Terpenoid biomaterials. **Plant Journal**, v. 54, n. 4, p. 656–669, 2008.
- BOND, R.; LOEFFLER, A. What’s happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 3, p. 147–154, 2012.

BROOKS, B. D.; BROOKS, A. E. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2014.

CERMAK, R. Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 1, p. 17–35, 2008.

CHEUNG, A. L. et al. Regulation of exoprotein expression in *Staphylococcus aureus* by a locus (sar) distinct from agr. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, n. July, p. 6462–6466, 1992.

CONNOLLY, J. et al. The identification of *Staphylococcus aureus* factors required for pathogenicity and growth in human blood. **Infection and Immunity**, 2017.

CUEVA, C. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 5, p. 372–382, 2010.

DA SILVA, L. C. N. et al. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, n. August 2013, p. 37–41, 2012.

DAMASCENA, N. P. et al. Natural Product Research : Formerly Natural Product Letters Antioxidant and orofacial anti- nociceptive activities of the stem bark aqueous extract of *Anadenanthera colubrina* (Velloso) Brenan (Fabaceae). **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 28, n. 10, p. 37–41, 2014.

DE ALBUQUERQUE, U. . et al. The use of vegetative resources of the caatinga: the case of agreste of the State of Pernambuco [Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil)]. **Interciencia**, v. 27, n. 7, p. 336–348, 2002.

DE ARAÚJO, D. R. C. et al. Comparative analysis of anti-*Staphylococcus aureus* action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 28, p. 2690–2696, 2014.

DE ARAÚJO, D. R. C. et al. Effects of rainfall on the antimicrobial activity and secondary metabolites contents of leaves and fruits of *anadenanthera colubrina* from caatinga area. **Pharmacognosy Journal**, v. 9, n. 4, p. 435–440, 2017.

DE ARAÚJO, D. R. C. et al. Bioguided purification of active compounds from leaves of *anadenanthera colubrina* var. *Cebil* (griseb.) Altschul. **Biomolecules**, v. 9, n. 10, 2019.

DE MELO, J. G. et al. Antiproliferative Activity, Antioxidant Capacity and Tannin Content in Plants of Semi-Arid Northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, p. 8534–8542, 2010.

DE SOUSA ARAÚJO, T. A. et al. 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.

DE SOUZA, V. G. et al. Analytical Method By Hplc-Dad Allows Quantification of Quercetin Marker in Standardized Extract of *Anadenanthera Colubrina* Var. *Cebil*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 8, p. 47, 2017.

DELEO, F. et al. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **National Institutes of Health**, v. 5, n. 3, p. 379–390, 2010.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 5, p. 416–422, 2016.

GANDHI, S. G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y. S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 303–317, 2015.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408–414, 2007.

GHERARDI, G.; DI BONAVENTURA, G.; SAVINI, V. **Staphylococcal Taxonomy**. p. 1-10 Elsevier Inc., 2018.

GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 5, p. 1–16, 2008.

GULUMIAN, M.; YAHAYA, E. S.; STEENKAMP, V. African Herbal Remedies with Antioxidant Activity: A Potential Resource Base for Wound Treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–58, 2018.

GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, I.; FERNÁNDEZ, J.; LOMBÓ, F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids , polyphenols and thiols. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, p. 309–315, 2018.

HALL, J. W. et al. The *Staphylococcus aureus* AirSR two-component system mediates reactive Oxygen Species Resistance via transcriptional regulation of Staphyloxanthin production. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 2, p. 1–12, 2017.

HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.
HAWKEY, P. M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 317, n. 7159, p. 657–60, 1998.

HAY, S. I. et al. Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–3, 2018.

HENNIA, A.; MIGUEL, M.; NEMMICHE, S. Antioxidant Activity of *Myrtus communis* L. and *Myrtus nivellei* Batt. & Trab. Extracts: A Brief Review. **Medicines**, v. 5, n. 3, p. 89, 2018.

HOU, J.; LIN, H. In Vitro Antioxidant , Antihemolytic, and Anticancer Activity of the Carotenoids from Halophilic Archaea. **Current Microbiology**, v. 75, p. 266–271, 2017.

KABERA, J. et al. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and

Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **journal of pharmacy and pharmacology**, v. 2, n. 8, p. 377–392, 2014.

KAPOOR, G. S. S. A. E. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. v. 33, n. 3, p. 300–305, 2017.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 117–140, 1994.

KONG, C.; NEOH, H.; NATHAN, S. Targeting Staphylococcus aureus Toxins : A Potential form of Anti-Virulence Therapy. **toxins**, v. 8, p. 1–21, 2016.

KRAWCZYK, B.; KUR, J. **Molecular Identification and Genotyping of Staphylococci: Genus, Species, Strains, Clones, Lineages, and Interspecies Exchanges**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

KRUGER, M. J. et al. Proanthocyanidins, anthocyanins and cardiovascular diseases. **Food Research International**, v. 59, p. 41–52, 2014.

KURAHASHI, T.; FUJII, J. Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. **Journal of Developmental Biology**, v. 3, n. 2, p. 57–70, 2015.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. Methicillin- resistant Staphylococcus aureus: molecular characterization, evolution, and epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–103, 2018.

LAN, L. et al. Golden pigment production and virulence gene expression are affected by metabolisms in Staphylococcus aureus. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3068–3077, 2010.

LAXMINARAYAN, R. et al. Access to effective antimicrobials: A worldwide challenge. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 168–175, 2016.

LEE, J. et al. Indole and 7-benzyloxyindole attenuate the virulence of Staphylococcus aureus. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 4543–4552, 2013.

LEEJAE, S.; HASAP, L.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Inhibition of staphyloxanthin biosynthesis in Staphylococcus aureus by rhodomycinone, a novel antibiotic candidate. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 421–428, 2013.

LEICACH, S.; CHLUDIL, H. Plant Secondary Metabolites : Structure – Activity Relationships in Human Health Prevention and Treatment of Common Diseases. **Studies in Natural Products Chemistry**1, v. 42, p. 267–304, 2014.

LEUNG, Y. L. Staphylococcus aureus. **Encyclopedia of Toxicology**, v. 379–380, 2014.

LIMA, R. DE F. et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan . **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

- LINDSAY, J. A. Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 2–3, p. 98–103, 2010.
- LIU, G. Y. et al. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 2, p. 209–215, 2005.
- LIVERMORE, D. M. The 2018 Garrod lecture: Preparing for the Black Swans of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 11, p. 2907–2915, 2018.
- MAKAROVA, O. et al. Antimicrobial defence and persistent infection in insects revisited. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 301, n. 20150296, p. 1–6, 2016.
- MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 18, p. 3057–3071, 2010.
- MARTINS, N. O. et al. Antioxidant, anticholinesterase and antifatigue effects of *Trichilia catigua* (catuaba). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 172, p. 1–13, 2018.
- MCGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid Metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1015, 2007.
- MENALE, B. et al. Ethnobotanical investigation on medicinal plants in the Vesuvio National Park (Campania, Southern Italy). **Journal of Ethnopharmacology**, p. 1–10, 2016.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769–4807, 2011.
- MOERMAN, D. E.; ESTABROOK, G. F. Native Americans' choice of species for medicinal use is dependent on plant family: Confirmation with meta-significance analysis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 51–59, 2003.
- MOLLER, A. G.; LINDSAY, J. A.; READ, T. D. Determinants of Phage Host Range in *Staphylococcus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, n. March, 2019.
- MONTEIRO, J. M. et al. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1–2, p. 173–186, 2006.
- MOTA, G. S. et al. Bark anatomy, chemical composition and ethanol-water extract composition of *Anadenanthera peregrina* and *Anadenanthera colubrina*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. 1–14, 2017.
- MUNITA, J. M. et al. HHS Public Access Mechanisms of Antibiotic Resistance. **HHS Public Access**, v. 4, n. 2, p. 1–37, 2016.
- MURTHY, H. N.; LEE, E. J.; PAEK, K. Y. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: Strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 1, p. 1–16, 2014.

- NAFIS, A. et al. Antioxidant activity and evidence for synergism of Cannabis sativa (L .) essential oil with antimicrobial standards. **Industrial Crops & Products**, v. 137, n. March, p. 396–400, 2019.
- NASSAR. The pharmacological Properties Of Terpenoids From Sandoricum Koetjape The Pharmacological Properties Of Terpenoids From Sandoricum Koetjape. **journal Pharmacy**, v. 1, n. 12, p. 1–11, 2010.
- NCUBE, B.; VAN STADEN, J. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12698–12731, 2015.
- NGOC, N. et al. Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogenins. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 1, p. 50–58, 2016.
- O’CONNOR, S. E. Engineering of Secondary Metabolism. **Annual Review of Genetics**, v. 49, n. 1, p. 71–94, 2015.
- O’NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. **AMR Review Paper**, n. May, 2016.
- OLIVEIRA, R. DE. Etnobotânica e plantas medicinais: estratégias de conservação. **REVISTA DE BIOLOGIA E CIÊNCIAS DA TERRA**, v. 10, p. 76–82, 2010.
- POORAN, A. et al. What is the Cost of Diagnosis and Management of Drug Resistant Tuberculosis in South Africa? **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.
- POUWELS, K. B. et al. Association between use of different antibiotics and trimethoprim resistance: Going beyond the obvious crude association. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1700–1707, 2018.
- POWERS, M. E.; WARDENBURG, J. B. Igniting the Fire: Staphylococcus aureus Virulence Factors in the Pathogenesis of Sepsis. **Plos pathogens**, v. 10, n. 2, p. 1–5, 2014.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex : Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 341, p. 337–341, 1999.
- RE, R. et al. Antioxidant Activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 1231–1237, 1999.
- ROJAS-GARBANZO, C. et al. Carotenoid profile, antioxidant capacity and chromoplasts of pink guava (Psidium guajava L. cv. ‘Criolla’) during fruit ripening. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 1–50, 2017.
- ROUX, A. et al. CodY-Mediated Regulation of the Staphylococcus aureus Agr System Integrates Nutritional and Population Density Signals. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 6, p. 1184 –1196, 2014.
- ROY, S. et al. Synthesis, characterisation and antioxidant activity of luteolin-vanadium(II) complex. **Food Chemistry**, v. 173, n. Ii, p. 1172–1178, 2015.

RUFINO, M. S. M.; RICARDO, E. A. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado técnico online**, p. 0–3, 2007.

SANTOS, M. DE O. et al. The conservation of native priority medicinal plants in a caatinga area in Ceará, northeastern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 89, n. 4, p. 2675–2685, 2017.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 215S-217S, 2005.

SHITAN, N. Secondary metabolites in plants: Transport and self-tolerance mechanisms. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 80, n. 7, p. 1283–1293, 2016.

SILVA, D. R. et al. Anadenanthera Colubrina vell Brenan: anti-Candida and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Brazilian Oral Research**, v. 33, n. 0, p. 1–11, 2019.

SILVA, L. C. N. et al. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of Anadenanthera colubrina, Libidibia ferrea and Pityrocarpa moniliformis fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2222–2228, 2011.

SMERIGLIO, A. et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of pharmacology**, v. 174, p. 1244–1262, 2017.

SOUZA, L. I. O. DE et al. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2017.

STACKEBRANDT, E.; WARD-RAINEY, N. L. Actino bacteria. **International Journal of systematic Bacteriology**, v. 47, n. 34, p. 479–491, 1997.

STANKOVIĆ, M. S. TOTAL PHENOLIC CONTENT, FLAVONOID CONCENTRATION AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF Marrubium peregrinum L. EXTRACTS. **Kragujevac J. Sci**, v. 33, n. January 2011, p. 63–72, 2011.

TABARELLI, M. et al. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. **ciencia e cultura**, v. 70, n. 4, p. 25–29, 2018.

THOMSEN, I. P.; LIU, G. Y. Targeting fundamental pathways to disrupt Staphylococcus aureus survival: clinical implications of recent discoveries. **JCI Insight**, v. 3, n. 5, p. 1–15, 2018.

THOPPIL, R. J.; BISHAYEE, A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. **World Journal of Hepatology**, v. 3, n. 9, p. 228–249, 2011.

THORPE, K.; JOSKI, P.; JOHNSTON, K. Antibiotic-Resistant Infection Treatment Costs Have Doubled Since 2002, Now Exceeding \$2 Billion Annually. **Health Affairs**, v. 37, n. 4, p. 662–669, 2018.

TODOROVIC, V. et al. Correlation between Antimicrobial, Antioxidant Activity, and Polyphenols of Alkalized/Nonalkalized Cocoa Powders. **Journal of Food Science**, v. 00, n. 0, p. 1–8, 2017.

TOLSTIKOVA, T. G. et al. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. natural lupane derivatives. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 37–49, 2006.

TRENTIN, D. DA S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 327–335, 2011.

TURNER, N. A. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, 2019.

VAN BELKUM, A. et al. Reclassification of *Staphylococcus aureus* Nasal Carriage Types . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 12, p. 1820–1826, 2009.

VARDHAN, P. V.; SHUKLA, L. I. Gamma irradiation of medicinally important plants and the enhancement of secondary metabolite production. **International Journal of Radiation Biology**, v. 93, n. 9, p. 967–979, 2017.

VELOZ, J. J.; ALVEAR, M.; SALAZAR, L. A. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–7, 2019.

VIEIRA, P. D. B. et al. Caatinga plants: Natural and semi-synthetic compounds potentially active against *Trichomonas vaginalis*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, 2016.

WALLACE, T. C.; SLAVIN, M.; FRANKENFELD, C. L. Systematic review of anthocyanins and markers of cardiovascular disease. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2016.

WANG, G. et al. Regulation of the Phenylpropanoid Pathway: A Mechanism of Selenium Tolerance in Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 18, p. 3626–3635, 2016.

WANG, Z. J. et al. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. **Food and Function**, v. 8, n. 3, p. 915–926, 2017.

WILLIAM, CHEZEM; CLAY, N. K. Regulation of Plant Secondary Metabolism and Associated Specialized Cell Development by MYBs and bHLHs. **Phytochemistry**, v. 131, n. 5, p. 1–40, 2017.

WORTMAN, P. D. The Skin Microflora and Microbial Skin Disease. **Archives of Dermatology**, v. 9, p. 2015, 1994.

YASHIN, A. et al. Antioxidant Activity of Spices and Their Impact on Human Health: A Review. **Antioxidants**, v. 6, n. 3, p. 70, 2017.

ZANCHI, C.; JOHNSTON, P. R.; ROLFF, J. Evolution of defence cocktails: antimicrobial peptide combinations reduce mortality and persistent infection. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 19, p. 5334–5343, 2017.

ZARB, P. et al. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. **Euro Surveill**, v. 17, n. 46, p. 1–16, 2012.

ZHOU, J. et al. Simultaneous Optimization for Ultrasound-Assisted Extraction and Antioxidant Activity of Flavonoids from *Sophora flavescens* Using Response Surface Methodology. **Molecules**, v. 24, n. 112, p. 2–15, 2019.

ZHU, M. et al. Relationship between the composition of flavonoids and flower colors variation in tropical water lily (*Nymphaea*) cultivars. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–11, 2012.

ANEXO

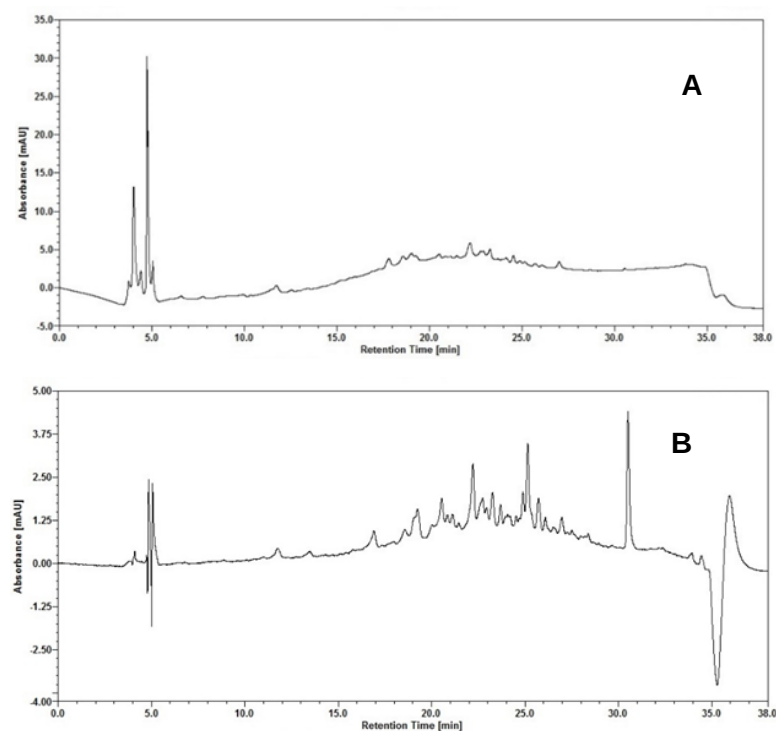
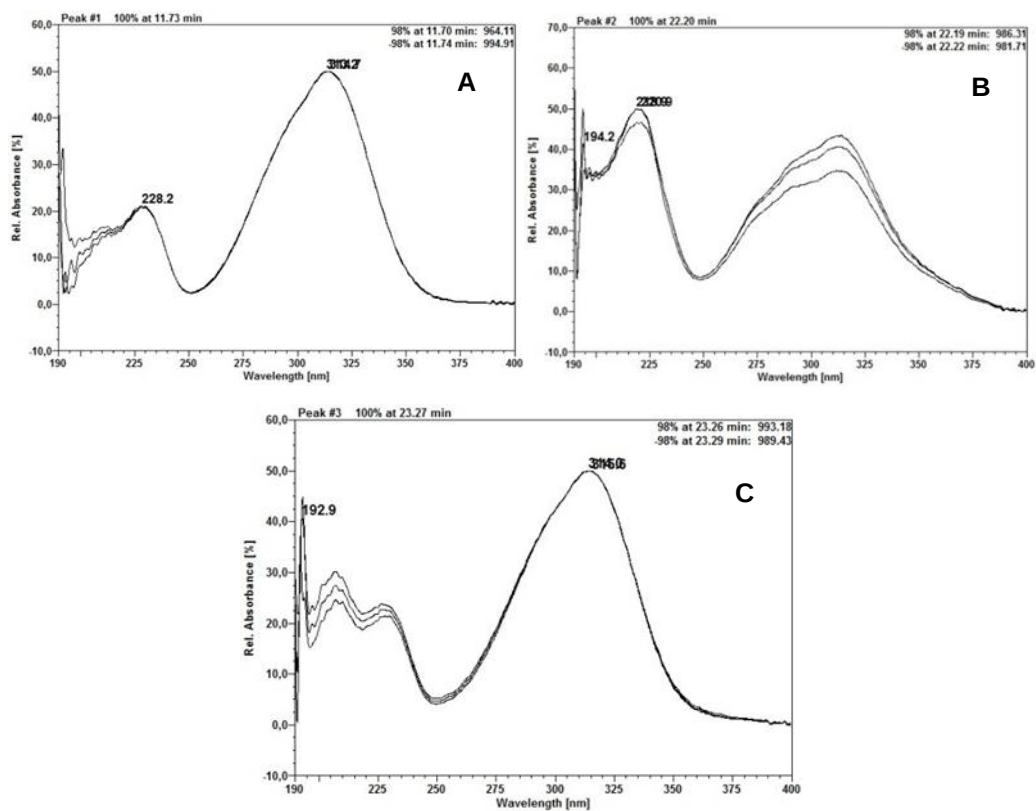
Figura 1 Cromatograma dos extratos da *A. colubrina* em 270 nm. (A) Extrato aquoso. (B) Extrato metanólico.**Figura 2** Espectros de varredura dos picos evidenciados na amostra aquosa. (A) Derivado cinâmico 1. (B) Derivado cinâmico 2. (C) Derivado cinâmico 3.

Figura 3 Espectros de varredura dos picos evidenciados na amostra metanólica. (A) Flavonoide 1. (B) Derivado cinâmico 1. (C) Flavonoide 2. (D) Flavonoide 3.

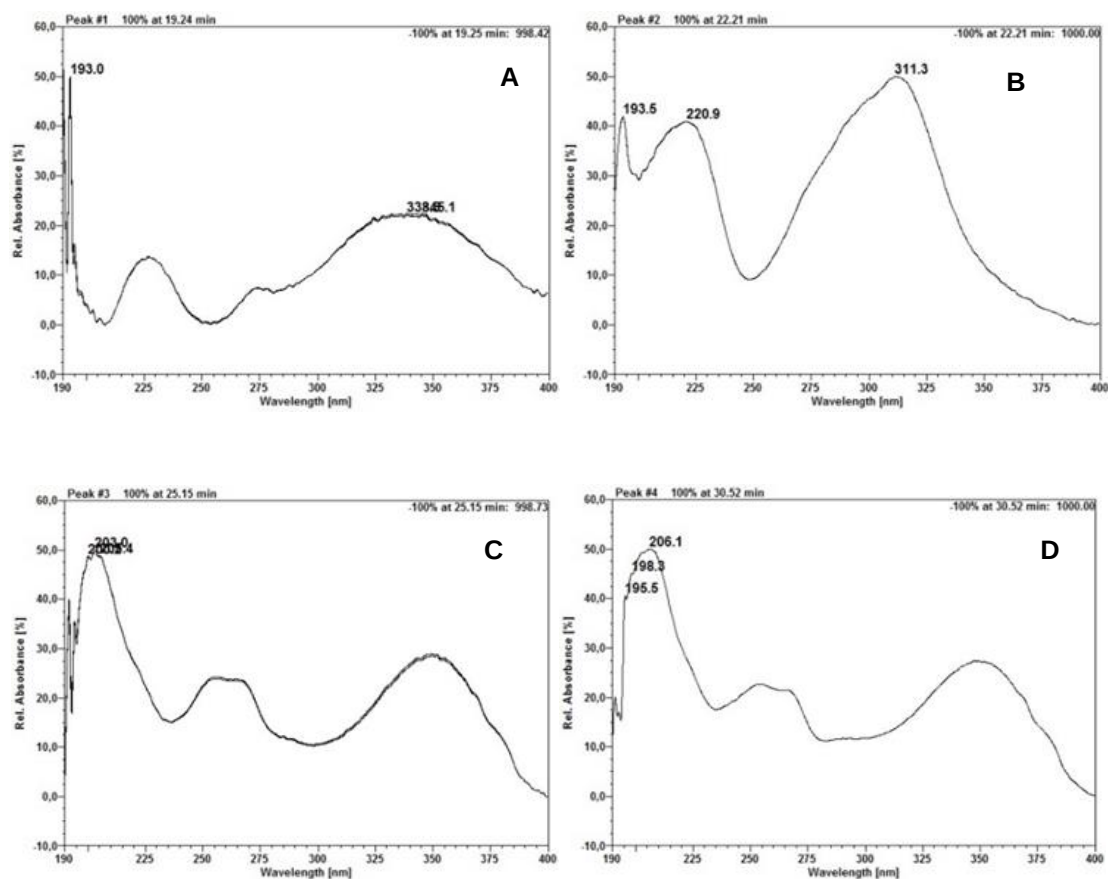


Figura 4 Ensaios de infecção das larvas de *T. molitor* por diferentes cepas de *S. aureus* e concentrações de extratos.

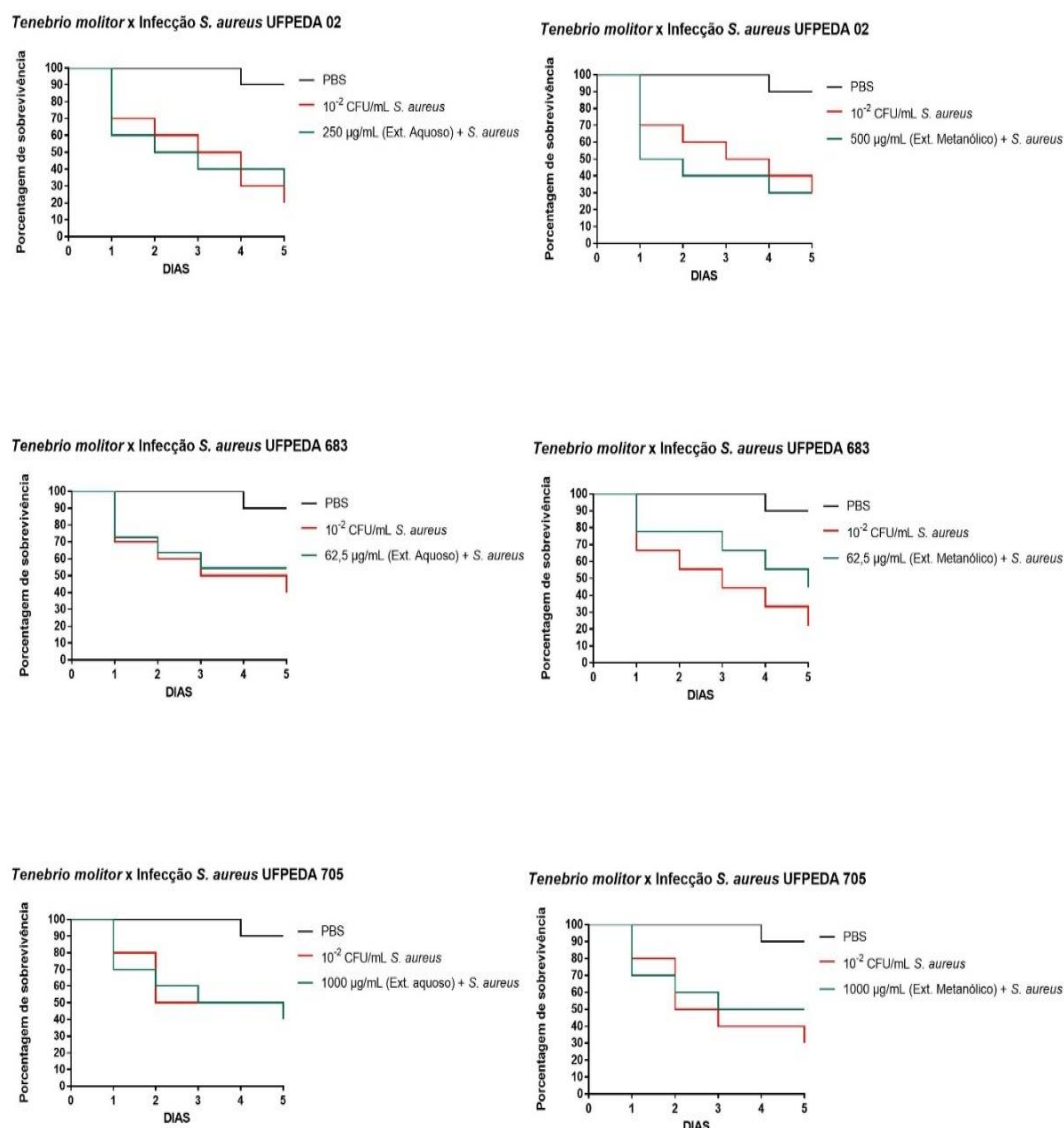
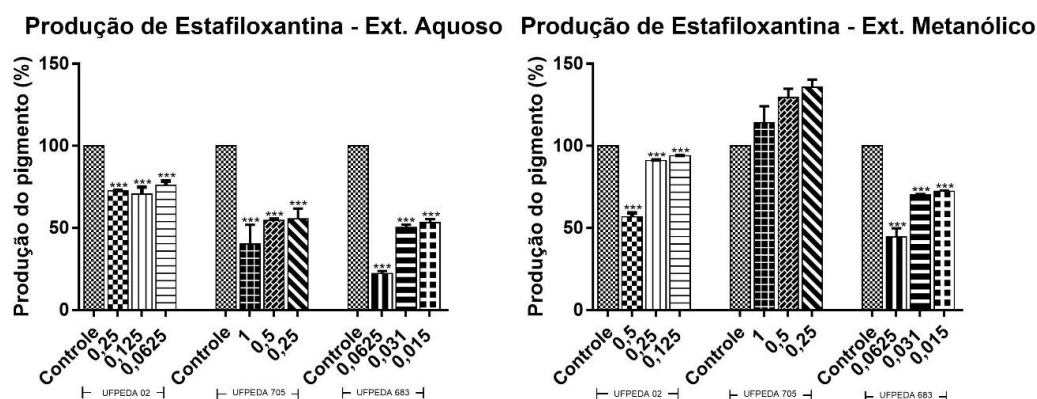


Figura 5 Ensaios de produção do pigmento Estafiloxantina.



*** Indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,001$) comparando os resultados de *S. aureus* sem tratamento e tratados com extratos da *A. colubrina* conforme determinado pelo teste ANOVA

Figura 6 Ensaios de resistência ao Peróxido de Hidrogênio.

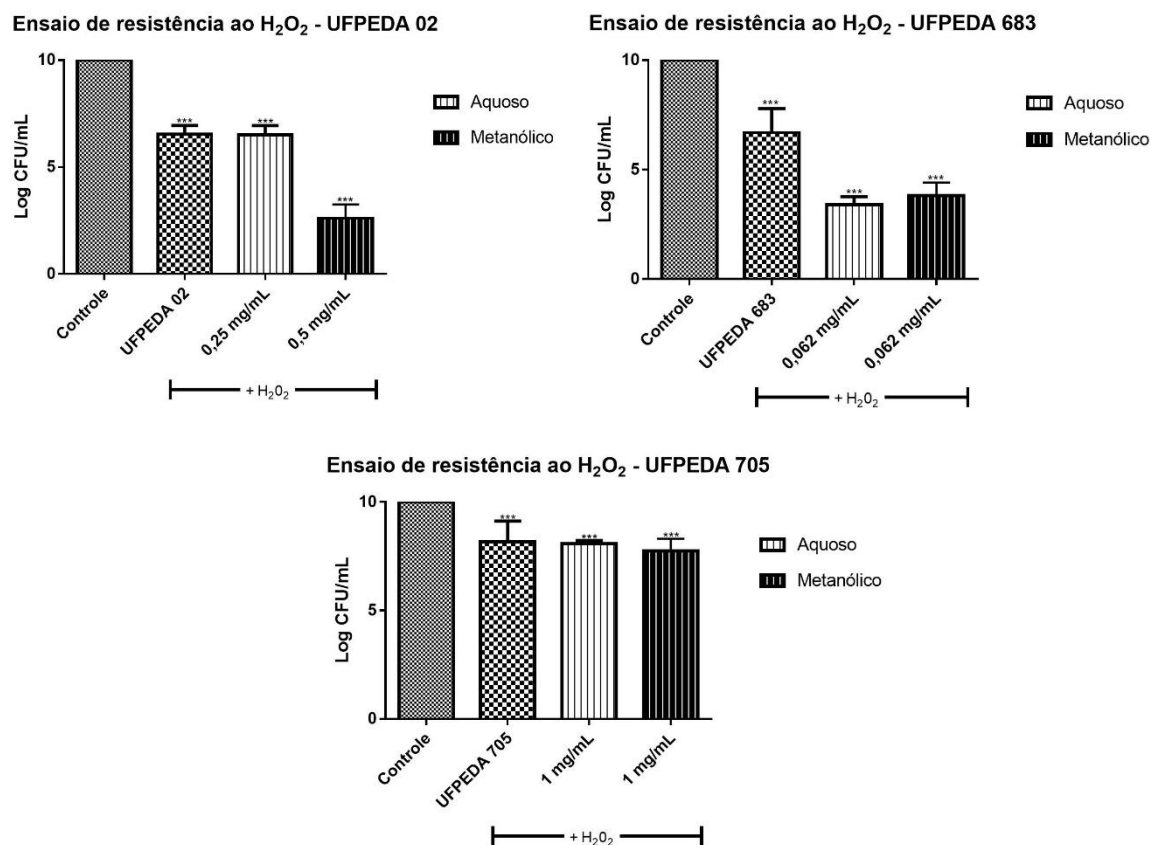


Figura 7 Ensaios de hemólise bacteriana.

