



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I-CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

ITAVIELLY LAYANY FRANÇA FEITOSA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Zornia reticulata* Sm.
(FABACEAE)**

**Campina Grande-PB
2015**

ITAVIELLY LAYANY FRANÇA FEITOSA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Zornia reticulata* Sm.
(FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr^a. Ana Cláudia Dantas de Medeiros
Coorientadora: Prof. Dr^a. Ivana Maria Fechine

Campina Grande–PB
2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

F311a Feitosa, Itavielly Layany França.
Avaliação in vitro da atividade biológica de Zornia Reticulata SM. (Fabaceae) [manuscrito] / Itavielly Layany França Feitosa. - 2015.
84 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros, Departamento de Farmácia".

"Co-Orientação: Profa. Dra. Ivana Maria Fachine, Departamento de Farmácia".

1. Urinana. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Bactérias. 4. Sinergismo. 5. Atividade antioxidante. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

ITAVIELLY LAYANY FRANÇA FEITOSA

**AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Zornia reticulata* Sm.
(FABACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 09/07/2015.

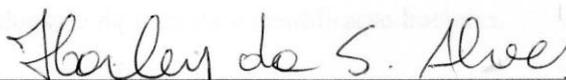
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ana Cláudia Dantas de Medeiros (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Harley da Silva Alves (Examinador Interno)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e coragem de enfrentar mais um desafio, que mesmo quando pensei em fraquejar me ensinou que quando estou fraco é que sou forte, pois o Seu poder se aperfeiçoa em nossas fraquezas.

Aos meus pais, Daniel Aurélio Feitosa e Josefa Norberto de França, pelo grandioso amor e apoio. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, entendendo minhas ausências e me fazendo bastante feliz.

Ao meu cunhado Anderson Bruno e a A minha querida irmã Izabela Dayany, que tanto amo e admiro. Obrigada por tudo, que mesmo distante me acompanha nos momentos tristes e alegres.

Ao meu namorado e amigo, Natan Emanuell, que me acompanhou de perto vendo todas as dificuldades e me ajudou a superá-las.

A minha orientadora Prof. Dr^a. Ana Claudia Medeiros, pela oportunidade de realizar este trabalho, que mesmo com as turbulências e pouco tempo me proporcionou as resoluções para finalizar este estudo.

Ao professor Ivan Coelho Dantas (*in memoriam*), pela planta cedida para meu estudo e por todos os ensinamentos compartilhados tanto como professor, como pessoa, pois sua alegria de viver estampada no seu sorriso será pra sempre lembrado por todos que o conheceu.

Ao professor Bolivar P.G.L. Damasceno, que cedeu o LDCPF para a realização de algumas análises da pesquisa.

Aos professores Drs.(a) por terem aceitado o convite de avaliarem este trabalho, pela atenção, cuidado e importantes contribuições.

Ao CERTBIO-UEPB pelas análises cromatográficas realizadas.

Ao doutorando Licarion Neto e ao LAQA - Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica e Quimiometria da UFPB, coordenado pelo Prof. Dr. Mário César Ugulino de Araújo, que gentilmente realizou as análises cromatográficas.

Ao herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural- CSTR da Universidade Federal de Campina Grande-UFCG pela catalogação da exsicata e identificação botânica.

A um Amigo muito especial, Jôffyli Vamdemberg, que desde a graduação não só me ajuda, mas me guia, estando sempre disponível.

Aos colegas Felipe Hugo, Thiago Pereira, Ravelly Lucena e Francinalva Medeiros que gentilmente dispuseram do seu tempo para ajudar nas análises, dúvidas e correções do trabalho.

Aos colegas do laboratório LABDEM que me ensinaram as técnicas necessárias para inicialização da pesquisa.

Aos colegas do mestrado, em especial Suellen Feitosa, Rayanne Sales, George Luís e Airlla Laana pela disposição em me ajudar.

A todos aqueles, professores, técnicos, amigos, entre tantos que direto ou indiretamente me doaram um pouco dos seus ensinamentos, tempo, material ou qualquer outro tipo de ajuda que colaboraram com minha pesquisa.

RESUMO

O conhecimento sobre propriedades terapêuticas das plantas medicinais impulsiona muitas pesquisas sobre suas atividades farmacológicas utilizadas no tratamento de diversas doenças. A descoberta dos primeiros antimicrobianos revolucionou o tratamento das infecções, porém, concomitantemente com a aplicação clínica das primeiras gerações de antimicrobianos, a resistência microbiana surgiu. Além da atividade antimicrobiana de metabólitos extraídos de plantas, um novo conceito na utilização desses produtos vem sendo estudado, a associação com antimicrobianos convencionais, como agente modificador de resistência. *Zornia reticulata* Sm. (Fabaceae) conhecida como Urinana, é uma planta localizada em quase todo o território brasileiro, é usada na medicina popular no tratamento de infecções, principalmente nos distúrbios urinários. O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* atividade antibacteriana e moduladora da resistência frente à cepas gram positivas e gram negativas, o potencial hemolisante, a atividade antioxidante, realizar a prospecção fitoquímica e caracterizar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) o extrato e frações de *Zornia reticulata*. As folhas foram secas, trituradas e o pó obtido foi submetido à extração com etanol, com posterior remoção do solvente e partição líquido-líquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila. Ensaio de microdiluições foram realizados para verificar a atividade antibacteriana e moduladora e determinação da CIM. Os resultados mostraram que o extrato e frações de *Z. reticulata* tem atividade antimicrobiana frente a maioria das bactérias testadas. O efeito mais representativo frente à bactérias gram positivas foi na associação do cefepime com a fração clorofórmica com redução da CIM de $31,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para $5,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Diante das bactérias gram negativas, a combinação mais significativa foi da gentamicina com a fração acetato de etila, que reduzia a CIM da gentamicina de $5,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente à uma *P. aeruginosa* multirresistente. As interações entre as amostras vegetais e os antibióticos convencionais foram 66% sinérgicas. Observou-se que a fração acetato de etila apresentou maior potencial antioxidante, como também o maior teor de flavonoides e compostos fenólicos e na fração hexânica encontrou-se a maior quantidade de taninos. A fração clorofórmica apresentou menor potencial hemolisante. Os componentes de *Z. reticulata* ainda são desconhecidos, pois, pela análise cromatográfica realizada pode-se afirmar apenas que não é possível identificar a presença dos compostos: ácido caféico, ácido gálico, canferol, catequina, rutina e quercetina. Os dados obtidos sugerem que o extrato e as frações de *Z. reticulata*, podem ser uma alternativa no tratamento de diversas infecções.

Palavras-chave: Urinana; atividade antimicrobiana; bactérias Gram positivas e Gram negativas; sinergismo; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Plants are an important source of biologically active natural products. Knowledge about its therapeutic properties, derived from the popular therapy and usage, motivates much of the research on its pharmacological activities used in the treatment of various infectious diseases mainly. The discovery of the first antibiotic revolutionized the treatment of infections decreasing their mortality. However, concurrently with the clinical application of the first generations of antimicrobials, microbial resistance emerged. In addition to the antimicrobial activity of metabolites extracted from plants, a new concept in the use of these products has been studied, which is the combination of conventional antimicrobial agents, as a resistance modifier agent. *Zornia reticulata* Sm. (Fabaceae) known as Urinana, is a plant located in most parts of Brazil, is used in folk medicine to treat infections, particularly urinary disorders, a fact that suggested his name. The objective of this study was to evaluate the in vitro antibacterial activity and modulating the resistance against the gram positive and gram negative strains, the Hemolyzing potential, antioxidant activity, perform the phytochemical prospecting and characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC) of the extract and fractions of *Z. reticulata*. The sheets were dried, crushed, and the powder obtained was subjected of liquid-liquid partition with ethanol, with subsequent solvent removal and fractionation with hexane, chloroform and ethyl acetate. Microdilution tests were performed to verify the antibacterial and modulatory activity and MIC determination. The results showed that the extract and *Z. reticulata* fractions have antimicrobial activity against most tested strains. The most representative effect against the gram positive bacteria was the combination of cefepime with chloroform fraction with reduced MIC $31.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $5.87 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Front of Gram negative bacteria, the most significant combination was gentamicin the ethyl acetate fraction, which reduced the gentamicin MICs of 5.0 to $0.3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ front of a *P. aeruginosa* multiresistant. The interaction between plant tissue and conventional antibiotics were 66% synergistic. It was observed that the ethyl acetate fraction showed the highest antioxidant activity, as well as the higher content of flavonoids and phenolic compounds, and the hexane fraction was found the highest amount of tannin. The chloroform fraction showed lower potential hemolyzing. The *Z. reticulata* components are still unknown because, by chromatographic analysis can say only that it is not possible to identify the presence of compounds: caffeic acid, gallic acid, kaempferol, catechin, rutin and quercetin. The data obtained suggest that the extract and fractions of *Z. reticulata*, may be an alternative in treatment of various infections. However, we need further testing in toxicity and vivo to better prove these claims.

Keywords: Urinana; antimicrobial activity; Gram positive and Gram negative bacteria; synergism; antioxidant activity.

Lista de Figuras

Figura 1: Mapa da distribuição e localização da prevalência da família Fabaceae em todos os continentes	19
Figura 2: Espécie <i>Zornia reticulata</i>	22
Figura 3: Obtenção do extrato etanólico e frações de <i>Zornia reticulata</i>	42,64
Figura 4: Ensaio microbiológicos realizados	46,65
Figura 5: Cromatogramas sobrepostos de diferentes padrões de polifenóis às amostras de <i>Zornia reticulata</i> : extrato etanólico (A) e frações hexânica (B), clorofórmica (C) e de acetato de etila (D), no comprimento de onda de 270 nm.	49
Figura 6: Modelo de Isoblograma	70
Figura 7: Isoblograma para <i>Zornia reticulata</i> em combinação com o ciprofloxacino, em diferentes concentrações, frente <i>E. coli</i> ATCC 25923	75
Figura 8: Isoblograma para <i>Zornia reticulata</i> em combinação com o ciprofloxacino, em diferentes concentrações, frente <i>E. coli</i> 6	76
Figura 9: Isoblograma para <i>Zornia reticulata</i> em combinação com a gentamicina, em diferentes concentrações, frente <i>P. aeruginosa</i> 1	77
Figura 10: Isoblograma para <i>Zornia reticulata</i> em combinação com a gentamicina, em diferentes concentrações, frente <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	78

Lista de Tabelas

Tabela 1: Microrganismos gram positivos testados e perfil fenotípico de resistências aos antimicrobianos	45
Tabela 2: Prospecção fitoquímica do extrato e frações de <i>Zornia reticulata</i>	48
Tabela 3: Quantificação dos metabólitos secundários no extrato e frações de <i>Zornia reticulata</i>	48
Tabela 4: <i>Screening</i> da atividade antimicrobiana (AA) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e frações de <i>Zornia reticulata</i>	51
Tabela 5: Atividade moduladora do extrato etanólico bruto (EEB) de <i>Zornia reticulata</i> frente às cepas multirresistentes de <i>S. oralis</i> 1 e <i>S. mutans</i> 1	52
Tabela 6: Atividade moduladora da fração hexânica (FHEX) de <i>Zornia reticulata</i> frente às cepas multirresistentes de <i>S. oralis</i> 1 e <i>S. mutans</i> 1	52
Tabela 7: Atividade moduladora da fração clorofórmica (FCLO) de <i>Zornia reticulata</i> frente às cepas multirresistentes de <i>S. oralis</i> 1 e <i>S. mutans</i> 1	53
Tabela 8: Percentual de hemólise do extrato etanólico e frações de <i>Zornia reticulata</i> em hemácias de sangue humano O ⁺	53
Tabela 9: Perfil fenotípico de resistências aos antimicrobianos em cepas de <i>Escherichia coli</i> 67	
Tabela 10: Perfil fenotípico de resistências aos antimicrobianos em cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
Tabela 11: Concentrações das razões usadas na associação de antibióticos convencionais e amostras vegetais de <i>Zornia reticulata</i> na atividade moduladora	69
Tabela 12: Concentração inibitória mínima (CIM) para os antibióticos convencionais testados separadamente	71
Tabela 13: Concentração inibitória mínima (CIM) das amostras vegetais de <i>Zornia reticulata</i> testados separadamente.....	72
Tabela 14: CIM das amostras vegetais (mg.mL ⁻¹) e dos antibióticos convencionais (µg.mL ⁻¹) combinados frente às cepas de bactérias gram negativas	73
Tabela 15: Atividade antioxidante de <i>Zornia reticulata</i>	80

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1	Aspectos botânicos.....	19
3.1.1	<i>Família Fabaceae</i>	19
3.1.2	<i>Gênero Zornia</i>	20
3.1.3	<i>Espécie: Zornia Reticulata Sm.</i>	21
3.2	Aspectos fitoquímicos.....	22
3.3	Aspectos biológicos e farmacológicos.....	24
3.4	Atividade antimicrobiana.....	26
3.5	Atividade moduladora.....	28
3.6	Atividade antioxidante.....	29
	REFERÊNCIAS.....	31
	CAPÍTULO I- Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora <i>in vitro</i> dos extratos e frações de <i>Zornia reticulata</i> Sm. frente à bactérias gram positivas.....	38
	RESUMO.....	39
1.	INTRODUÇÃO.....	39
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1	Obtenção do material vegetal e preparação do extrato e frações de <i>Zornia reticulata</i>	42
2.2	Testes fitoquímicos.....	43
2.2.1	<i>Prospecção fitoquímica</i>	43
2.2.2	<i>Determinação de polifenóis totais</i>	43
2.2.3	<i>Determinação de flavonoides totais</i>	44
2.2.4	<i>Determinação de Taninos condensados</i>	44
2.3	Análise por cromatografia líquida de <i>Z. reticulata</i>	44
2.4	Ensaio microbiológicos.....	45
2.5	Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (CIF).....	46
2.6	Citotoxicidade em hemácias.....	47
2.7	Análise estatística.....	47
3.	RESULTADOS.....	48
3.1	Testes fitoquímicos.....	48
3.2	Análise por cromatografia líquida de <i>Z. reticulata</i>	48
3.3	Avaliação dos ensaios microbiológicos.....	50

3.4	Citotoxicidade em hemácias.....	53
4.	DISCUSSÃO.....	53
5.	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS	57
	CAPÍTULO II- Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antimicrobiana e moduladora de <i>Zornia reticulata</i> Sm. frente à bactérias gram negativas.....	62
	RESUMO.....	63
1.	INTRODUÇÃO.....	63
2.	MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1	Obtenção do material vegetal, extrato e frações de <i>Zornia reticulata</i>	65
2.2	Ensaio microbiológicos	65
2.3	Concentração inibitória fracionada (CIF).....	68
2.4	Construção de isobogramas	69
2.5	Atividade antioxidante por DPPH.....	70
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.	CONCLUSÃO.....	81
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
	REFERÊNCIAS	83

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A relação do homem com a natureza é relatada desde os tempos antigos para diversos fins, desde o uso na alimentação, como também para saúde. Acredita-se que a utilização de plantas medicinais como terapia preventiva e curativa seja tão antiga quanto o próprio ser humano. Durante toda a evolução da humanidade, a população vem construindo e transformando os conhecimentos relacionados às plantas medicinais e repassando para as demais gerações os saberes sobre esses vegetais, pois, mesmo sem conhecer seus constituintes químicos, sabem os efeitos curativos que cada um produz, tornando as informações válidas, que vão se acumulando ao longo dos anos e ajudando a ciência a trazer mais benefícios para a humanidade (VERAS, 2011; ARRAISet al., 2014).

Segundo Albuquerque et al.(2007) existem cerca de 400.000 espécies no mundo e dessas entre 20 e 55 mil são utilizadas na terapêutica medicinal. No geral, apenas 15 a 20% foram avaliadas quanto ao seu potencial farmacêutico, das quais foram obtidas drogas importantes como quinina, reserpina, vimblastina, vincristina, atropina, morfina entre outras (PASSOS, 2007). Já no Brasil, existem mais de 50.000 espécies catalogadas, mais de 10% da fito-diversidade mundial, e cerca da metade pode ter alguma propriedade terapêutica útil, (MARTINS et al., 2003) porém nem 1% foram estudadas farmacologicamente (SCHOPPAN; GASTAL, 2009).

Plantas e outros seres vivos apresentam a capacidade de sintetizar metabólitos secundários. Sendo que 140 mil desses metabólitos são originados principalmente em plantas superiores, que foram isolados e identificados, mas a maioria, ainda não foi avaliada quanto à atividade biológica (SOEJARTO et al., 2005). Os metabólitos possibilitam a produção das mais ricas fontes de novas drogas e, desta maneira, as pesquisas com vegetais contribuem como novas alternativas terapêuticas pelo desenvolvimento de fitoterápicos e/ou fitofármacos inovadores a fim de se obter resultados terapêuticos para muitas doenças (PHILIPPSEN, 2010).

As doenças infecciosas aparecem como as primeiras causas de mortes prematuras no mundo, com estimativa de 15 milhões de óbitos por ano (MACIEL et al., 2002; WHO, 2008). O aumento de patógenos resistentes às drogas, principalmente em ambientes hospitalares vem provocando uma mortalidade absurda, e faz com que pesquisadores de todo o mundo busquem uma nova perspectiva no tratamento de infecções bacterianas (LINS, 2011; MORENO et al., 2013).

Segundo Paula et al. (2008) essas pesquisas devem seguir padrões rigorosos a fim de garantir o uso seguro das plantas, evitando intoxicações ou efeitos colaterais. Por isso os estudos químicos desses vegetais devem ser realizados em paralelo com as investigações das atividades biológicas, farmacológicas e toxicológicas (SILVA, 2013; BARROS, 2008).

Diante a necessidade de se buscar soluções terapêuticas para diversas enfermidades se faz coerente investigar o potencial da *Zornia reticulata*, planta pertencente à família Fabaceae, que é uma das maiores e das mais importantes famílias botânicas (FERNANDES, 2009). A maioria das espécies desta família apresentam metabólitos secundários como flavonoides, rotenóides e isoflavonoides, como as do gênero *Zornia* (SILVA, 2013). Na medicina popular a *Z. reticulata* é conhecida principalmente como Urinana e usada como anti-inflamatória, diurética e para infecções do trato urinário e cálculos renais (DANTAS, 2007). Nesse sentido, esse trabalho contribuirá com o aumento de espécies nativas estudadas, ampliando o conhecimento do gênero em questão, a partir da investigação fitoquímica sobre o potencial antibiótico, modulador, citotóxico e antioxidante desta espécie.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* atividades biológicas do extrato e frações de *Zornia reticulata*.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extrato etanólico bruto e as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila de *Z. reticulata*;
- Realizar a prospecção fitoquímica do extrato e das frações de *Z. reticulata*;
- Contribuir com o estudo fitoquímico do gênero em questão;
- Caracterizar extrato e frações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Realizar *Screening* da atividade antimicrobiana frente bactérias Gram positivas e Gram negativas
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e frações frente às cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) e multirresistentes;
- Avaliar a atividade moduladora das amostras vegetais de *Z. reticulata* com antimicrobianos frente à bactérias Gram positivas e Gram negativas multirresistentes;
- Determinar o potencial hemolisante do extrato e frações de *Zornia reticulata*;
- Investigar o potencial antioxidante pelo método de DPPH (2,2-diphenil-1-picrilhidrazil).

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Aspectos botânicos

3.1.1 Família Fabaceae

A Família Fabaceae representa uma das maiores famílias das angiospermas, possui atualmente 727 gêneros e cerca de 20 mil espécies catalogadas no mundo (LEWIS et al., 2003) (Figura 1). No Brasil, há registros de 210 gêneros e 2.697 espécies, com predominância na maioria dos tipos vegetacionais. A ocorrência é bem significativa, sendo a família com maior prevalência na flora brasileira. As plantas dessa família apresentam-se como ervas, subarbustos, arbustos, árvores de pequeno, médio ou grande porte. Tem em comum um sistema radicular bem desenvolvido, com predominância da raiz principal sobre as ramificações (BARROSO et al., 2007). Podem ser encontradas em diferentes centros de biodiversidade, como habitat, clima, solo, altitude, latitude e topografia variados, desde florestas tropicais a desertos quentes (DUTRA; MESSIAS; GARCIA, 2005). As leguminosas são divididas em três subfamílias e 36 tribos, sendo que a Papilionoideae, a qual pertence o gênero *Zornia* apresenta 28 tribos, 482 gênero e cerca de 13.800 espécies (LEWIS et al., 2005). A Papilionoideae (Faboideae, Fabaceae) é mais encontrada em regiões temperadas e temperado-cálidas (LIMA; FORTUNATO 1998; PEITZ et al., 2003), sendo a maior e mais evoluída subfamília com ampla distribuição geográfica. As espécies desta subfamília são bem reconhecidas por suas flores papilionáceas, além das folhagens alternadas e compostas (PEREZ, 2009).

Figura 1: Mapa da distribuição e localização da prevalência da família Fabaceae em todos os continentes



Fonte: tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=42000184&tab

A família em estudo tem um grande potencial econômico, pois as leguminosas são ricas em óleos e proteínas, e essas plantas fornecem os legumes usados na alimentação humana. Exemplos de alguns gêneros são *Cicer* (grão de bico), *Phaseolus* (feijão), *Vicia* (fava), *Pisum* (ervilha), *Lens* (lentilha), *Arachis* (amendoim) e *Glycine* (soja) (JOLY, 2002). Além dessas leguminosas úteis como alimentos, existem aquelas usadas como fertilizantes, adubo verde (tremoços); tintóreas (índigo, pau-brasil); tânicas (acácia-negra), que aumentam os níveis de nitrogênio do solo, fenômeno importante para fornecer nutriente para as plantas (HEYWOOD, 1996). Existem também as ornamentais usadas devido suas belas flores (guapuruvú, corticeiras), as fornecedoras de celulose (bracatinga); melíferas (alfafa, trevos-de-cheiro); as florestais (canafístula, angico) e as medicinais (pata-de-vaca, erva-de-touro, urinana). Porém deve-se ter cuidado, pois algumas leguminosas podem ser tóxicas por apresentarem princípios nocivos (tremoços, timbó) (MIOTTO; LÜDTKE; OLIVEIRA, 2008).

A família Fabaceae possui como metabólitos secundários na sua maioria, os flavonoides, que são pigmentos que dão cor as flores e frutos dos vegetais, com ampla diversidade estrutural, assim como ampla distribuição no reino vegetal. Nessa família, os tipos mais encontrados são as flavonas, flavonóis, chalconas, flavononas, isoflavonóis e rotenoides. Outras classes de compostos que também são encontradas, mas em menor proporção são as saponinas, taninos, antraquinonas e alcaloides quinozilidínicos e pirrozilidínicos (PASSOS, 2007).

3.1.2 Gênero *Zornia*

O gênero *Zornia* está incluído na subfamília Papilionoideae, tribo Aeschynomeneae, subtribo Poiretiinae. As plantas desse gênero são descritas na área da botânica como perenes, tem hábito arbustivo ou subarbustivo, ramos prostrados ou eretos, flores dispostas em inflorescência espiciforme aos pares e folhas com 2-4 folíolos (SCIAMARELLI; TOZZI, 1996). Em todo o mundo o número de espécies pode chegar a 80, tem distribuição por quase todos os continentes, nas regiões tropicais e subtropicais. São 41 na América, 16 na África, 13 na Oceania e 7 na Ásia (SILVA, 2013). No Brasil são relatadas 36 diferentes tipos de espécie, onde 15 são exclusivas. O gênero se expande por quase todo o território, encontrado no Norte do Brasil até o Sul, sendo que dessas, 21 espécies são encontradas no Nordeste, 20 no Sudeste e 14 no Sul. Segundo Perez (2009) e Cruz (2009) os estados que o gênero prevalece são

Minas Gerais e principalmente Bahia, único estado onde todas as espécies podem ser encontradas.

3.1.3 Espécie: *Zornia Reticulata* Sm.

A *Zornia reticulata* (Figura 2) é um pequeno arbusto que floresce e frutifica o ano todo, cresce a uma altura de até 75cm, é selvagem, perene anual e com haste ereta. Suas folhas medem de 7-12 cm de comprimento e são alternas; as flores verdes, solitárias, pequenas e esbranquiçadas. Frutos pequenos de 2-3 mm de diâmetro, em forma de cápsula comprimida e globosa, raiz larga e pouco ramificada e semente triangular e enrugada (ALVARADO, 2012).

Esta espécie está amplamente distribuída pela América Central e América do Sul. No Brasil encontra-se na Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Pernambuco, Paraíba, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Roraima, Santa Catarina e São Paulo. Ocorre principalmente em regiões de cerrado e campos rupestres. Pode-se observar uma variação morfológica de *Z. reticulata*, que pode ser relativa ao ambiente. Esta plasticidade fenotípica pode estar retratando a habilidade de um organismo modificar sua morfologia em decorrência de sua interação com o ambiente (PEREZ, 2009).

Esta planta é usada na medicina popular, principalmente os caules e as folhas, como anti-inflamatória e para Hepatite-B, mas é mais conhecida por sua propriedade diurética, apesar de nenhuma comprovação científica (SILVA, 2004), usada em infecções do trato urinário e cálculos renais (pedras nos rins), por isso é conhecida popularmente como “urinária”, “urinana”, “carrapicho”, “chanca pedra” e “quebra pedra”(DANTAS, 2007). É pouco relatada na literatura, tanto do ponto de vista dos estudos fitoquímicos como de suas atividades biológicas. O único estudo descrito na literatura com essa espécie foi de Alvarado(2012) que analisou esta planta quanto ao seu potencial antimicrobiano, porém não relatou atividade frente às cepas testadas.

Figura 2: Espécie *Zornia reticulata*



Fonte: Photo CIAT <http://www.tropicalforages.info/>

3.2 Aspectos fitoquímicos

A triagem fitoquímica é um procedimento essencial para bioprospecção das espécies vegetais de interesse farmacológico e/ou toxicológico. Um extrato pode ter sua composição química conhecida através de testes químicos qualitativos rápidos e de baixo custo, sugerindo as possíveis classes de metabólitos secundários de interesse e norteando a verdadeira ação farmacológica que aquele vegetal pode apresentar (BESSA et al., 2013). Os compostos resultantes do metabolismo dos seres vivos são classificados como metabólitos primários (glicídios, protéicos e lipídios), importantes bioquimicamente. E os compostos do metabolismo secundário são os compostos fenólicos, terpênicos, alcaloídicos, glicosídicos, flavonoídicos e vários outros (SILVA, 2012).

A partir de plantas medicinais conceituadas pelo uso popular, pesquisas fitoquímicas são realizadas para monitorá-las e identificar os marcadores químicos dessas espécies vegetais e avaliar se há presença de metabólitos secundários de interesse biológico (SIMÕES et al., 2004; ARRAIS et al., 2014, LEITE, 2009).

A fitoquímica ajudano desempenho de identificação, purificação, isolamento e caracterização de princípios ativos, para posterior estudo dos efeitos farmacológicos de extratos e dos constituintes químicos isolados (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Esta

atuação interdisciplinar é necessária e amplia as buscas de novas drogas (BESSA et al., 2013). Estudos fitoquímicos realizados na espécie *Zornia gibbosa* constataram a presença de metabólitos secundários como oesteroides, triterpenos, flavonoides (SIDDIQUI et al., 1985, 1986). Alguns anos antes, Lopez (1981) havia relatado o isolamento de cumarina em *Zornia diphylla*. Anos depois, Almeida et al. (2004), ao analisar os constituintes químicos das folhas de outra espécie do gênero *Zornia*, ampliou a quimiosistemática na família Fabaceae, pois, conseguiu isolar benzofenonas na espécie *Zornia flemmingioides*, sendo que, até o ano de 2007, conhecia-se apenas outras três espécies que tinha comprovada a presença de benzofenonas em seus constituintes químicos (PASSOS, 2007).

As espécies do gênero *Zornia* só tiveram pesquisas fitoquímicas aprofundadas, com o intuito de identificação de substâncias e não apenas isolamento de classes fitoquímicas, a partir de 2012, ano em que se constatam as primeiras publicações nessa área. Os estudos foram feitos principalmente na espécie *Zornia diphylla*. Leuner e colaboradores (2012) publicaram o isolamento de quatro diferentes tipos de flavonas: 7,4'-diidroxiflavona, 5,7,3'-triidroxiflavona, 7-hidroxi-4'-metoxiflavona e 7- β -D-Glicosil-5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona. Outro estudo feito por Ren et al. (2012), relatou a presença de outras cinco flavonas, 7,4'-dimetoxiflavona, 7-hidroxi-4'-metoxiflavona, 7,3'-diidroxiflavona, 7,8-dihidroxi-4'-metoxiflavona e 7,4'-diidroxiflavona, também nesta espécie.

Estudos recentes foram realizados com a *Zornia brasiliensis*, nas quais foi possível o isolamento de cinco substâncias, identificadas por métodos espectrofotométricos. Como já esperado, as substâncias químicas isoladas eram flavonoides, três da classe das flavonas, que a partir da constituição química foram denominadas de: 7-metoxiflavona, 5-hidroxi-7-metoxiflavona e 5,7-dimetoxiflavona. Além dessas, também foram isoladas uma chalcona, a 2',4'-dihidroxichalcona e um pterocarpano o 3-hidroxi-9-metoxipterocarpano (SILVA, 2013).

Com base nos dados obtidos na literatura, conclui-se que entre os principais componentes químicos encontrados na família Fabaceae, considerando-se principalmente o gênero *Zornia*, estão os derivados flavonoídicos.

Os flavonoides são os representantes do grupo fenólico mais importante, devido a sua função de proteção nos vegetais e seus efeitos terapêuticos nos seres humanos. São bem diversificados, devido ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. Estes compostos protegem os organismos dos danos causados pelos agentes oxidantes (poluição

ambiental, substâncias químicas nos alimentos, etc), pois eles são pigmentos naturais que combatem os raios ultravioletas. Seres humanos não tem a mesma capacidade dos vegetais de sintetizarem essas substâncias e ter essa proteção natural, mas podem obtê-los pela ingestão de frutas, legumes e raízes (TAHARA, 2007).

Os flavonoides foram descobertos pelo Szent-György, que ganhou o Prêmio Nobel de 1937. Denominaram primeiramente essa substância de vitamina P (reguladores de permeabilidade) e vitamina C2 (porque alguns flavonoides tinham propriedades semelhantes à vitamina C). Porém, pouco tempo depois, como não foi possível a comprovação dessa ideia, modificaram o seu nome (MARTINEZ-FLÓREZ et al., 2002). Os flavonoides em sua estrutura química contêm um número fixo de 15 átomos de carbono formando dois anéis e uma ponte de três carbonos entre eles, que compõem o núcleo flavilium. As várias classes de flavonoides diferem no nível de oxidação e substituição no anel central, dando origem a subclasses distintas, tais como: chalconas, flavanonas, flavonas, flavonóis, isoflavonas, flavan-3-ols e antocianidinas (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

Os compostos flavonídicos tem ampla atividades biológicas comprovadas em diversos estudos. Desde a sua descoberta nos anos de 1930, observou-se a presença de algumas propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória, dentre outras (COUTINHO; MUZITANO; COSTA; 2009; CAZAROLLI, et al. 2008).

3.3 Aspectos biológicos e farmacológicos

As plantas são conhecidas por sintetizar produtos químicos, os metabólitos secundários, que perante bactérias e fungos podem ser naturalmente tóxicos (SCHINOR et al., 2007). No uso popular as plantas para fins terapêuticos, precisamente para o tratamento de infecções, são usadas secas para fazer chá tanto na forma de decocção como na de infusão. Para infecções locais, é feito emplastro, em que as folhas verdes são aplicadas diretamente sobre a pele (DANTAS, 2007).

As espécies da família Fabaceae apresentam diversas atividades farmacológicas no uso popular e algumas já comprovadas cientificamente. Essas ervas destacam-se por apresentarem características antibióticas, diuréticas, anti-inflamatórias, analgésicas e anti-infecciosas (SILVA, 2012).

Entre as plantas mais conhecidas e estudadas desta família destacam-se a seguir alguns gêneros e espécies e as suas atividades biológicas comprovadas:

O gênero *Parkia* foi estudado por Fernandes(2009), que comprovou que o extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Parkia platicephala* Benth. e da fração hidroalcoólica obtida a partir do extrato etanólico das folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire tem atividade gastroprotetora contra lesões induzidas por etanol absoluto e etanol acidificado e não apresentaram toxicidade aguda e nem foram letais na dose usada para determinar a DL50.

Outro gênero também de grande relevância da família Fabaceae, destacando-se a subfamília Caesalpinioideae, é o gênero *Bauhinia*, o qual possui mais de 300 espécies e concentra-se nas áreas próximas à linha do equador. Seu nome popular mais tradicional no Brasil é pata-de-vaca. E é usado popularmente para o tratamento de diabetes e infecções (GUPTA, 2008; DIAS; ARRUÁ, 2011). Além desses usos tradicionais a espécie *Bauhinia variegata* é usada como adstringente, tônico, anti-helmíntico, anti-inflamatório, antidiarreico e antiulcerogênico. Cientificamente esta espécie já teve sua atividade antibacteriana comprovada frente cepas de *S. aureus* (POKHREL; ADHIKARI; BARAL, 2002). Já outra espécie do mesmo gênero, a *Bauhinia forficata*, é também muito usada popularmente como analgésica, tônica, digestiva, anti-inflamatória, adstringente, anti-tussígena, expectorante, anti-hipertensiva, diurética, hipocolesterolemizante e para controle de palpitações, enquanto que o uso tópico tem ação adstringente e antisséptica em doenças de pele (GUPTA, 2008). Na literatura existe confirmação de atividade farmacológica da *B. forficata* como hipoglicemiante (COELHO et al., 2004), antibacteriana, fungicida, antioxidante, anticoagulante, antifibrinolítico e antitóxica para veneno de escorpiões (DIAS; ARRUÁ, 2011). Outras espécies do gênero como a *B. kockiana* e *B. pulcherrima* se destacam devido ao potencial antimicrobiano (CHEW et al., 2011).

Finalmente para o gênero *Zornia*, que apesar de incluir espécies de grande importância farmacológica e química, não apresenta muitos estudos relatados na literatura. Batista (2013) avaliou a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Z. brasiliensis*. Os resultados mostraram baixa toxicidade deste extrato frente a eritrócitos de camundongos. Durante todo o experimento de toxicidade aguda não ocorreu morte nem alterações comportamentais nos animais tratados com doses de 2.000 mg/kg. Arunkumar; Ajikumaran e Subramoniam (2012) também avaliaram a toxicidade de uma espécie deste gênero, a *Z. diphylla* que se mostrou promissora *in vitro* e *in vivo* para atividade anticancerígena contra células DLA, sendo desprovida de qualquer toxicidade para

camundongos na avaliação de toxicidade a curto prazo, afirmando ser uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de um medicamento anticancerígeno.

Ainda sobre a *Z. diphylla*, Belcavello et al.(2012)investigaram o potencial citotóxico, aneugênico e mutagênico, *in vivo*, do extrato hidroalcoólico desta planta sobre células meristemáticas de cebola (*Allium cepa* L.) e da medula óssea de ratos Wistar, o qual demonstraram que este extrato possui potenciais efeitos citotóxico e mutagênico.Ainda pesquisaram o efeito anti-hipertensivo desta espécie, que sugere uma resposta hipotensora acompanhando alterações da frequência cardíaca em ratos normotensos e que o tratamento sub-agudo oral reduz os valores de pressão arterial média e frequência cardíaca de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.

Pereira et al. (2005)detectaram atividade antimicrobiana da *Z. flemmingioides*frente *C.albicans*, *C. neoformans* e *S.aureus* em derivados isolados de benzofenonas. Em 2007, Passos testou o extrato metanólico também da *Z. flemmingioides*, para as cepas de *Salmonellacholetraesuis*, *Pseudomonasaeruginosa*, *Proteusmirabilis*, *MSSA*, *MRSA*, *Candida albicans*, *Cryptococcusneoformans*, *Aspergillusfumigatus*, *Paspalumnotatum*, *Cladosporumherbarum*, *Microsporumcanis* e *Trichophytonrubrum*detectando atividade somente para *cepas de Staphylococcus*.Alvarado, 2012 testou a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Zornia reticulata* frente às cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *K.pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *C. Albicans*, porém não reportou atividade. Outra atividade farmacológica pesquisada nesse gênero foi antinociceptiva, que Silva(2013) afirma ter observado quando analisou o composto 7-metoxiflavona isolado da *Z. brasiliensis*.

3.4 Atividade antimicrobiana

Com o surgimento dos antibióticos e quimioterápicos foi possível à cura de milhares de pessoas, pois eles contribuíram de modo acentuado e determinante no controle das doenças infecciosas. No entanto, pouco tempo após esta descoberta e com o início do uso clínico dos primeiros antimicrobianos, registros dos primeiros casos de resistência bacteriana adquirida foram relatados (SILVA, 2010),tornando essa situação um grande desafio terapêutico e um problema de saúde pública, que vem preocupando as autoridades,porque, aumenta em muito os gastos na saúde tanto na parte de medicamentos, como no tempo e na gravidade de internação (WHO, 2012).

Essa rápida resistência que os microrganismos adquirem é principalmente devido ao uso indiscriminado dos antibióticos na forma de: doses subterapêuticas, inefetividade da droga selecionada, esquemas terapêuticos curtos, baixa penetração no local de infecção, conhecimento inadequado das características de farmacocinética e farmacodinâmica dos fármacos para escolha terapêutica, além de fatores relacionados ao paciente, como idade, status imunitário e não adesão ao tratamento (KARAMAN et al., 2003).

O período compreendido entre 1960 e 1970, foram os anos em que houve um grande uso indiscriminado de penicilinas semissintéticas resistentes as penicilinas e de cefalosporinas, o qual favoreceu o surgimento de cepas de *E.coli* resistentes a ampicilina, como também a resistência de *S.aureus* a meticilina. Com esse fato a década seguinte enfrentou um grande obstáculo, as bactérias gram negativas resistentes. Para agravar ainda mais, no novo milênio algumas bactérias gram positivas também passaram a ser resistentes ocupando lugar de destaque (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

A resistência microbiana às drogas pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A primeira faz parte da herança genética do microrganismo, das características naturais e fenotípicas, sendo mecanismos previsíveis, que ao conhecer o agente etiológico da infecção e os mecanismos de ação dos fármacos disponíveis clinicamente é possível evitá-los. Já a resistência adquirida ocorre em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão, manifestada na célula bacteriana e ausente em suas células genitoras, provocando alterações estruturais ou bioquímicas na célula bacteriana, tornando-a um exemplar muito resistente, que normalmente não perde viabilidade e patogenicidade (LINS, 2011). Então, vários são os mecanismos através dos quais os microrganismos se tornam resistentes às drogas, entre eles a produção de enzimas inativadoras com capacidade de promover alterações estruturais na molécula da droga tornando-a inativa, como as beta-lactamases. Alterações na permeabilidade da membrana bacteriana, deixando de produzir canais em que as drogas tinham sua entrada facilitada (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008), e um dos mais relatados, o fenômeno da bomba de efluxo existente em muitos organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários. Essa bomba é composta por proteínas de membrana que tem a capacidade de expulsar o fármaco, quando todos os outros mecanismos que impedem sua entrada falham, então a bomba exporta variedades de drogas de dentro para fora da célula microbiana, o que reduz a concentração intracelular e, portanto, redução da sensibilidade. A droga não atinge concentrações intracelulares suficientes para promover sua ação, pois quase instantaneamente é bombeada para fora da bactéria (GIBBONS, 2004).

Como citado, toda essa problemática atual de resistência às drogas tem origem em diversos fatores, incluindo a seleção de mutantes resistentes por exposição a agentes antimicrobianos, transferência de determinantes genéticos de resistência entre cepas bacterianas e disseminação clonal de cepas resistentes entre pacientes hospitalizados e entre instituições hospitalares, causando muitos problemas clínicos e aumentando o número de mortes por doenças infecciosas, fato que preocupa toda a humanidade e que estimula pesquisas de todas as formas, principalmente as relacionadas com plantas medicinais, na busca de novos produtos para combater cepas resistentes ou também substâncias que auxiliem a potencializar os medicamentos já existentes. Logo, essas pesquisas com o intuito de desenvolver novos agentes antimicrobianos se tornam cada vez mais urgente (PERES et al., 2009; LEE et al., 2008; SANTOS et al., 2010; MOREIRA, 2012).

3.5 Atividade moduladora

Interações medicamentosas entre fármacos convencionais podem ser fatais e, portanto, são levadas muito a sério, sendo extremamente estudadas. Porém, interações entre essas preparações farmacêuticas e produtos naturais ficam esquecidas, não existindo a mesma preocupação para investigá-las, combinação esta que é amplamente usada até por populações inteiras. Além de possíveis efeitos tóxicos que podem ser encontradas nessas interações, esta análise merece ainda mais destaque, pois por outro lado interações entre plantas e medicamentos convencionais, principalmente antibióticos, podem apresentar efeito sinérgico, em que um composto melhora a atividade do outro (HÜBSCH, 2014).

Quando substâncias combinadas têm a capacidade de modificar ou mesmo reverter de forma positiva a ação do outro, significa que a mesma apresenta um efeito sinérgico ou um efeito cumulativo, ou seja, que o efeito na interação é muito maior do que a soma do efeito de cada um individualmente, produzido por uma interação entre dois agentes diferentes (GURIB-FAKIM, 2006). A sinergia pode resultar num aumento da eficácia, toxicidade reduzida, diminuição de efeitos adversos, biodisponibilidade aumentada, diminuição de dose necessária (BIAVATTI, 2009).

Em relação aos antimicrobianos, há vários relatos que produtos naturais de origem vegetal (extratos e fitoconstituintes isolados), por conter uma diversidade enorme de micromoléculas especializadas e, conseqüentemente, alta probabilidade de interações entre elas, podem alterar a susceptibilidade microbiana de outras drogas, podendo diminuir a concentração necessária daquele fármaco ou reverter seu poder inibitório contra certos

microrganismos. Isso porque os vegetais apresentam uma baixa possibilidade de proporcionar resistência microbiana, já que são misturas complexas, dificultando assim adaptabilidade desses patógenos (COUTINHO et al., 2008).

Uma nova estratégia para o tratamento de doenças infecciosas surge a partir da compreensão molecular dos mecanismos de sinergia e da confirmação do sinergismo entre produtos naturais e antimicrobianos (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008). Quando esses produtos naturais interferem de forma negativa, denomina-se o efeito antagônico, que ocorre quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente ao produto natural (ANGÉLICO, 2011). Estudos científicos com extratos e frações de diversas plantas têm sido relatados, além de suas propriedades antibacterianas, a capacidade de interferir na atividade antibiótica, demonstrando um efeito sinérgico ou antagônico (COUTINHO et al., 2008). Assim sendo, o estudo da sinergia é uma área emergente. Combinado com novas ferramentas de tecnologia podem controlar os mecanismos de ação dos extratos naturais ou agentes sintéticos, permitindo a criação e a corroboração de terapias médicas diferenciadas, aumentando a qualidade dos tratamentos de saúde existentes (BIAVATTI, 2009).

3.6 Atividade antioxidante

Os seres humanos através de atividades metabólicas normais produzem constantemente radicais livres. São moléculas ou átomos que possuem elétrons de valência desemparelhados, tornando-os assim com alta capacidade de reação com outras moléculas, e isso pode originar processos fisiopatológicos. Doenças conhecidas como aterosclerose, diabetes, inflamação, doenças hepáticas, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, vários tipos de câncer, entre outras desordens neurológicas e não-patológicas, sendo a mais comum o envelhecimento (SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Fisiologicamente existem substâncias que combatem os radicais livres, como os antioxidantes, que impedem ou diminuem a capacidade de reação dessas moléculas tão reativas. Existem antioxidantes sintéticos muito utilizados na indústria alimentícia como o BHT, BHA, GP, TBHQ, além dos naturais tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonoides) (SOUSA et al., 2007). Houve uma grande ascensão na procura de substâncias naturais com poder antioxidante, pois, há evidências de que alguns compostos antioxidantes sintéticos largamente utilizados na

indústria podem promover o desenvolvimento de células tumorais (SACCHETTI et al., 2005; TAN; LIM, 2015).

A avaliação da atividade antioxidante tem sido uma questão importante considerando seus benefícios sobre a saúde humana. Estudos recentes apontam a utilização de plantas na forma de sucos ou chás como fontes de agentes antioxidantes naturais. Apresentam baixo risco podendo ser utilizado no auxílio do tratamento de doenças, prevenção do envelhecimento e também em casos de hepatotoxicidade aguda, causado por alguns fármacos, como o paracetamol (Souza et al., 2014). Por isso muitos estudos epidemiológicos são realizados para constatar que a ingestão desses produtos está realmente garantindo a prevenção de várias doenças crônicas. Estas propriedades positivas dos produtos vegetais, têm sido atribuídas, em parte, aos componentes que possuem capacidades antioxidantes. Esses antioxidantes naturais obtidos a partir de recursos botânicos acabaram por ser uma alternativa interessante aos antioxidantes sintéticos.

As plantas com maior capacidade antioxidante são aquelas que têm maior teor de compostos fenólicos, como os flavonoides, isoflavonoides, taninos, lignanas, xantonas e outros. Essa relação se dá em função da estrutura, as quais têm recebido grande interesse na química medicinal e pesquisa de produtos naturais para suas altas propriedades antioxidantes (RAZAVI et al., 2008). Esses metabólitos secundários são encontrados em diversas plantas com significativa atividade antioxidante, como no extrato de sementes de cacau (*Theobroma cacao* L.), onde estão presentes as proantocianidinas. No extrato metanólico das folhas de 300 plantas medicinais chinesas, encontraram 56 espécies, ricas em taninos e flavonoides, com grande capacidade de seqüestro de radicais livres. Outros estudos realizados de substâncias isoladas de *Dioclea violacea* e *Erythroxylum nummularia*, como a epicatequina e quercetina da classe dos flavanoides, constatam que essas substâncias demonstraram maior atividade, superando o padrão utilizado o BHT (ANGÉLICO, 2011). Não existindo nenhum estudo sobre atividade antioxidante nas espécies do gênero *Zornia*.

REFERÊNCIAS

- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**. New York, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, p. 678-689, 2006.
- ALBUQUERQUE, I. L.; ALVES, L. A.; LEMOS, T. L. G.; MONTE, F. J. Q.; BRAZFILHO, R. Ácido canárico (3,4 – seco derivado do lupano) em propólis do Ceará. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 828-831, 2007.
- ALMEIDA, L. C. B.; PEREIRA, R. M. S.; GUEDES, M. L. S.; MARTINS, D. Benzofenonas preniladas de *Zornia flemmingioides* (Leguminosae). In: 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- SBQ, 2004. Anais da 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004.
- ALVARADO, A. **Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *zornia reticulata* y *cestrun sendtherianum*. Por el método de difusión en agar**. 2012. 55f. Tese (Doutorado em Laboratorio Clínico) Área da saúde humana, Universidade Nacional de Loja, Loja, 2012.
- ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *Croton heliotropiifolius kunte* e *Croton blanchetianus baill***. 2011. 85f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal De Campina Grande-UFCG, 2011.
- ARRAIS, L. G.; LYRA, H. F. S.; BATISTA, D. C. A.; COUTINHO, F. N.; SARAIVA, A. M.; PEREIRA, R. C. A.; PISCIOTTANO, M. N. C.; XAVIER, H. S.; MELO, S. J. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos da raiz, caule e folhas de *Croton pulegioides Baill.* (Zabelê) ARRAIS, L.G.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. Campinas, v.16, n.2, supl. I, p.316-322, 2014.
- ARUNKUMAR, R.; AJIKUMARAN, S. N.; SUBRAMONIAM, A. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**. v. 3, n. 3, 233-241, 2012.
- BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown**. 2008. 162f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.
- BARROSO, G. M; PEIXOTO A. L.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; GUIMARÃES, E. F.; LIMA, H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Minas Gerais: Editora UFV, v. 1, 2. ed. 2007.

BATISTA, T. M. **Avaliação da toxicidade in vitro e in vivo do extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* vog. (fabaceae).** Universidade Federal da Paraíba. 2013, 36f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Curso de Farmácia) Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

BELCAVELLO, L. et al. Cytotoxicity and DNA damages induced by the *Zornia diphylla* extract, a medicinal plant. **Natureza on line**, v. 10, n, 3 p.140-145, 2012.

BESSA, N. G. F; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U; QUIRINO, M. S; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v.15, n.4, supl.1, 2013.

BIAVATTI, M. W. Synergy: An old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, p. 371 – 378, 2009.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. Mini-Rev. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 8, p. 1429, 2008

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; GOH, J. K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 12, 2011.

COELHO, S., G.; HAAS, A.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; Falcão-Silva, V.S.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy** (Basel), v. 54, p. 328-330, 2008.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**. v. 1, n. 3, p. 241-256, Jun., 2009.

CRUZ, M. A. Pesquisadora do IB descobre três novas espécies de *Zornia*. **Jornal da Unicamp**. nº 446, p. 9, 2 a 8 de novembro 2009.

DANTAS, I. C. **O raizeiro**. Campina Grande: EDUEP, 2007.

DIAS, D. A. I.; ARRUÁ, R. D. L. Catálogo Ilustrado de 80 Plantas Mediciniais do Paraguay. Faculdade de Ciências Químicas - UNA & Agência de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 2011.

DUTRA, V. F.; MESSIAS, M. C. T. B.; GARCIA, F. C. P. Papilionideae (leguminosae) nos campos ferruginosos do parque estadual de Itacolomi, Minas Gerais, Brasil: florística e fenologia. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 493-504, 2005.

FERNANDES, H. B. **Investigação da atividade gastroprotetora do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala benth.* E da fração hidroalcoólica extraídas das folhas de *cenostigma macrophyllum tul.* Var. *Acuminata teles freire* (leguminosae) em roedores**. 2009. 92f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Programa De Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal Do Piauí, Teresina, 2009.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**. v. 21, p. 263 – 277, 2004.

GUPTA, P. M. Plantas medicinales iberoamericanas. Colombia, v.158, p. 1003, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**. v. 27, p. 91-93. Ago. 2006.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytotherapy**, v.15, p. 639– 652, 2008.

HEYWOOD, V. H. Flowering Plants of the world. London: BT Bastford, 1996.

HÜBSCH, Z. **Antimicrobial efficacy and toxicity profiles of conventional antimicrobial agents in combination with commercially relevant southern African medicinal plants**. 2014. 198f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade de Witwatersrand, Johannesburg, 2014.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal. 13.ed. São Paulo: Editora Nacional, 2002.

KARAMAN, I.; SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖGÜTÇÜ, H.; SNGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal Ethnopharmacology**. v. 85, p. 231-235, 2003.

LEE, J. H.; YANG, H. Y.; LEE, H. S.; HONG, S. K. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Cones of *Pinus koraiensis*. **Journal Microbiology and Biotechnology**. v. 18, p. 497 – 502, 2008.

LEITE, J. P. V. Química dos produtos naturais: Uma abordagem Biossintética. In: Leite, J.P.V. Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009, 328p.

LEUNER, O.; HAVLIK, J.; PROKUDINA, J. H. E.; NOVY, P.; KOKOSKA, L. Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 92, n. 15, 2012.

LEWIS, G. P.; SCHIRE, B. D. Leguminosae or fabaceae? In; KLTGAARD, B. B.; BRUNEAU, A. (ed.). Advances in legume systematic. **Kew: Royal Botanic Gardens**, v. 10, p. 1-3, 2003.

LEWIS, G., SCHIRE, B., MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. **Kew Royal Botanic Gardens**, 2005.

LIMA, H.C; FORTUNATO, R.H. 1998. Avances en Fabáceas: introducción. In: Congreso Latinoamericano de Botánica, 6, 1994. Mar del Plata. Proceedings of the VI Congreso Latinoamericano de Botánica. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, p.101-102, 1998.

LINS, M. O. **Atividade antimicrobiana e sinérgica de metabólitos de rutaceae**. 2011, 83f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

LOPEZ, J.A. Isolation of coumarin in *Zornia diphylla* L. **Ingenieria y Ciencia Quimica**. v.5, n.3, p.96, 1981.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GGRYNBERG, N. F.; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**. v. 25, p. 429 – 438, 2002.

MARTINEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Loz flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutición hospitalaria**.v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MARTINS, E. R. **Plantas medicinais: efeitos do meio na produção de fármacos**. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitotecnia, 2003.

MIOTTO, S. T. S.; LÜDTKE, R.; OLIVEIRA, M. L. A. A. A família Leguminosae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 6, n. 3, p. 269-290, jul./set. 2008.

MOREIRA, T. F. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae). 2012. 94f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal Do Paraná, 2012.

MORENO, P. R. H.; COSTA-ISSA, F. I.; RAJCA-FERREIRA, A. K.; PEREIRA, M. A. A.; KANEKO, T.M. Native Brazilian plants against Nosocomial infections: A critical review on their potential and the antimicrobial methodology. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. v. 13, n. 24, p. 3040-3078, 2013.

PASSOS, M. G. V. M. **Avaliação de atividade antimicrobiana de produtos de plantas nativas de regiões do estado da Bahia**. 2007. 156 f. Dissertação (Mestre Em Produtos Naturais E Sintéticos Bioativos)- Programa De Pós-Graduação Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal Da Paraíba, João Pessoa, 2007.

PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; BARA M. T. F.; REZENDE, M. H.; FERREIRA, H. D. Estudo farmacognóstico das folhas de Pimenta *pseudocardyophyllus* (Gomes) L. R. Landrum-Myrtaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 265-278, 2008.

PEITZ, C.; CÚNICO, M. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; KERBER, V. A. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13, n. 2, p.61-65, 2003.

PEREIRA, R. M. S.; DOS SANTOS A.V.A.; NETA, L. C. S.; DOS SANTOS, M. A. V.; CRUZ, F. G.; MARTINS, D. Derivados de benzofenona isolados de *Zornia*

flemmingioides(Leguminosae) e sua atividade anti *Trichomonas vaginalis*. In: 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- SBQ, 2005. Anais da 28a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005.

PERES, M. T. L. P, SIMIONATTO, E., HESS, S. C.; BONANI, V. F. L.; CANDIDO, A. C. S.; CASTELLI, C. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**. v. 32, p. 897 – 901, 2009.

PEREZ, A. P. F. O Gênero *Zornia* J. F. Gmel (Leguminosae, Papilonoideae, Dalbergieae): Revisão Taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil e filogenia. 2009. 271f. Tese (Doutorado em Biologia vegetal). Instituto de biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

PHILIPPSEN, A. F. **Caracterização fitoquímica e atividades biológicas de *Xylosma ciliatifolium* (CLOS) Eichler, Flacourtiaceae (Salicaceae sensu lato)**. 2010. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

POKHREL, N. R.; ADHIKARI, R.; BARAL, M. In-vitro evaluation of the antimicrobial activity of *Bauhinia variegata*, locally known as koiralo. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 18, n. 1, p. 69-71, 2002.

RAZAVI, S. M. Nazemiyeh H, Hajiboland R, Kumarasamy Y, Delazar A, Nahar L, Sarker SD. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, p. 1-5, 2008.

REN, F. Z.; GAO, Y. Q.; CHENG, X. X.; LI, L. H.; CHEN, S. H.; ZHANG, Y. L. Study on chemical Constituents of *Zornia diphylla*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 3, 2012.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu, 2005.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S. MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R.; Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, Oxford. v. 91, p. 621-632, 2005.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas, RS: Ed. ULBRA. 2004.

SANTOS, K. K. A, MATIAS, E. F. F, ALMEIDA, T. S, COSTA, J. G. M, COUTINHO, H. D. M. Atividade antifúngica de extratos vegetais e animais da região do cariri. **Cad Ci Cultura**. v. 2, p. 53 – 65, 2010.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p.145-149, 2007.

SCHOPPAN, L. T.; GASTAL, C. V. S. Plantas medicinais de um parque municipal de porto alegre, RS- Brasil. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 21, n. 2, p. 31-45, 2009.

SCIAMARELLI, A. TOZZI, A. M. G. *Zornia* J. F. Gmel. (Leguminosae – Papilionoideae – Aeschynomeneae) no estado de São Paulo, **Acta Botânica Brasilica**, v. 10, p. 237-266, 1996.

SIDDIQUI, R. A.; KHAN, M. S. Y.; CHAGHTAI, S. A.; HASAN, Z. U. Preliminary qualitative organic analysis of *Zornia gibbosa* Span. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 44-45, 1985.

SIDDIQUI, R. A.; KHAN, S. S.; CHAGHTAI, S. A.; HASAN, Z. U.; IQBAL, S. A. Study of the natural products from the stem of *Zornia gibbosa* Span. **Oriental Journal of Chemistry**. v. 2, n. 2, p. 160-162, 1986.

SILVA, N. G. M. S.; **Plantas indicadas como diurtéticas no Brasil desde Martius, 1843**. 2004. 136f. Dissertação (Mestre em fisiologia). Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Recife, 2004.

SILVA, B. C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S.; Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n.3, p. 355-360, Jun./Jul. 2010.

SILVA, C. G. **Estudo etnobotânico e da atividade antimicrobiana ‘in vitro’ de plantas medicinais na comunidade do sítio nazaré, município de milagres, ceará**. 2012. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, Universidade Federal De Campina Grande, Patos, 2012.

SILVA, A. D. S.; **Flavonoides de *Zornia Brasiliensis* e atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona**. 2013. 151f. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de produtos naturais e sintéticos bioativos) Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais E Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. Ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRS, 2004.

SOEJARTO, D. D.; FONG, H. H. S.; TAN, G. T.; ZHANG, H. J.; MA, C.Y.; FRANZBLAU, S. G. Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit-sharing. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 100, p. 15-22, 2005.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, C. E. S.; LEITE, N. F.; CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Evaluation of the Cytoprotective and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia Uniflora* Lineau e *Psidium Soblealeanum* Proença & Landrum Against Heavy Metals. **Rev Cienc Salud**. v. 3, n. 40, p.1-9, 2014.

TAHARA, S. A journey of twenty-five years throught the ecological biochemistry of flavonoids. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 6, p. 1387-1404, 2007.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis current methods for assessinh the in vitro antioxidante and antibacterial activity of plants extracts. **Food Chemistry**. v. 172, p. 814-822, 2015.

VERAS, H. N. H.; **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* CHAM. (VERBENACEAE)**. 2011. 142f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular. Universidade Regional do Cariri- URCA, Crato, 2011.

WHO (World Heath Organization). The Global Burden of Disease- 2004 UPDATE. WHO Press, 2008. 146p.

WHO (World Health Organization). The evolving threat of antimicrobial resistance. Geneva. [acessado em 03 de outubro, 2014]. Disponíveis em 2012:http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf.

CAPÍTULO I- Avaliação *in vitro* das atividades antimicrobiana e moduladora do extrato e frações de *Zornia reticulata* Sm. frente à bactérias gram positivas

Avaliação das atividades antimicrobiana e moduladora *in vitro* dos extratos e frações de *Zornia reticulata* Sm. frente à bactérias gram positivas

RESUMO

As plantas medicinais vêm tradicionalmente sendo usadas na medicina popular podendo indicar um caminho na busca de novos agentes farmacológicos. A procura por esses novos agentes tem se intensificado devido ao aumento significativo de microrganismos resistentes a antimicrobianos convencionais. A investigação do potencial antimicrobiano nos vegetais é justificável devido à grande variedade de substâncias químicas presentes nas plantas com diferentes ações farmacológicas. Assim, neste estudo, o extrato etanólico bruto e as frações de *Z. reticulata* foram analisadas com o objetivo de avaliar o potencial hemolisante, a atividade antibacteriana e moduladora da resistência frente à cepas Gram positivas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralise* multirresistente dessas duas últimas, realizar a prospecção fitoquímica e caracterizar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As atividades antimicrobianas e moduladoras foram determinadas por microdiluição. Observou-se que a fração acetato de etila apresentou maior teor de flavonoides e compostos fenólicos e na fração hexânica encontrou-se a maior quantidade de taninos. Na análise cromatográfica por CLAE não foram identificados os compostos ácido caféico, ácido gálico, canferol, catequina, rutina e quercetina. Os valores preliminares da atividade antimicrobiana mostraram que o extrato e as frações hexânica e clorofórmica foram mais efetivos frente à *S. mutans* e *S. oralis* com CIM <2,5 mg.mL⁻¹. Na modulação essas amostras com concentrações subinibitórias (CIM/8) reforçaram significativamente a atividade do Cefepime frente à linhagem multirresistente desses *Streptococcus*. Efeito sinérgico foi observado a partir do cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (CIF), com CIF <0,5. Na citotoxicidade a fração clorofórmica na concentração de 1mg.mL⁻¹ é a que exibe o menor potencial hemolisante. Os resultados apresentados sugerem que os extratos e frações de *Z. reticulata* são uma fonte de produtos naturais com atividade antimicrobiana, oferecendo uma importante contribuição para ampliar o conhecimento biológico da espécie, pois este foi o primeiro relato de atividade moduladora da ação de antibióticos por frações obtidas de uma planta do gênero *Zornia*.

Palavras-chave: Urinana; *Streptococcus* sp.; *Staphylococcus aureus*; CLAE.

1 INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma das espécies de Gram positivos que mais causa infecções hospitalares e na comunidade, principalmente infecções purulentas, como por exemplo: furúnculo, carbúnculo, abscesso, miocardite, endocardite, pneumonia, meningite e artrite bacteriana (MATIAS et al. 2010). *Streptococcus* sp. são um gênero de cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, comensais e patogênicos que colonizam a pele e membranas mucosas do trato respiratório, genitourinário e canal alimentar de humanos e de outros animais mamíferos (TORTORA, 2010). Os *Streptococcus oralis* são comumente encontrados no biofilme. Porém, por não serem acidogênicos, nem acidúricos, estão presentes no estágio inicial de formação da cárie, não atuando diretamente na desmineralização do esmalte

dentário, apenas tornando o meio mais adequado para colonização dos *Streptococcus mutans*. Essas são presentes nos dentes, provocando cáries, pois produzem polissacarídeos intra e extracelulares, altamente acidogênicos e acidúricos e metabolizam várias glicoproteínas que são os principais responsáveis por essas lesões (ALVES *et al.* 2010; VERAS, 2011).

Como os antibióticos atualmente disponíveis agem de forma pouco seletiva, atingindo tanto os microrganismos patogênicos quanto os não patogênicos é crucial que se faça uma escolha criteriosa do medicamento, e que resulte no máximo de efeito sobre os microrganismos alvo, já que o uso clínico dos antimicrobianos exerce papel selecionador das estirpes resistentes e, provavelmente, é a principal causa da resistência, sobretudo a observada no ambiente hospitalar, onde o uso destes medicamentos é maior. A resistência bacteriana aos antibióticos é um problema crescente e preocupante, pois para os pacientes essa resistência antimicrobiana aumenta a morbidade e a mortalidade, enquanto que para as instituições de saúde significa aumento de custos (COUTINHO; CORDEIRO; BRINGEL, 2005; SOUZA *et al.*, 2014). Na atualidade, é motivo de grande preocupação entre os cientistas, os microbiologistas e os médicos clínicos a resistência entre as bactérias Grampositivas, que vêm se tornando bactérias problemas na terapêutica anti-infecciosa (TAVARES, 2000).

A resistência aos antimicrobianos ocorre por um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos e impedem a ação das drogas, como mudanças nos sítios de ligação dos ribossomos, na estrutura enzimática do próprio fármaco e no mecanismo de permeabilidade e também pelo fenômeno da bomba de efluxo entre outras alterações (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Todos esses mecanismos que expressam resistência, devido ao uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos, vem sendo cada vez mais freqüentes em inúmeros microrganismos, tornando assim o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (LEITE *et al.*, 2014). As propriedades biológicas dos produtos vegetais vêm sendo estudadas em busca de novos alvos com ação antimicrobiana (ARYA *et al.*, 2010; LINS, 2011)

O uso de extratos vegetais é de grande importância científica, principalmente se a associação deste com o antibiótico causar uma potencialização na atividade terapêutica, mecanismo de sinergismo, a qual há relação com a presença de fitocompostos encontrado no extrato, que aumentam a atividade antibiótica (MORAIS-BRAGA *et al.*, 2013). A junção dos

antibióticos com extratos vegetais podem ainda diminuir os efeitos colaterais desses fármacos, visto que a atividade moduladora é também uma forma de reduzir a CIM dos antibióticos (FIGUEIREDO et al., 2013).

Esses fitocompostos com atividade antimicrobiana compreende uma variedade de substâncias químicas presentes nas diferentes partes das plantas, como cumarina, flavonoides, terpenoides, alcaloides e taninos (SILVA, 2010). Neste sentido, as pesquisas envolvem o *screening* de extratos vegetais, para desta forma, conhecer a classe de metabólitos secundários com relevante atividade biológica (KNIGHT et al., 2003; ANGÉLICO, 2011).

Além dessas pesquisas, que buscam encontrar as possíveis ações farmacológicas das plantas medicinais, são relevantes também ensaios toxicológicos (BARROS, 2008). Ensaios de citotoxicidade sobre as hemácias do sangue periférico humano analisa o poder de lise da amostra vegetal frente às células sanguíneas, chamado de potencial hemolisante (SANTOS, 2014). Apesar do amplo uso dessas preparações a base de plantas pela população, são poucos os estudos feitos para avaliar o potencial de toxicidade. Porém, ao contrário do senso comum, que as consideram naturais e isentas de reações adversas, elas também podem causar efeitos indesejáveis (BELCAVELLO et al., 2012). Esse teste representa também uma ferramenta útil e promissora nas primeiras etapas de seleção de compostos antitumorais (LEÓN et al., 2006)

A *Zornia reticulata* é um arbusto pequeno, com aproximadamente 75 cm, perene, selvagem, com folhas alternas que medem de 7-12 cm de comprimento e frutos pequenos de 2-3 mm de diâmetro (ALVARADO, 2012). Sua localização é em quase todos os continentes e no Brasil encontra-se na maioria das regiões (PEREZ, 2009). Na medicina popular, usam-se principalmente os caules e as folhas, no tratamento de inflamações, infecções e é principalmente usada como diurética, por isso é conhecida popularmente como “urinária”, “urinana”, “carrapicho”, “chanca pedra” e “quebra pedra” (DANTAS, 2007).

Z. reticulata pertence à família Fabaceae, e vários são os estudos relatados sobre atividades farmacológicas nas diferentes espécies do seu gênero. Porém os estudos direcionados à avaliação da atividade antimicrobiana de *Z. reticulata* frente aos microrganismos prejudiciais ao homem é escasso na literatura científica. Em vista disso, objetivou-se nesse trabalho avaliar o efeito antibacteriano e modulador do extrato etanólico bruto e das frações obtidas das folhas de *Z. reticulata* frente às bactérias Gram positivas patogênicas, verificar e quantificar classes de metabólitos secundários, caracterizar extrato e frações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ainda analisar seu potencial hemolisante.

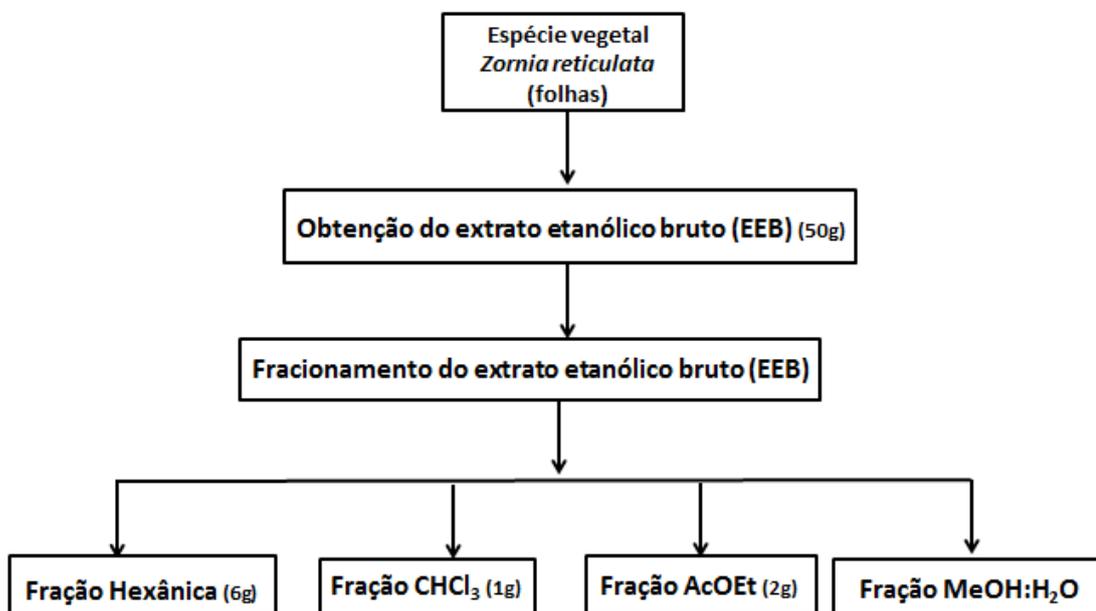
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal e preparação do extrato e das frações de *Zornia reticulata*

As amostras de *Zornia reticulata* foram coletadas na região do compartimento da Borborema-Paraíba e as folhas foram obtidas de plantas adultas devidamente selecionadas. A exsiccata da espécie foi depositada na coleção botânica do herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR UFCG sob o número 5708.

O material botânico coletado foi seco em estufa a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com ar circulante e posteriormente pulverizado em moinho de facas com granulometria de 10 mesh. Seguindo-se extração com etanol, como líquido extrator, em percolador a temperatura ambiente por 72 horas. As soluções extrativas obtidas foram concentradas em evaporador rotativo 40°C , obtendo-se, assim, o extrato etanólico bruto (EEB). O EEB foi redissolvido em uma solução metanol:água (7:3, v/v), transferindo para uma ampola de separação e, em seguida, foram adicionados os solventes padrão analítico em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila (Figura 3).

Figura 3: Obtenção do extrato etanólico e frações de *Zornia reticulata*



2.2 Testes fitoquímicos

2.2.1 *Prospecção fitoquímica*

Para a realização da prospecção fitoquímica do extrato etanólico e de suas frações seguiu-se a metodologia de Matos (1997). As classes de metabólitos secundários foram identificadas por mudanças colorimétricas e/ou formação de precipitados após a adição de reagentes específicos.

Para identificar o grupo de esteroides foi usada a reação de Liebermann-Burchard, a reação de Keller-Kiliani e a reação de Pesez; no grupo de heterosídeos flavonídicos foi usada a reação de Shinoda, a reação oxalo-bórica, a reação com ácido sulfúrico concentrado, a reação com hidróxidos alcalinos, a reação com cloreto de alumínio e a reação com cloreto de ferro; no grupo de heterosídeos saponínicos foi usado o índice de espuma após a agitação da solução neutralizada com carbonato de sódio; no grupo de taninos foi usada a reação com gelatina, reação com alcalóides (sulfato de quinino e solução alcoólica de brucina), a reação com sais metálicos (acetato de cobre e cloreto de ferro) e a reação com hidróxido de sódio; no grupo dos alcaloides foi usado o reativo de Mayer, o reativo de Dragendorff e o reativo de Bouchardat.

2.2.2 *Determinação de polifenóis totais*

O conteúdo total de polifenóis do extrato da planta foi medido por espectrofotometria na região do espectro visível, pelo método de Folin-Ciocalteu descrito por Chandra; Mejia (2004), com pequenas modificações. O extrato foi dissolvido em água destilada para se obter uma concentração final de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir de cada solução, uma alíquota de 1 mL foi adicionado em 1 mL de reagente 1 mol.L^{-1} de Folin-Ciocalteu. Esta mistura permaneceu em repouso durante 2 minutos, antes da adição de 2 mL de 20% (p/v) de solução de Na_2CO_3 e deixado em repouso durante 10 minutos. Depois disso, a leitura foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-mini-1240, a 757 nm. A curva de calibração foi obtida com uma solução de estoque de ácido gálico ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), a partir da qual foram realizadas diluições nas concentrações entre 1 e $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O conteúdo total de polifenóis foi expresso em microgramas equivalentes da norma utilizada.

2.2.3 Determinação de flavonoides totais

Os flavonoides totais foram determinados pelo método descrito por Meda et al. (2005). Os extratos foram diluídos com metanol até uma concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para os 5 mL de cada solução teste foi adicionado o mesmo volume de AlCl_3 a 2% (p/v) em metanol. Esta mistura permaneceu em repouso durante 10 minutos antes da leitura espectrofotométrica no UV a 415 nm. Os flavonoides totais foram determinados pela curva de calibração utilizando quercetina (Sigma-Aldrich) como padrão em concentrações entre 2 e $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e expressos em mg de equivalente quercetina.

2.2.4 Determinação de Taninos condensados

Na determinação de taninos totais foi utilizado o método desenvolvido por Makkar; Becker (1993). Para construção da curva de calibração utilizou-se como substância padrão a catequina, dissolvida em metanol na faixa de concentração de $10\text{-}100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Solução de vanilina a 4% em metanol (p/v) foi usada como reagente. A solução das amostras vegetais foram dissolvidas em metanol, colocando-se 0,25 mL de cada amostra em um tubo de ensaio, adicionando-se, em cada tubo, 0,75 mL de HCl P. A. e 1,5 mL da solução de vanilina. Os tubos permaneceram em repouso por 20 minutos, imersos em água a 22°C . Realizaram-se leituras espectrofotométricas no UV a 500nm, relacionando os valores de absorbância encontrados com a concentração de taninos condensados da solução, através de uma relação matemática obtida pela curva de calibração.

2.3 Análise por cromatografia líquida de *Z. reticulata*

Para a análise utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato e das frações de *Z. Reticulata* utilizou-se um cromatógrafo líquido Dionex, modelo Ultimate 3000, constituído por uma bomba quartenária, com detector de arranjo de diodo. Foi utilizada uma coluna empacotada com octadecilsilano (Phenomenex, Gemini C-18, 250 mm x 0,46 mm, $5\mu\text{m}$). A fase móvel que forneceu melhor seletividade ao método foi constituída de um gradiente de metanol:ácido acético 0,1%, iniciando com 10% de metanol até 3 min, indo até 90% de MeOH em 35 min, e retornando a 10% de MeOH até 38 min. As análises foram realizadas em temperatura controlada (30°C), utilizando um fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de $20\mu\text{L}$. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm. Todas as amostras foram filtradas com filtros de seringa $0,45\mu\text{m}$ de diâmetro.

2.4 Ensaios microbiológicos

Nos ensaios microbiológicos foram preparadas soluções iniciais de 5 mg.mL^{-1} para o extrato e as frações. Para esse ensaio foram utilizadas três espécies de bactérias gram positivas padrões, *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *S. mutans* ATCC (25175) e *S. oralis* ATCC (10557), cepas oriundas da Fundação Oswaldo Cruz; e duas bactérias multirresistentes, *S. mutans* 1 e *S. oralis* 1, ambas cedidas pela clínica de Odontologia da UEPB, previamente identificadas, com perfil fenotípico descrito na tabela 1.

Tabela 1: Microrganismos Gram positivos testados e perfil fenotípico de resistências aos antimicrobianos

Bactérias gram positivas	Fenótipo de resistência
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)*	NA (cepa sensível)
<i>S. mutans</i> ATCC (25175)*	NA (cepa sensível)
<i>S. oralis</i> ATCC (10557)*	NA (cepa sensível)
<i>S. mutans</i> 1**	CFO (30 μg), PEN (10 un), CLO (30 μg), CFX (30 μg), CLI (2 μg), CPM (30 μg)
<i>S. oralis</i> 1**	CFO (30 μg), PEN (10 un), CLO (30 μg), CFX (30 μg), CLI (2 μg), CPM (30 μg)

Legenda: *Fundação Oswaldo Cruz; **Laboratório de Odontologia-UEPB; NA: não se aplica; CFO: Ceftriaxona; PEN: Penicilina; CLO: Cloranfenicol; CFX: Cefatoxima; CLI: Clindamicina; CPM: Cefepime

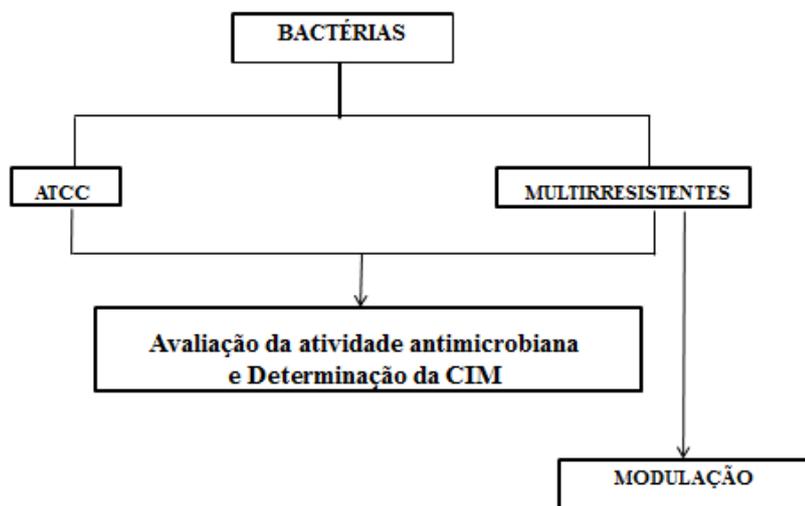
Todas as linhagens foram mantidas em Agar nutriente (Himedia Laboratories Ltda.[®]) e reavivadas em Agar Mueller Hinton (Himedia Laboratories Ltda.[®]). Para os *Streptococcus* sp. esse meio foi suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. A incubação ocorreu por 24 horas a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa bacteriológica.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através da técnica de microdiluição (CLSI, 2012). 100 μL de caldo Muller Hinton foram adicionados nos 96 poços da placa de microdiluição, 100 μL de cada extrato e frações foram diluídas em série. As concentrações finais dos extratos e frações variaram entre $2,5-0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$. Foram colocados em cada poço 10 μL de inóculos, padronizados em tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,9% estéril, ajustada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, para se obter uma concentração de 10^6 UFC.mL^{-1} , o que equivale a escala 0,5 de McFarland. As placas foram incubadas a $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ e lidas depois de 24 h. O crescimento bacteriano foi indicado com a adição de 20 μL de solução aquosa de resazurina 0,01 % com incubação de 37

± 0,5 °C por 2 horas. E o valor da CIM foi identificado como a menor concentração em que não houve crescimento bacteriano visível.

Para a avaliação do extrato e das frações na modulação da resistência bacteriana foi utilizada a técnica descrita por Coutinho et al. (2010). Os antibióticos testados (penicilina, cloranfenicol e cefepime) foram aqueles de acordo com o perfil fenotípico das bactérias e os que apresentaram CIM de acordo com o CLSI (2012). As CIMs dos antibióticos foram determinadas na presença e na ausência das amostras vegetais em concentração subinibitória (CIM/8). As bactérias utilizadas foram as multirresistentes, *S. oralis* 1 e *S. mutans* 1 (Figura 4). Todos os ensaios foram realizados em triplicata com repetições em dias diferentes.

Figura 4: Ensaios microbiológicos realizados



2.5 Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (CIF)

A CIF foi calculada, conforme a fórmula abaixo, para determinar se a associação do extrato com o antibiótico produziu um efeito sinérgico ($CIF \leq 0,5$), indiferente ($0,5 > CIF \leq 4$) ou antagônico ($CIF > 4$) (MACKAY; MILNE; GOULD, 2000):

$$CIF \text{ do antibiótico} = \frac{\text{CIM do antibiótico em combinação com o extrato}}{\text{CIM do antibiótico independente}}$$

2.6 Citotoxicidade em hemácias

A preparação das hemácias para o teste de citotoxicidade seguiu a metodologia descrita por Cruz-Silva et al. (2000), com modificações. O sangue O+ previamente identificado foi doado pelo laboratório de Análises Clínicas da UEPB. Após centrifugação a 2500 rpm por 5 minutos separou-se o plasma que foi descartado. A suspensão de hemácias foi lavada com solução salina a 1%, três vezes, a 2500 rpm/5 minutos. As hemácias foram ressuspensas em solução salina a 1% e o volume foi ajustado para 5%. Colocou-se 1,5 mL da suspensão de hemácia a 5% juntamente com 1,5 mL das soluções teste (extrato etanólico bruto, fração hexânica, clorofórmica e acetato de etila) nas concentrações de 1,0, 5,0 e 10,0 mg.mL⁻¹ em tubos de ensaio, aguardando 1 hora a temperatura ambiente para que acontecesse a hemólise. Após esse período, cada tubo foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante retirado para leitura em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240) em um comprimento de onda de 540 nm (CRUZ-SILVA et al., 2001). O controle positivo utilizado foi a solução de Turk 1% e o controle negativo a solução salina 1%. As análises foram realizadas em triplicata. O cálculo do potencial hemolisante das substâncias seguiu a seguinte equação:

$$Ph = \frac{Ae - Ab}{At} \times 100$$

Onde:

Ph = Potencial hemolisante (em porcentagem)

Ae = Absorbância da amostra testada

Ab = Branco da amostra testada

At = Absorbância do Controle Positivo

2.7 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata, desses resultados a média e o desvio padrão foram calculados no Excel 2010. Foram aceitos apenas os valores de desvio padrão de zero ou próximos à zero.

3 RESULTADOS

3.1 Testes fitoquímicos

A prospecção fitoquímica do extrato e das frações revelou a presença de quatro classes de metabólitos secundários: taninos, flavonoides, esteroides e saponinas (Tabela 2). Alguns foram quantificados (Tabela 3), sendo que a fração acetato de etila apresentou a maior quantidade de flavonoides e polifenóis totais. A fração hexânica exibiu maior quantidade de taninos.

Tabela 2: Prospecção fitoquímica do extrato e das frações de *Zornia reticulata*

Amostra	Alcalóides	Esteróides	Taninos	Flavonoides	Saponinas
Extrato Etanólico Bruto	-	+	+	+	+
F. Hexânica	-	+	+	+	+
F. clorofórmica	-	+	+	+	+
F. Acetato de Etila	-	+	+	+	+

Legenda: (+)Presença; (-)Ausência; F. Clorofórmica: Fração clorofórmica; F. Hexânica: Fração hexânica; F. acetato de etila: Fração acetato de etila.

Tabela 3: Quantificação dos metabólitos secundários no extrato e nas frações de *Zornia reticulata*

Metabólitos Secundários	Extratos			
	EEB (mg.g ⁻¹)	F. Hexânica (mg.g ⁻¹)	F. Clorofórmica (mg.g ⁻¹)	F. Acetato de Etila (mg.g ⁻¹)
Taninos	8,70	55,90	9,50	3,400
Flavonoides	22,40	38,00	30,30	87,00
Polifenóis	11,48	7,43	NQ	27,56

Legenda: EEB: Extrato etanólico bruto; F. Clorofórmica: Fração clorofórmica; F. Hexânica: Fração hexânica; F. acetato de etila: Fração acetato de etila; NQ = não foi possível quantificar.

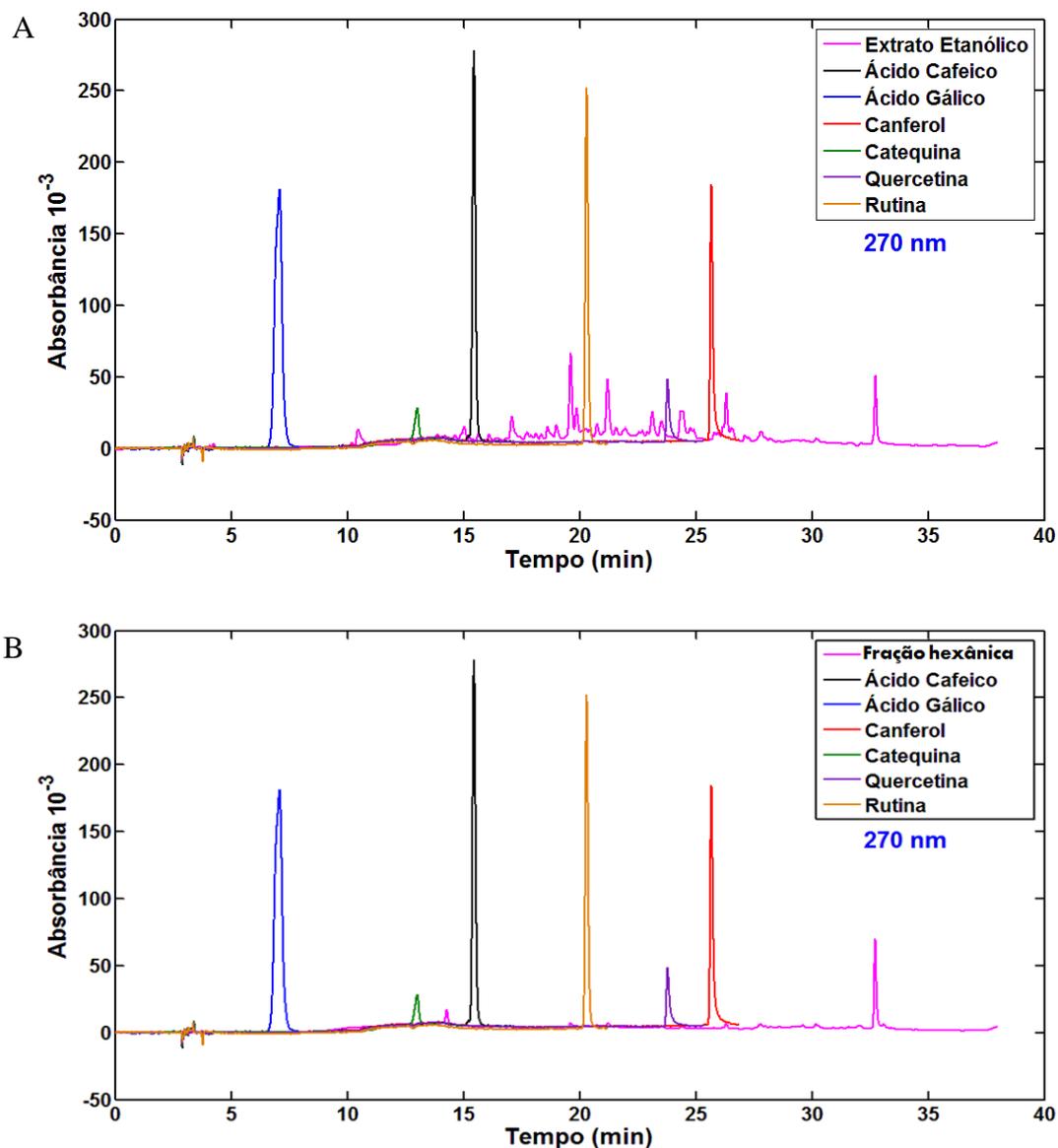
3.2 Análise por cromatografia líquida de *Z. reticulata*

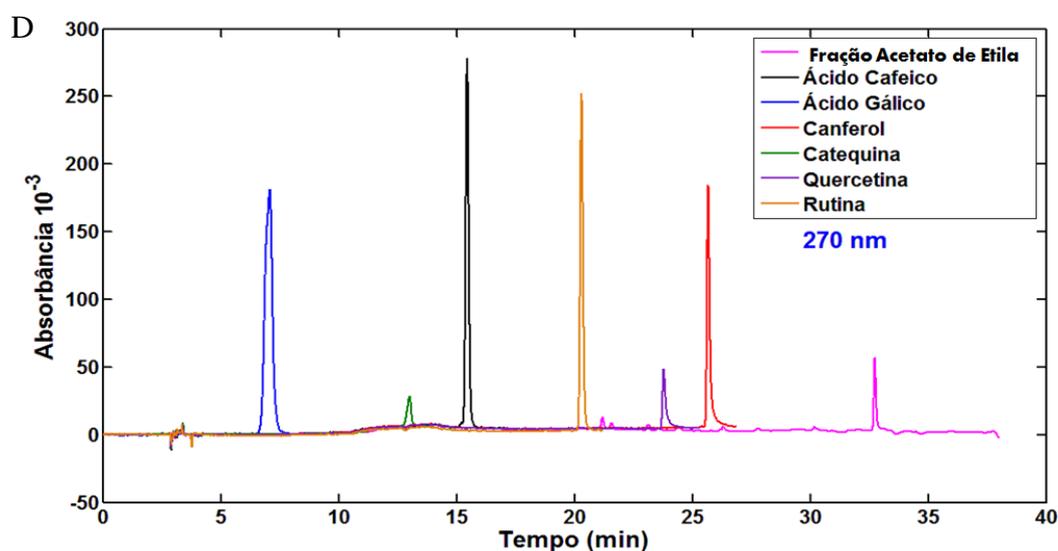
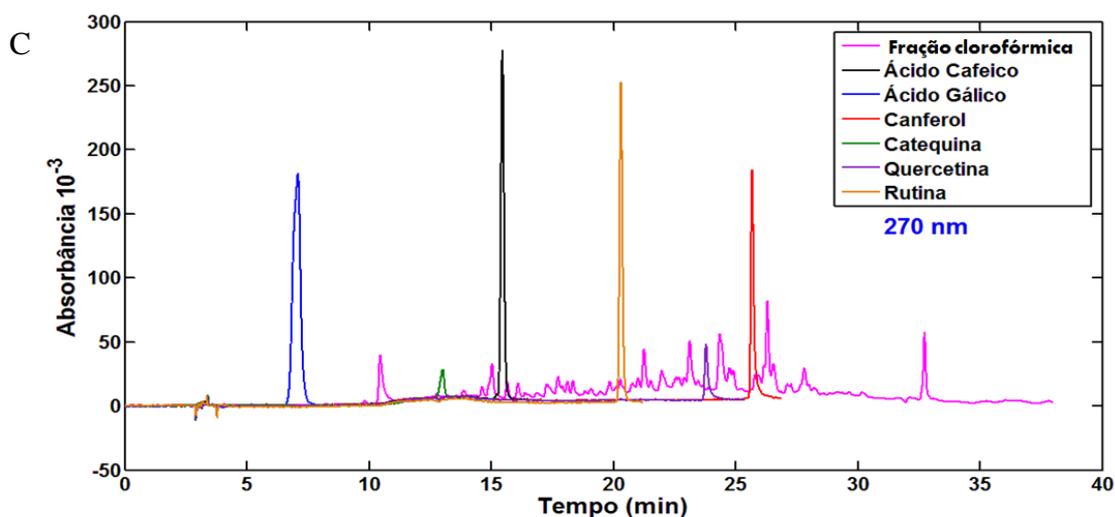
O extrato e as frações foram submetidos à análise cromatográfica por CLAE a fim de identificar e quantificar um composto químico majoritário, que pudesse ser validado com o marcador químico da planta, tendo em vista que a literatura científica relata presença de alguns polifenóis e de grandes quantidades de flavonoides nas plantas do gênero *Zornia* (LEUNER et al. 2012; REN et al. 2012; SILVA, 2013). A figura 5 apresenta os cromatogramas sobrepostos do extrato etanólico e das frações de *Z. reticulata* e de seis diferentes padrões de referência, como o ácido gálico que é padrão para os polifenóis e da quercetina, para os flavonoides, no comprimento de onda de 270 nm.

A presença de ácido caféico, ácido gálico, canferol, catequina, rutina e quercetina foi investigada através da comparação dos tempos de retenção das respectivas amostras padrão com as soluções das amostras de *Z. reticulata*. Além disso, foi comparado os espectros de UV

dos padrões analisados com os demais picos apresentados nas amostras, não encontrando nenhuma correlação entre os compostos avaliados e os constituintes encontrados nas amostras da planta.

Figura 5: Cromatogramas sobrepostos de diferentes padrões de referências às amostras de *Zornia reticulata*: extrato etanólico (A) e frações hexânica (B), clorofórmica (C) e acetato de etila (D), no comprimento de onda de 270 nm.





3.3 Avaliação dos ensaios microbiológicos

O extrato e as frações de *Z. reticulata* não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas frente à *S. aureus* ATCC 25923, com valor de CIM $> 2,5\text{mg.mL}^{-1}$, não demonstrando atividade clínica relevante de acordo com os limites estabelecidos pelo protocolo (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003). Para as bactérias do gênero *Streptococcus* foi observado boa atividade antimicrobiana, principalmente da fração hexânica e clorofórmica. A fração acetato de etila não revelou bons resultados de atividade antimicrobiana, não prosseguindo para os ensaios de atividade moduladora (Tabela 4).

Tabela 4: *Screening* da atividade antimicrobiana (AA) e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato e frações de *Zornia reticulata*

BACTÉRIAS	AA	CIM (mg.mL ⁻¹)			
		EEB	Fração Hexânica	Fração Clorofórmica	Fração Acetato de Etila
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)*	-	> 2,50	> 2,50	> 2,50	> 2,50
<i>S. mutans</i> ATCC (25175)*	+	0,32	0,16	0,16	> 2,50
<i>S. oralis</i> ATCC (10557)*	+	1,25	0,63	0,63	> 2,50
<i>S. mutans</i> 1**	+	0,63	0,32	0,32	> 2,50
<i>S. oralis</i> 1**	+	2,50	1,25	1,25	> 2,50

Legenda: *Fundação Oswaldo Cruz; **Laboratório de odontologia-UEPB; EEB: Extrato etanólico Bruto; AA: Atividade antimicrobiana; (+) Presença de atv. Antimicrobiana; (-) Ausência de atividade antimicrobiana.

Na associação do extrato etanólico e das frações hexânica e clorofórmica com os antimicrobianos, penicilina e cloranfenicol, não houve interação sinérgica, nem antagônica, apenas indiferente. No entanto, na associação com o cefepime, apresentou sinergismo frente às duas bactérias multirresistente testadas. Frente à *S. oralis* 1 a CIM de cefepime foi de 23,44 µg.mL⁻¹, quando associado com o extrato etanólico bruto, reduziu para 11,79 µg.mL⁻¹. A mesma redução ocorreu na associação com a fração clorofórmica. Combinado com a fração hexânica a diminuição dessa CIM foi ainda mais expressiva diminuindo para 5,87 µg.mL⁻¹. Frente à *S. mutans* 1 o cefepime obteve uma CIM de 31,25; quando associada ao extrato etanólico bruto a CIM foi para 7,80 µg.mL⁻¹. Na associação com a fração hexânica, houve também modulação sinérgica, diminuindo a CIM para 15,7 µg.mL⁻¹, assim como para fração clorofórmica que apresentou o melhor resultado frente a essa bactéria com CIM de apenas 5,87 µg.mL⁻¹. As tabelas 5, 6 e 7 mostram as CIMs dos antibióticos independentes, as CIMs dos antibióticos na modulação, e ainda os valores e o efeito desta modulação a partir do cálculo da CIF.

Tabela 5: Atividade moduladora do extrato etanólico bruto (EEB) de *Zornia reticulata* frente às cepas multirresistentes de *S. oralis* 1 e *S. mutans* 1

EEB/antibióticos	<i>S. oralis</i> 1				<i>S. mutans</i> 1			
	CIM Independente	CIM Modulação	CIF	E	CIM Independente	CIM Modulação	CIF	E
EEB (mg.mL ⁻¹)	2,5	0,32	-	-	0,63	0,08	-	-
Penicilina (µg.mL ⁻¹)	93,75	93,90	0,99	I	125,00	125,15	0,99	I
Cloranfenicol (µg.mL ⁻¹)	93,75	93,82	1,00	I	62,50	62,65	1,00	I
Cefepime (µg.mL ⁻¹)	23,44	11,79	0,50	S	31,25	7,80	0,50	S

Legenda: EEB: extrato etanólico bruto; CIM: Concentração inibitória mínima; CIF: Concentração inibitória fracionada; E: Efeito I: Indiferente; S: Sinergismo.

Tabela 6: Atividade moduladora da fração hexânica (FHEX) de *Zornia reticulata* frente às cepas multirresistentes de *S. oralis* 1 e *S. mutans* 1

FHEX/antibióticos	<i>S. oralis</i> 1				<i>S. mutans</i> 1			
	CIM Independente	CIM Modulação	CIF	E	CIM Independente	CIM Modulação	CIF	E
FHEX (mg.mL ⁻¹)	1,25	0,16	-	-	0,32	0,04	-	-
Penicilina (µg.mL ⁻¹)	93,75	93,90	0,99	I	125,00	125,15	0,99	I
Cloranfenicol (µg.mL ⁻¹)	93,75	93,82	1,00	I	62,5	62,65	1,00	I
Cefepime (µg.mL ⁻¹)	23,44	5,87	0,30	S	31,25	15,70	0,50	S

Legenda: FHEX: Fração hexânica; CIM: Concentração inibitória mínima; CIF: Concentração inibitória fracionada; E: Efeito I: Indiferente; S: Sinergismo.

Tabela 7: Atividade moduladora da fração clorofórmica (FCLO) de *Zornia reticulata* frente às cepas multirresistentes de *S. oralis* 1 e *S. mutans* 1

FCHCl ₃ /antibióticos	<i>S. oralis</i> 1				<i>S. mutans</i> 1			
	CIM Independente	CIM Modulação	CIF	E	Independente	CIM Modulação	CIF	E
FCHCl ₃ (mg.mL ⁻¹)	1,25	0,16	-	-	0,32	0,04	-	-
Penicilina (µg.mL ⁻¹)	93,75	93,90	0,99	I	125,00	125,15	0,99	I
Cloranfenicol (µg.mL ⁻¹)	93,75	93,82	1,00	I	62,50	62,65	1,00	I
Cefepime (µg.mL ⁻¹)	23,44	11,79	0,50	S	31,25	5,87	0,10	S

Legenda: FCHCl₃: Fração clorofórmica; CIM: Concentração inibitória mínima; CIF: Concentração inibitória fracionada; E: Efeito I: Indiferente; S: Sinergismo.

3.4 Citotoxicidade em hemácias

A tabela 8 apresenta o percentual de hemólise induzido por diferentes concentrações das amostras testadas. Os resultados demonstraram que não houve indução de hemólise quando as culturas foram tratadas com solução salina a 1% (controle negativo) e que houve 100% de hemólise quando tratadas com solução de turck a 1% (controle positivo). A concentração de 1 mg.mL⁻¹ apresenta o menor percentual de poder hemolisante para todas as amostras, principalmente para a fração clorofórmica, que quando comparada ao controle positivo hemolisa apenas 5,2%, sendo bastante significativa.

Tabela 8: Percentual de hemólise do extrato etanólico e das frações de *Zornia reticulata* em hemácias de sangue humano O⁺

Concentrações (mg.mL ⁻¹)	Potencial Hemolisante (%)					
	Sol. Turk 1%*	Sol. Salina 1%**	Extrato Etanólico	Fração Hexânica	Fração Clorofórmica	Fração Acetato de Etila
10,0			31,3	16,0	10,4	40,3
5,0	0	100	24,5	12,1	8,6	37,5
1,0			12,6	10,2	5,2	23,2

Legenda: *controle positivo,**controle negativo.

4 DISCUSSÃO

A prospecção fitoquímica do extrato e das frações indicou a presença de compostos fenólicos, como flavonoides e taninos. Esses resultados corroboram com outros estudos, nos quais foi verificada a presença de flavonoides, taninos e cumarinas em diferentes plantas do mesmo gênero (LOPEZ, 1981; SIDDIQUI et al., 1985, 1986; ALMEIDA et al. 2004; PASSOS, 2007; SILVA, 2013). Os componentes de *Z. reticulata* ainda são desconhecidos, e este estudo pode afirmar apenas que não é possível identificar a presença dos compostos: ácido caféico, ácido gálico, canferol, catequina, rutina e quercetina. Estudos futuros são necessários para investigar outros padrões flavonoídicos existentes e, assim, identificar qual o composto que aparece em todas as amostras desta planta representado por um pico no cromatograma, com tempo de retenção aproximadamente em 32,5 min, pois estes componentes podem ser importantes na compreensão das atividades biológicas de *Z. reticulata*.

Os flavonoides apresentam atividades biológicas reconhecidas, como a atividade antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2014). Devido às suas características não polares, formam complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular, que afetam as estruturas das membranas dos microrganismos, permitindo uma melhor permeabilidade e absorção dos antibióticos, proporcionando uma ação sinérgica (TSUCHIYA et al., 1996; COWAN, 1999; LUCENA et al., 2015). Porém, quando encontrados em alta concentração podem resultar em efeito contrário, pois vão provocar quelação (BEHLING, et al., 2004).

Outro metabólito secundário que pode justificar esta ação antimicrobiana são os taninos, substâncias sintetizadas por plantas em resposta a infecções microbianas (HO et al., 2001), sendo capazes de alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática facilitando a absorção das drogas (TSUCHIYA et al., 1996; MATIAS et al., 2010; FIGUEREDO et al., 2013). Essas classes de metabólitos secundários encontradas já foram caracterizadas como modificadores da atividade antibiótica, podendo, assim, justificar o resultado de modulação observado neste trabalho.

O extrato e as frações de *Z. reticulata* não inibiram o crescimento bacteriano frente à cepa de *S. aureus* ATCC 25923, corroborando com os resultados encontrados por Alvarado (2012). Resultados diferentes foram relatados por Passos (2007) que comprovou atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* do extrato metanólico de *Zornia flemmingioides* pelo método de difusão em disco. Esses resultados discordantes podem ser levados em consideração devido às diferentes metodologias empregadas, diferentes solventes extrativos, proporcionando uma possível distinção dos constituintes encontrados e também as diferentes

espécies, que apesar de serem do mesmo gênero, existe sempre uma variabilidade genética nas espécies.

Já frente às outras bactérias usadas nesse estudo as amostras vegetais de *Z. reticulata* inibiram significativamente o crescimento bacteriano e, em combinação, com o antibiótico cefepime foi possível a diminuição da CIM. Segundo Coutinho et al. (2009), o uso de extratos vegetais como inibidores do crescimento de microrganismos dificulta a resistência desses patógenos por diversos fatores, tanto porque os extratos são misturas complexas, fazendo com que a adaptabilidade microbiana seja dificultada pelos diferentes mecanismos de ação dos seus componentes, como por apresentarem natureza hidrofóbica. Alguns componentes podem interagir com a dupla camada lipídica da membrana celular e afetar a cadeia respiratória e a produção de energia das bactérias (NICOLSON; EVANS; O'TOOLE, 1999), levar à interrupção da atividade celular (BURT, 2004), como também aumentar a permeabilidade da membrana celular, permitindo mais facilmente a penetração de antibióticos (HELANDER et al., 1998).

Compostos de fontes naturais quando associados a antibióticos convencionais podem ter atividade direta contra muitas espécies de bactérias, modulando a atividade desses antibióticos e invertendo a resistência desses patógenos. Essas ações vêm sendo demonstrados em inúmeros estudos, com diferentes metodologias, plantas e microrganismos (MORAIS-BRAGA et al., 2013), e permitem classificar esses compostos vegetais como modificadores de atividade antibiótica (PAULA, 2010).

Esta é a primeira pesquisa relatada na literatura de potenciação da atividade de uma droga antibiótica convencional combinada com amostras de *Zornia reticulata*. Esses resultados poderão incentivar pesquisas futuras sobre os aspectos antimicrobianos de produtos naturais isolados desta planta. O intuito é fundamentar sua possível utilização como agente modificador da resistência de microrganismos, tendo em vista, que o extrato e as frações da *Z. reticulata* apresentaram eficácia frente às cepas bacterianas do gênero *Streptococcus*.

A citotoxicidade é um teste de habilidade intrínseca que verifica a capacidade de um composto em causar alterações e morte em células básicas, não existindo nenhum diferencial entre células tumorais e normais. Não há registros de análise citotóxica realizado com *Z. reticulata*, logo, os dados de citotoxicidade mostrados nesse estudo podem servir de base em investigações futuras, como os ensaios toxicológicos *in vivo* e de células de cultura, realizados por alguns pesquisadores em outras espécies deste gênero. Batista (2013) avaliou no extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *Z. brasiliensis* sua toxicidade *in vitro* e *in vivo* e obteve

resultados satisfatórios, como a baixa toxicidade deste extrato frente à eritrócitos de camundongos e nos experimentos *in vivo*. Outro estudo de toxicidade encontrado na literatura com espécies do gênero *Zornia* foi exposto por Arunkumar; Ajikumaran e Subramoniam (2012), que comprovaram a baixa toxicidade da *Z. diphylla* a partir de avaliações com camundongos. Belcavello et al. (2012) analisaram o potencial citotóxico, aneugênico e mutagênico, *in vivo*, do extrato hidroalcoólico desta planta sobre células meristemáticas de cebola (*Allium cepa* L.) e da medula óssea de ratos Wistar, os quais demonstraram que este extrato possui potenciais efeitos citotóxicos e mutagênicos. Portanto, o alto potencial hemolisante da fração acetato de etila de *Z. reticulata* aponta para que mais pesquisas sejam realizadas buscando comprovar um possível efeito citotóxico e mutagênico. Já o baixo potencial hemolisante da fração clorofórmica mostra caminhos para afirmar que a mesma não apresenta toxicidade, porém para realmente comprovar quaisquer dessas hipóteses são necessários outros ensaios.

5 CONCLUSÃO

As análises fitoquímicas realizadas neste trabalho revelaram que a espécie estudada apresenta compostos pertencentes às classes dos flavonoides e taninos, que podem ser potencialmente ativos em modelos biológicos e farmacológicos. Não foi possível identificar o marcador químico pelos padrões analisados por CLAE. As amostras de *Z. reticulata* apresentam baixa citotoxicidade, sendo a fração clorofórmica na concentração de 1 mg.mL⁻¹ a que exibe o menor potencial hemolisante. Os ensaios antimicrobianos indicaram sensibilidade dessas amostras vegetais frente às espécies de *Streptococcus sp.* analisadas. Esta planta também obteve resultados satisfatórios frente às linhagens testadas demonstrando sinergismo entre suas amostras vegetais e o antibiótico cefepime. Logo o extrato e as frações de *Z. reticulata* podem vir a ser uma alternativa na busca de compostos que potencializam ação de drogas antimicrobianas. Dessa forma, devido aos resultados tão relevantes, diferentes ensaios de toxicidade devem ser realizados, a fim de apoiar a sua possível utilização na terapêutica e no combate à multirresistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. C. B.; PEREIRA, R. M. S.; GUEDES, M. L. S.; MARTINS, D. Benzofenonas preniladas de *Zornia flemmingioides* (Leguminosae). In: 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- SBQ, 2004. Anais da 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2004.

ALVARADO, A. **Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Zornia reticulata* y *cestrun sendtherianum*. Por el método de difusión en agar.** 2012. 55f. Tese (Doutorado em Laboratorio Clínico) Área da saúde humana, Universidade Nacional de Loja, Loja, 2012.

ALVES, T. M. S.; SILVA, C. A.; DA SILVA, N. B.; MEDEIROS, E. B.; VALENÇA, A. M. G. Atividade Antimicrobiana de Produtos Fluoretados Sobre Bactérias do Biofilme. **Pesquisa Brasileira Em Odontopediatria E Clínica Integrada.** João Pessoa, v. 10, n.2, p. 209-216, maio/ago. 2010.

ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *croton heliotropiifolius kunte* e *croton blanchetianus baill*.** 2011. 85f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal De Campina Grande-UFCG, 2011.

ARUNKUMAR, R. AJIKUMARAN, S.; N.; SUBRAMONIAM A. Induction of cell-specific apoptosis and protection of mice from cancer challenge by a steroid positive compound from *Zornia diphylla* (L.) Pers. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics.** v. 3, n. 3, 233-241, 2012.

ARYA, V.; YADAV, S.; KUMAR, S.; YADAV, J. P. Antimicrobial Activity of *Cassia occidentalis* L (Leaf) against various Human Pathogenic Microbes. **Life Sciences and Medicine Research,** v. 2010: LSMR-9, p.1-11, 2010.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidção estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.) N. E. Brown.** 2008. 162f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

BATISTA, T. M. **Avaliação da toxicidade in vitro e in vivo do extrato hidroalcolólico das partes aéreas de *Zornia brasiliensis* vog. (fabaceae).** Universidade Federal da Paraíba. 2013, 36f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Curso de Farmácia) Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

BEHLING, E. B, SENDÃO, M. C, FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentos e Nutrição.** v.15, n. 3, p. 285-92, 2004.

BELCAVELLO, L. et al. Cytotoxicity and DNA damages induced by the *Zornia diphylla* extract, a medicinal plant. **Natureza on line,** v. 10, n, 3 p.140-145, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, p. 223-253, 2004.

CHANDRA, S.; MEJÍA, E. G. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in Comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (Camellia sinensis) Teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 3583, 2004.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty- Second Informational Supplement, ninth ed. Document M100– S22. Pensilvânia, USA: NIH.

COUTINHO, H. D. M.; CORDEIRO, L. D.; BRINGEL, K. P. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from the population of Juazeiro do Norte - Ceará. **Revista Brasileira Ciências e Saúde**, v. 9, p. 127-138, 2005.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, O. E.; FALCÃO-SILVA, V. S.; JUNIOR-SIQUEIRA, J. P. In vitro interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. **Pharmaceutical Biology**. v. 47, n. 11, p. 1056- 1059, 2009.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA-JR, J. P. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 106-108, 2010.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 04, p. 564–582, 1999.

CRUZ-SILVA, M. M.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M.; CUSTÓDIO, J. B. A. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. **Biochim Biophys Acta**. v. 1464, p.41-61, 2000.

CRUZ-SILVA, M. M.; MADEIRA, V. M. C.; ALMEIDA, L. M.; CUSTÓDIO, J. B. A. Hydroxytamoxifen interaction with human erythrocytes membrane and induction of permeabilization and subsequent hemolysis. **Toxicology in Vitro**. v. 15, p. 612-615, 2001.

DAFERERA, D. J., ZIOGAS, B. N. & POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**. v. 22, p. 39-44, 2003.

FIGUEIREDO, B. F. G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F. F.; TORRES, C. M. G. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburanacearensis* A. C. Smith and *Anadenantheramacrocarpa*(Benth.) Brenan. **Bio Med Research International**. p. 1, 2013.

HELANDER, I. M.; ALAKOM, I. H. L.; LATVA, K. K.; MATTILA, S. T.; POL, I., SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON, W. A. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 46, p. 3590-3595, 1998.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v.15, p. 639– 652, 2008.

HO, K. Y.; TSAI, C. C.; HUANG, J. S.; CHEN, C. P.; LIN, T. C.; LIN, C. C. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea*. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**. v. 53, p. 187 – 191, 2001.

KNIGHT, V.; SANGLIER, J. J.; DITULLIO, D.; BRACCILI, S.; BONNER, P.; WATERS, J.; HUGHES, D.; ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Journal of Applied Microbiology**. v. 62, p. 446-458, 2003.

LEITE, L. H. ; TINTINO, S. R. ; FIGUEREDO, F. G. ; OLIVEIRA, C. D. M. ; SIEBRA, A. L. A. ; SAMPAIO, R. S. ; ATHAYDE, M. L. ; KERNTOPF, M. R. ; COUTINHO, H. D. M. ; MENEZES I.R.A. ; COSTA, J. G. M. Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichia Virgilioides* Kunth (Sucupira) - Fabaceae Papilionoidae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, p. 477-487, 2014.

LEÓN, C. J.; et al. Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad in vitro. **Biomédica**, v. 26, p. 161-168, 2006.

LINS, M. O. **Atividade antimicrobiana e sinérgica de metabólitos de rutaceae**. 2011, 83f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Programa de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

LOPEZ, J. A. Isolation of coumarin in *Zornia diphylla* L. **Ingenieria y Ciencia Quimica**. v. 5, n.3, p. 96, 1981.

LUCENA, B. F. F. ; FIGUEIREDO, F. G. ; TINTINO, S. R. ; OLIVEIRA, C. D. M. ; AQUINO, P. E. A. ; Andrade, J. C. ; Coutinho, H.D.M. ; MATIAS, E. F. F. . Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de aminoglicosídeos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) STAPF. *Acta Biologica Colombiana*, v. 20, p. 39-45, 2015.

MACKAY, M. L.; MILNE, K.; GOULD, I. M.; **Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions**. **International Journal of Antimicrobial Agent**. v. 15, p. 125-129, 2000.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, n. 4, v. 19, 1993.

MATIAS, E. F. F., SANTOS, K. K. A., ALMEIDA, T. S., COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 8, p. 294-298, 2010.

MATOS, F. L. A. Introdução a Fitoquímica Experimental. 2.ed. Fortaleza: UFC, Fortaleza, 1997. p.141.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUJMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, p. 571-577, 2005.

MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I.R.A.; SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D.M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v. 12, n. 1, p. 38 – 43, 2013.

NICOLSON, K.; EVANS, G.; O'TOOLE, P. W. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiol Lett**, v. 179, p. 233 – 239, 1999.

OLIVEIRA, A. D. L.; RODRIGUES, F. F. G.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; IRWIN, R. A. Chemical composition, modulatory bacterial resistance and antimicrobial activity of essential oil the *Hyptis martiusii* Benth by direct and gaseous contact. **Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 9, p. 1-8, 2014.

PASSOS, M. G. V. M. **Avaliação de atividade antimicrobiana de produtos de plantas nativas de regiões do estado da Bahia**. 2007. 156 f. Dissertação (Mestre Em Produtos Naturais E Sintéticos Bioativos)- Programa De Pós-Graduação Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal Da Paraíba, João Pessoa, 2007.

PAULA, C. C. **Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Margaridinha do Campo) e *Macrosiphonia velame* (A. St.-Hil.) Müll. Arg. (Velame Branco)**. 2010. 131f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) PósGraduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

SANTOS, M. G. **Triagem fitoquímica e atividade antiproliferativa do extrato diclorometano-etanólico de raízes de *eriosema crinitum* (Kunth) G. Don (Leguminosae)**. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha, Mucuri, 2014.

SIDDIQUI, R. A.; KHAN, M. S. Y.; CHAGHTAI, S. A.; HASAN, Z. U. Preliminary qualitative organic analysis of *Zornia gibbosa* Span. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 44-45, 1985.

SIDDIQUI, R. A.; KHAN, S. S.; CHAGHTAI, S. A.; HASAN, Z. U; IQBAL, S. A. Study of the natural products from the stem of *Zornia gibbosa* Span. **Oriental Journal of Chemistry**. v. 2, n. 2, p. 160-162, 1986.

SILVA, B. C. V.; REIS, A. L. V.; FERRER, S. R.; GUERREIRO, H. M. N.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S.; Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n.3, p. 355-360, Jun./Jul. 2010.

SILVA, A. D. S.; **Flavonoides de *Zornia Brasiliensis* e atividade antinociceptiva da 7-metoxiflavona**. 2013. 151f. Dissertação (Mestrado em Farmacoquímica de produtos naturais e sintéticos bioativos) Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais E Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, 2013.

SOUZA, D. O.; TINTINO S. R.; FIGUEREDO, F. G.; BORGES, M.C. M.; BRAGA, M, F. B.M.; FELIPE, C. F. B. COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.I MENEZES, I. R. A.; KERNTOPFI, M. R. Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya* Trécul

sobre a ação de aminoglicosídeos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 19, n. 3, 2014.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

TSUCHIYA H.; SATO M.; MIYAZAKI T.; FUJIWARA S.; TANIGAKI S.; OHYAMA M.; TANAKA T.; JINUMA M. Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 50, p. 27 – 34, 1996.

VERAS, H. N. H.; **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia sidoides* CHAM. (VERBENACEAE)**. 2011. 142f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular. Universidade Regional do Cariri- URCA, Crato, 2011.

CAPÍTULO II- Avaliação *in vitro* das atividades antimicrobiana e moduladora de *Zornia reticulata* Sm. frente à bactérias gram negativas

Avaliação *in vitro* das atividades antimicrobiana e moduladora de *Zornia reticulata* Sm. frente à bactérias gram negativas

RESUMO

O extrato etanólico bruto e as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila das folhas de *Zornia reticulata* foram avaliados *in vitro* quanto a atividade antimicrobiana, testadas isoladamente e em combinação com os antibióticos gentamicina e ciprofloxacino, frente à duas espécies de bactérias gram negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo duas linhagens padrão e seis multirresistentes. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada para as amostras vegetais de *Z. reticulata* e para os antimicrobianos convencionais individualmente e em combinação pelo método de microdiluição. A concentração inibitória fracionada (CIF) e os pontos de dados foram representados nos isobogramas para determinar o efeito dessas interações. O extrato etanólico e as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila tiveram atividade antimicrobiana para quase todas as linhagens de bactérias testadas com $CIM \leq 16 \text{ mg.mL}^{-1}$, destacando a fração acetato de etila que apresentou CIM de apenas 2 mg.mL^{-1} frente à *P. aeruginosa* multirresistente. Quando o extrato e as frações foram combinados com antibióticos, ações sinérgicas foram observadas para a maioria das combinações de volumes iguais.

Palavras-chave: Sinergismo; urinana; atividade antioxidante; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

A grande maioria das patologias que acometem os seres humanos tem como responsáveis os microrganismos, dentre eles as bactérias, patógenos facilmente suscetíveis à modificação genética (MEHRAD, 2015). A transferência de genes de resistência de bactérias resistentes para microrganismos não patogênicos ou de baixa patogenicidade provavelmente é um fenômeno comum e natural. Esse fato ganha importância devido às substâncias antimicrobianas terem sua ação seletiva de microrganismos resistentes quando utilizadas de forma abusiva e errônea. O emprego dessas drogas em seres humanos e animais vem possibilitando a disseminação da resistência dos microrganismos, que é tanto maior quanto mais intenso for este uso (BAND; WEISS, 2015). Um exemplo prático de tal afirmação foi feito por Casellas e Tome (1998), que mencionaram em seus estudos que em 1990 quase não existiam cepas de *Klebsiella*, *Staphylococcus* metilina-resistentes e *Pseudomonas aeruginosa* com resistência à ciprofloxacino. Porém, com o uso descontrolado deste fármaco, dados afirmam que em Buenos Aires, já no ano de 1998, 30% das *Klebsiella* e 50% das *P. aeruginosa* e *Staphylococcus* sp. tornaram-se altamente resistentes ao ciprofloxacino, o qual foi descoberto na década de 80.

Segundo Gandee et al. (2015) e Moreno et al. (2013), alguns grupos de bactérias, especialmente *Escherichia coli*, são uma das mais frequentes causas de doenças infecciosas

humanas, sobretudo do trato gastrointestinal, urinário (citotoxinas) e pele. Fagundes-Neto e Scaletsky (2000) complementa que este patógeno é o maior causador de diarreia. Essa patologia é uma das principais causas de morte entre crianças menores de cinco anos em populações de baixa renda de países em desenvolvimento, por produzir enterotoxinas cujas propriedades e seu papel nas doenças diarréicas tem sido amplamente investigado. A atividade de suas citotoxinas na infecção humana já foi identificada especialmente em infecções do trato urinário (TINTINO et al., 2013). *E. coli* está ainda entre os quatro mais prevalentes microrganismos causadores de infecções hospitalares, bem como *Pseudomonas aeruginosa*, classificado como um microrganismo oportunista. *P. aeruginosa* é a principal causa de infecções hospitalares, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos, pois forma um biofilme em que as bactérias ficam protegidas contra as defesas do hospedeiro e antibióticos, sendo esta uma explicação para a cronicidade de algumas infecções oportunistas envolvendo este patógeno (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015). Logo, a intensidade dessas infecções depende da virulência da estirpe contaminante e da susceptibilidade do paciente (FERREIRA; ELIENE, 2010).

O interesse na pesquisa de plantas medicinais tem objetivo de identificar terapias antimicrobianas alternativas e superar a resistência dos microrganismos contra antimicrobianos convencionais. As interações e combinações de produtos naturais com terapias convencionais é uma prática comum e efetiva, realizada em diversas regiões do mundo, onde as plantas medicinais têm um papel central. Estudos realizados vêm mostrando que essas combinações têm resultados satisfatórios como o efeito sinérgico (KALEMBA; KUNICKA 2003; SOUZA et al., 2014)

O termo sinergismo é uma palavra-chave que descreve interações supra-aditiva entre combinações de dois fármacos, duas ou mais plantas, ou de fármacos associado com plantas medicinais. Especificamente, refere-se ao efeito dos produtos em combinação que são numericamente maiores do que o efeito sem a combinação. O método mais comum para avaliar sinergismo é por isobologramas (curva iso-efeito), uma representação gráfica introduzida e popularizada por Loewe (1928, 1953, 1957). Neste método, identifica-se o efeito particular de interesse que é comum a cada uma das substâncias, porque cada um individualmente produz um efeito específico, e fundamenta-se que a presença de uma substância reduz a dose necessária da segunda na produção do seu efeito (KAMATOU et al. 2006). Muitos autores entre eles Rapper et al. (2012), Tallarida et al. (2013) e Hübsch et al. (2014) atribuíram aos seus estudos de atividade moduladora os gráficos de isobologramas.

Nota-se também que produtos naturais apresentam atividade antioxidante. Esses compostos vêm sendo estudados pela sua importância na prevenção de diversas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, entre outras. Os antioxidantes são capazes de fornecer proteção contra a degradação oxidativa pelos radicais livres, além de seu papel em retardar o envelhecimento das células. Atualmente, as substâncias naturais que apresentam atividade antioxidante estão substituindo os antioxidantes sintéticos por apresentarem menos efeitos colaterais tóxicos (TAN; LIN, 2015).

Nessa perspectiva, o uso de plantas medicinais como a espécie *Zornia reticulata* no controle da resistência bacteriana, torna-se uma alternativa relevante. Ela é conhecida popularmente no Brasil como “urinária”, “urinana” e “carrapicho”. É uma planta perene, ereta, com tamanho em torno de 75 cm de altura, composto de folhas alternadas de base assimétrica (DANTAS, 2007). Vários relatos descrevem as atividades biológicas de muitas espécies desse gênero, como ações antibióticas, diuréticas, antioxidantes e anti-inflamatórias. Com esse embasamento e para maior investigação dessa família, objetivou-se neste estudo analisar as propriedades antibacterianas, moduladoras e antioxidantes do extrato etanólico bruto e das frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila obtidas de *Z. reticulata*.

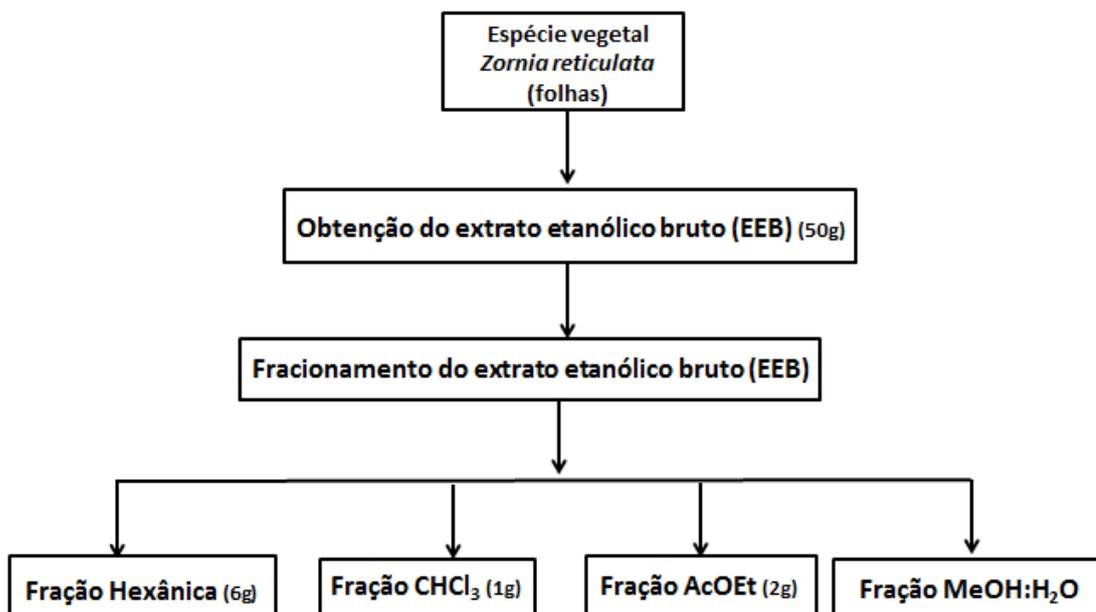
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal, extrato e frações de *Zornia reticulata*

As amostras de *Z. reticulata* foram coletadas na região do compartimento da Borborema-Paraíba, e as folhas foram obtidas de plantas adultas devidamente selecionadas. A exsicata da espécie foi depositada na coleção botânica do herbário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural-CSTR UFCG sob o número 5708.

O material botânico coletado foi seco em estufa a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com ar circulante e posteriormente pulverizado em moinho de facas com granulometria de 10 mesh. Seguindo-se extração com etanol, como líquido extrator, em percolador a temperatura ambiente por 72 horas. As soluções extrativas obtidas foram concentradas em evaporador rotativo 40°C , obtendo-se, assim, o extrato etanólico bruto (EEB). O EEB foi redissolvido em uma solução metanol:água (7:3, v/v), transferindo para uma ampola de separação e, em seguida, foram adicionados os solventes padrão analítico em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila (Figura 3).

Figura 6: Obtenção do extrato etanólico e frações de *Zornia reticulata*



Ensaio microbiológicos

Para determinação da CIM e da atividade moduladora foi utilizado o ensaio de microdiluição em caldo os quais foram realizados de acordo com a metodologia de Eloff (1998) com modificações, e as orientações do CLSI 2012 foram seguidas devido ao uso de antimicrobianos convencionais.

Para esses ensaios foram utilizadas oito bactérias, sendo duas linhagens bacterianas padrões, cepas oriundas da Fundação Oswaldo Cruz, a *E. coli* ATCC 25923 e a *P. aeruginosa* ATCC 27853 e seis bactérias multirresistentes, *E. coli* 4, *E. coli* 5, *E. coli* 6, *E. coli* 7, *P. aeruginosa* 1 e *P. aeruginosa* 3 (figura 4), todas cedidas pela laboratório de Análises Clínicas da UEPB, previamente identificadas, com perfil fenotípico mostrados nas tabelas 9 e 10.

Figura 4: Ensaios microbiológicos realizados

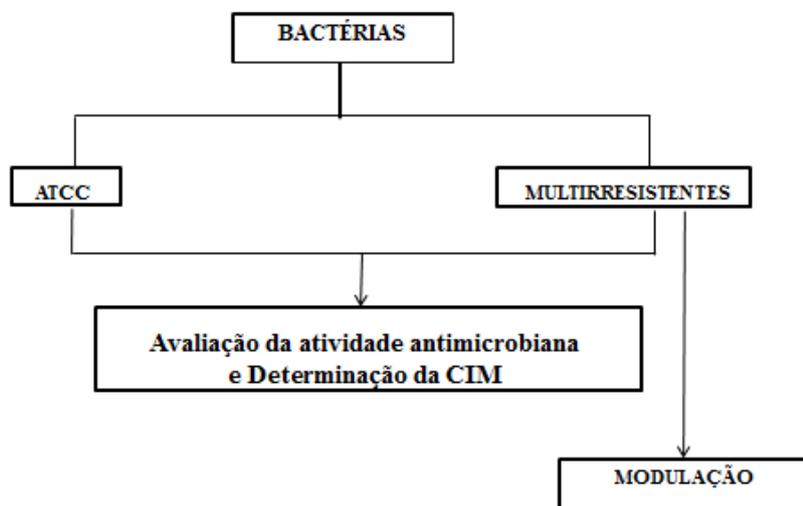


Tabela 9: Perfil fenotípico de resistências aos antimicrobianos em cepas de *Escherichia coli*

Identificação das cepas	Perfil fenotípico
<i>E. coli</i> ATCC 25923	NA (cepa sensível)
<i>E. coli</i> LAC 04	NDX, AMI, CIP, NOR, SFM, TET, AMP, GEN, NIT
<i>E. coli</i> LAC 05	NDX,CIP, CLO, NOR, SFM, TET, AMP, GEN E NIT
<i>E. coli</i> LAC 06	NDX, CFL, CIP, NOR, SFM, TET, AMP, GEN E NIT
<i>E. coli</i> LAC 07	NDX, AMI, AMX, CFL, CPM, CIP, CLO, NOR, SFM, TET, AMP, GEN E NIT

Legenda:NA= não se aplica; NDX= Ácido Nalidixo; CFL = Cefalotina; NIT = Nitrofurantoína; NOR = Norfloxacino; AMP = Ampicilina; CIP = Ciprofloxacino; GEN = Gentamicina; TET = Tetraciclina; CLO = Cloranfenicol; AMI = Amicacina; SFM = Sulfametoxazol + Trimetoprim.

Tabela 10: Perfil fenotípico de resistências aos antimicrobianos em cepas de *Pseudomonasaeruginosa*

Identificação das cepas	Fenótipo de resistência
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	NA (cepa sensível)
<i>P. aeruginosa</i> LAC 01	TOB; CFL; ATM; AMI; CPM; CFO; AMC; CFM;
<i>P. aeruginosa</i> LAC 03	TOB; AMI; SFM; AMP; GEN; NOR; CLI; TET.

Legenda:NA: não se aplica; AMC = Amoxicilina + Ác. Clavulânico; CFL = Cefalotina; ATM = Aztreonam; CFO = Ceftriaxona; CPM = Cefepima; NOR = Norfloxacino; AMP = Ampicilina; CFM = Cefoxitima; GEN = Gentamicina; CLI = Clindamicina; TOB = Tobramicina; AMI =Amicacina; SFM = Sulfametoxazol + Trimetropim; TET = Tetraciclina;

Todos os microrganismos foram mantidos em tubos de ensaio contendo ágar nutriente (Himedia Laboratories Ltda[®]) e 24 horas antes das análises foram cultivados em Agar Mueller Hinton (Himedia Laboratories Ltda.) a 37 °C ± 0,5 °C. Os inóculos foram padronizados em tubos estéreis contendo 5 mL de solução salina a 0,9%. A suspensão microbiana foi ajustada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, para se obter uma concentração de 10⁶ UFC.mL⁻¹, o que equivale a escala 0,5 de McFarland. (CLSI, 2012).

Para os antibióticos e amostras vegetais foram preparadas soluções com água destilada e material estéril na concentração de 10 µg.mL⁻¹ e 32mg.mL⁻¹, respectivamente.

Todos os poços da microplaca foram preenchidos com 100µL de caldo Mueller Hinton, 100µL das amostras (extrato, frações e antibióticos) individualmente foram diluídas em série para determinação da CIM. Para a determinação da atividade moduladora proporções de volumes iguais das amostras foram utilizadas e diluídas sucessivamente. Após adição do inóculo as placas foram incubadas a 37 °C ± 0,5 °C e lidas depois de 24 horas. O crescimento bacteriano foi indicado com a adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina 0,01 % com incubação de 37 °C ± 0,5 °C por 2 horas.

2.2 Concentração inibitória fracionada (CIF)

Foi utilizada a CIF para a avaliação das interações entre as amostras vegetais (extrato e frações) com os antibióticos convencionais. ACIF foi calculada usando a seguinte equação (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011):

$$CIF(i) = \frac{CIM \text{ da combinação}}{CIM \text{ da amostra vegetal independente}}$$

$$CIF(ii) = \frac{CIM \text{ da combinação}}{CIM \text{ do antibiótico convencional independente}}$$

A ΣCIF foi calculada usando a equação: ΣCIF = CIF (i) + CIF (ii). As interações foram classificadas como sendo sinérgica para valores ΣCIF ≤0,5, em que o efeito resultante da combinação é significativamente maior do que a soma dos efeitos individuais; aditivo (0,5 ≥ ΣCIF ≤ 1,0) quando substâncias adicionadas juntas apenas melhoraram o desempenho; indiferente (1,0 > ΣCIF ≤ 4,0) quando dois agentes combinados não mostraram nem um efeito aditivo nem antagônico, apenas um efeito linear; e antagônica (ΣCIF >4,0) quando o efeito

geralfor menor do que a soma dos seus efeitos individuais (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011). Para amostras com valores de CIM maior do que a concentração máxima testada não foi possível calcular Σ CIF, apenas denominado por ND (não determinado)

2.3 Construção de isobogramas

Para interações sinérgicas ou antagônicas notáveis, várias combinações (antimicrobiano convencional: amostra vegetal) com nove diferentes proporções foram preparadas (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7; 2:8 e 1:9) e os valores de CIM determinados, pois as interações podem variar dependendo na proporção em que as duas substâncias estão combinados. As amostras foram combinadas em concentrações fixas de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para antibióticos convencionais e 32mg.mL^{-1} para amostras vegetais, em várias combinações de volume o que resultou em razões de concentrações variáveis, como esquematizado na tabela 11.

Tabela 11: Concentrações das razões usadas na associação de antibióticos convencionais e amostras vegetais de *Zornia reticulata* na atividade moduladora

Volume das razões do antibiótico convencional: amostra vegetal (μL)	Concentração do antibiótico ^a em combinação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração das amostras vegetais ^b em combinação (mg.mL^{-1})
90:10	9,00	3,2
80:20	8,00	6,4
70:30	7,00	9,6
60:40	6,00	12,8
50:50	5,00	16,0
40:60	4,00	19,2
30:70	3,00	22,4
20:80	2,00	25,6
10:90	1,00	28,8

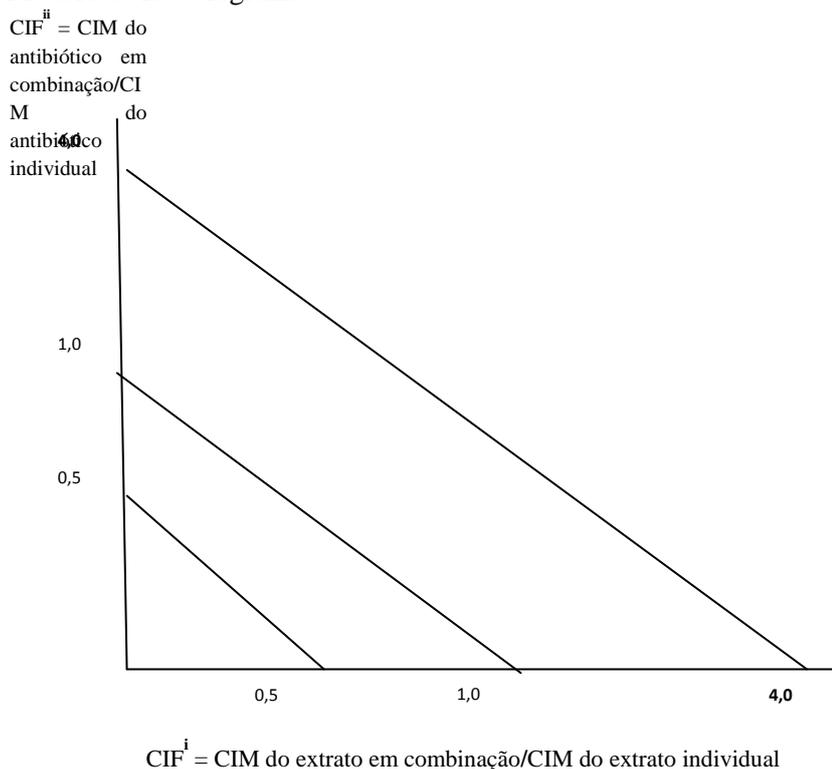
^a gentamicina/ciprofloxacino

^b extrato etanólico bruto/ fração hexânica/ fração clorofórmica/ fração acetato de etila

Os pontos de dados para cada relação estudada foram plotados em um isobograma usando Excel 2010. A construção de isobogramas permitiu a identificação do agente mais responsável pelos efeitos sinérgicos ou antagônicos dentro da combinação. A interpretação foi determinada da seguinte forma. Os pontos de dados abaixo da linha 0,5: 0,5 indicava sinergia, enquanto que aquelas acima desta primeira linha, até a linha 1,0: 1,0 indicava uma

interação aditiva. Os pontos de dados acima desta segunda linha (1,0: 1,0) até a 4,0: 4,0 indicava uma não interação entre as amostras, ou seja, que a combinação é indiferente, os pontos de dados acima da linha 4,0: 4,0 indicava antagonismo(figura 6) (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011).

Figura 7: Modelo de Isoblograma



Fonte: VAN VUUREN; VILJOEN, 2011.

2.4 Atividade antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante das amostras do extrato etanólico bruto e de suas frações foi avaliada usando a capacidade de sequestrar radicais livres do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), seguindo a metodologia de Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Wang (2013) com modificações. Os padrões quercetina e ácido gálico foram usados na curva de calibração nas concentrações de 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. 30 μL de uma solução de etanol a 0,2mM de DPPH foram adicionadas aos padrões quercetina e ácido gálico, e nas soluções das amostras vegetais (extrato e frações) nas concentrações de 200-3,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As soluções permaneceram à temperatura ambiente, com ausência de luz e por um período de 30 minutos para ocorrer a reação. Após esse tempo os valores de absorvância foram medidas a 517 nm, em espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV-mini-1240 e a atividade antioxidante foi determinada. Os testes foram realizados em triplicata e os dados foram avaliados por meio

de análise de regressão. A partir da linha de regressão, os valores de IC50 foram determinados como a percentagem da capacidade sequestrante de radicais livres para 50% de atividade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A gentamicina é um agente antimicrobiano da classe dos aminoglicosídeos, com estreito espectro de ação, que tem atividade esperada principalmente contra microrganismos gram negativos, podendo mostrar alguma atividade nos gram positivos (MARTINS, 2005). Os resultados obtidos neste estudo mostraram valores de CIM para gentamicina entre 0,15 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, (Tabela 12), bem próximo ao que Hübsch (2014) constatou, na qual a concentração inicial foi de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ quando testados contra agentes patogênicos dessas mesmas espécies, determinando-se uma eficácia antimicrobiana entre 0,008 e 2,048 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ciprofloxacino é um antibiótico de largo espectro, com atividade contra bactérias gram negativas e gram positivas (PITA; PRATES; FERRAZ, 2004). No estudo de Hübsch, (2014) também foi usado o ciprofloxacino preparado a uma concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a faixa de valores da CIM determinada da eficácia antimicrobiana frente os patógenos selecionados estava entre 0,004 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados obtidos neste estudo para este antibiótico, também mostraram valores da CIM todos dentro dessa faixa. O menor valor de CIM foi de 0,08 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *E. coli* padrão. O maior valor da CIM, que foi possível determinar, foi de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ frente a *E. coli* multirresistente 6 como apresentado na tabela 12.

Tabela 12: Concentração inibitória mínima (CIM) para os antibióticos convencionais testados separadamente

Bactérias teste	Antibiótico convencional	
	Gentamicina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Ciprofloxacino ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,25	1,25
<i>P. aeruginosa</i> LAC 01	0,15	0,63
<i>P. aeruginosa</i> LAC 03	5,00	>5,00
<i>E. coli</i> ATCC 25923	1,25	0,08
<i>E. coli</i> LAC 04	2,50	>5,00
<i>E. coli</i> LAC 05	3,75	>5,00
<i>E. coli</i> LAC 06	2,50	2,50
<i>E. coli</i> LAC 07	>5,00	>5,00

Legenda: > 5,0 = amostras de antimicrobianos que não foram testadas em concentrações mais elevadas para a determinação de um valor de CIM.

Os resultados da CIM para as amostras de *Z. reticulata* testadas como agente antimicrobiano foram registradas na tabela 13. Em geral, a maior parte das amostras mostrou uma forte atividade antimicrobiana contra as linhagens patogênicas avaliadas. A melhor atividade antimicrobiana exibida nesse estudo para as amostras vegetais frente à linhagem multirresistente foi a da fração de acetato de etila frente à cepa de *P. aeruginosa* 01 com valor de CIM de 2 mg.mL⁻¹. Fabry; Okemo; Ansorg (1998) definem que amostras vegetais são ativas quando tem valores de CIM <8 mg.mL⁻¹.

Tabela 13: Concentração inibitória mínima (CIM) das amostras de *Zornia reticulata* testadas separadamente

Bactérias teste	Amostras teste			
	EEB (mg.mL ⁻¹)	F. Hex (mg.mL ⁻¹)	F. CHCL ₃ (mg.mL ⁻¹)	F. AcOEt (mg.mL ⁻¹)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	4	16	2	5
<i>P. aeruginosa</i> LAC 01	12	8	16	2
<i>P. aeruginosa</i> LAC 03	>16	>16	8	4
<i>E. coli</i> ATCC 25923	8	16	16	16
<i>E. coli</i> LAC 04	16	16	16	16
<i>E. coli</i> LAC 05	12	16	ND	16
<i>E. coli</i> LAC 06	16	16	16	16
<i>E. coli</i> LAC 07	>16	>16	>16	>16

Legenda: Extrato Etanólico Bruto (EEB); Fração Hexânica (F. Hex); Fração Clorofórmica (F. CHCL₃); Fração Acetato de Etila (F. ACOEt).

Foi avaliado um total de 64 combinações para possível ação sinérgica. Estas foram compostas por uma associação de quatro amostras de extrato e de frações com dois antimicrobianos convencionais, os quais foram testados frente a oito diferentes agentes patogênicos. Os dados obtidos dessas combinações foram resumidos na tabela 14.

Tabela 14: CIM das amostras vegetais (mg.mL^{-1}) e dos antibióticos convencionais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) combinados frente às cepas de bactérias gram negativas

Combinações	<i>P.aeruginosa</i> ATCC (27853)		<i>P. aeruginosa</i> 1		<i>P.aeruginosa</i> 3		<i>E.coli</i> ATCC (25923)		<i>E. coli</i> 4		<i>E. coli</i> 5		<i>E. coli</i> 6		<i>E. coli</i> 7	
	Av	Σ CIF	Av	Σ CIF	Av	Σ CIF	Av	Σ CIF	Av	Σ CIF	Av	Σ CIF	Av	Σ CIF	Av	Σ CIF
	Ant	(class)	Ant	(class)	Ant	(class)	Ant	(class)	Ant	(class)	Ant	(class)	Ant	(class)	Ant	(class)
EEB+ Cipro	0,50	0,25	1,00	0,56	ND	ND	0,13	0,50	ND	ND	0,50	0,07	4,00	0,75	ND	ND
	0,16	(sin)	0,32	(adit)			0,04	(sin)			0,16	(sin)	1,25	(adit)		
EEB+ Gen	1,00	0,37	0,50	0,50	ND	ND	1,00	0,37	2,00	0,37	4,00	0,99	0,50	0,09	ND	ND
	0,16	(sin)	0,07	(sin)			0,31	(sin)	0,63	(sin)	1,25	(adit)	0,16	(sin)		
F. Hex + Cipro	0,13	0,04	1,00	0,63	ND	ND	0,13	0,50	ND	ND	ND	ND	2,00	0,74	ND	ND
	0,04	(sin)	0,32	(adit)			0,04	(sin)					0,60	(adit)		
F. Hex + Gen	0,13	0,03	0,25	0,29	ND	ND	1,00	0,30	2,00	0,37	8,00	1,10	8,00	1,10	ND	ND
	0,04	(sin)	0,04	(sin)			0,31	(sin)	0,63	(sin)	2,50	(ind)	2,50	(ind)		
F. CHCl ₃ + Cipro	ND	ND	0,18	0,09	ND	ND	0,25	1,00	ND	ND	ND	ND	16,00	2,20	ND	ND
			0,05	(sin)			0,08	(adit)					5,00	(ind)		
F. CHCl ₃ + Gen	0,50	0,31	1,00	2,10	2,00	0,37	2,00	0,60	4,00	0,75	ND	ND	1,00	0,06	ND	ND
	0,08	(sin)	0,31	(ind)	0,65	(sin)	0,63	(adit)	1,25	(ind)			0,31	(sin)		
F. AcOEt + Cipro	0,50	0,22	1,00	1,00	ND	ND	0,13	0,50	ND	ND	ND	ND	1,00	0,37	ND	ND
	0,16	(sin)	0,32	(adit)			0,04	(sin)					0,31	(sin)		
F. AcOEt + Gen	0,50	0,16	0,13	0,32	1,00	0,31	1,00	0,19	2,00	0,37	16,00	1,72	0,50	0,09	ND	ND
	0,78	(sin)	0,04	(sin)	0,31	(sin)	0,31	(sin)	0,625	(sin)	5,00	(ind)	0,16	(sin)		

Legenda: Não determinado (ND); sinergismo (sin); aditivo (adt); indiferente (ind); amostra vegetal (Av); Antibiótico (Ant); classificação (class); Soma da concentração inibitória fracionada (Σ CIF); Ciprofloxacino (Cipro); Gentamicina (Gen); Extrato Etanólico Bruto (EEB); Fração acetato de etila (F. AcOEt); Fração Clorofórmica (F. CHCl₃); Fração hexânica (Hex).

O extrato etanólico bruto e as frações em combinação com os antimicrobianos convencionais demonstraram perfis de interação principalmente sinérgicos e aditivos. Interações antagônicas não foram relatadas quando combinados volumes iguais da amostra vegetal com o antibiótico. Não foi possível obter resultados de algumas interações, pois os valores da CIM obtidos eram maiores do que o preconizado para a análise; Valores de CIM para amostras vegetais $>16 \text{ mg.mL}^{-1}$ e/ou valores de CIM para antibióticos $>5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, não prosseguiram e foram identificados como ND (não-determinado). Das 64 combinações, 41 foram classificadas pela ΣCIF , e dentre essas 66% foram sinérgicas, 20% aditivas e apenas 14% não apresentaram nenhuma interação, sendo que nenhuma foi antagônica.

Comparando os valores da CIM dos antibióticos isolados na tabela 12 com as CIM deles em associação (tabela 14), verificou uma queda significativa na concentração necessária para inibição. A CIM da gentamicina foi de $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ para inibir o crescimento da *P. aeruginosa* 3 e essa concentração diminuiu para $0,31 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,65 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ quando associado com as frações AcOEt e CHCl_3 , respectivamente. Coutinho et al. (2008) também encontraram valores de CIM da gentamicina menores, frente à *E. coli*, quando associados com vegetais, em comparação com a CIM individual.

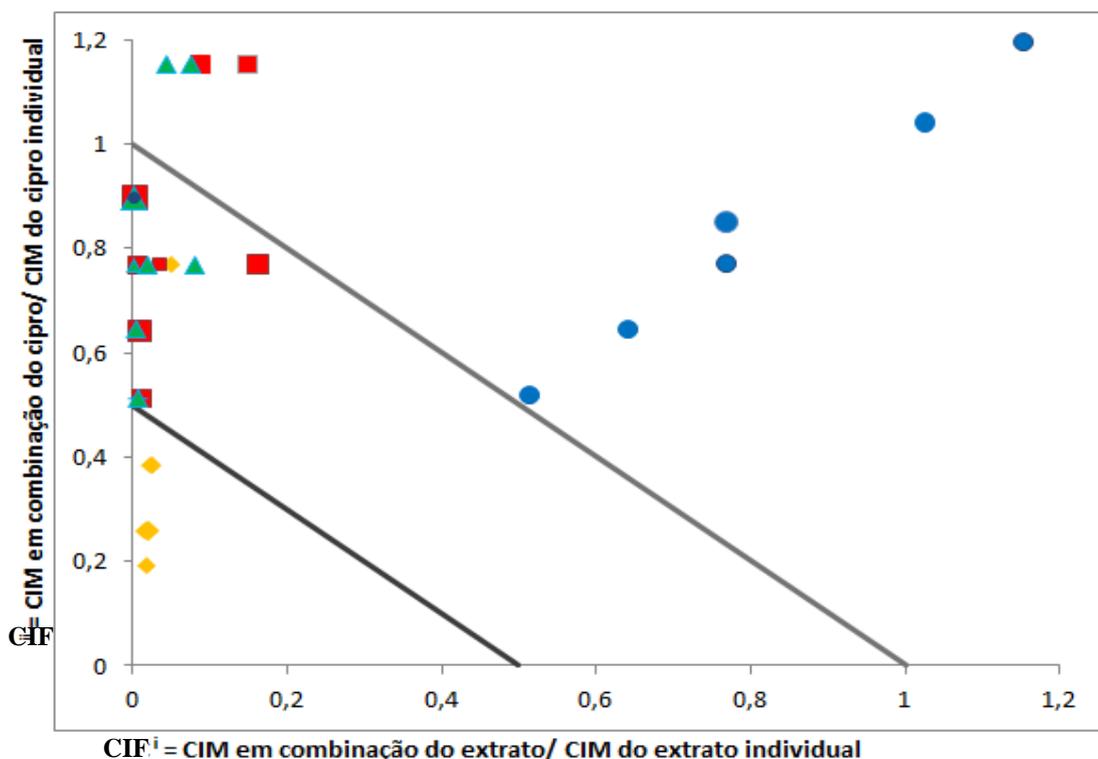
A combinação das amostras vegetais com ciprofloxacino proporcionou um notável perfil de interação, quando testados frente às diferentes cepas de *E. coli*, principalmente a ATCC e a *E. coli* 6.

Curiosamente, quando testados individualmente, os extratos vegetais apresentaram valores de CIM entre $2,0$ e $16,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Tabela 13), demonstrando atividade antimicrobiana, porém não tão relevante, quando combinadas com ciprofloxacino, em que todos os extratos exibiram notável atividade antimicrobiana demonstrando, assim, uma interação sinérgica, com valores da CIM na sua maioria $< 1 \text{ mg.mL}^{-1}$. Quando testados frente a *E. coli* padrão os valores da CIM do ciprofloxacino sozinho é de aproximadamente $0,08 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ e, em combinação, diminuiu pela metade para $0,04 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, com quase todos as amostras vegetais. A CIM das frações hexânica e acetato de etila exibiram os melhores resultados, diminuindo de 16 mg.mL^{-1} para $0,13 \text{ mg.mL}^{-1}$, provando que interações de drogas convencionais com plantas podem tanto aumentar a eficácia do fármaco como proporcionar diminuição da concentração usual. E, por consequência, diminuir os efeitos indesejáveis (SALVAT et al, 2001). Portanto, os valores da CIM em combinação foram muito inferiores aos valores da CIM das amostras (vegetais e antibióticos convencionais), quando testados individualmente, principalmente quando as razões eram de volumes iguais (1:1). Deste modo, foram feitos também análises com

concentrações variáveis das amostras, combinações com nove diferentes volumes, o que permitiu a identificação do agente mais responsável pelos efeitos sinérgicos ou antagônicos dentro da combinação, e o quanto que o efeito sinérgico é dependente da dose através da construção do isoblograma.

A figura 7 mostra a representação gráfica das amostras vegetais com o ciprofloxacino frente à cepa de *E. coli* ATCC (25923). A maioria dos pontos de dados foi encontrada na região do isoblograma que indica efeito sinérgico ou aditivo (<1). Apenas as combinações com a fração clorofórmica e as razões, 2:8 e 1:9, da fração hexânica e do extrato etanólico tiveram efeito indiferente. Nenhuma das combinações apresentou antagonismo. Essa diminuição da atividade antimicrobiana quando se tem proporções maiores das amostras vegetais pode ser explicado por Behling et al. (2004), que afirma que o efeito antioxidante inerente aos flavonoides provoca uma quelação mútua quando vegetais são combinados com antibióticos em concentrações elevadas, prejudicando a atividade antimicrobiana, que ambos apresentam quando combinados em proporções de volumes e concentrações menores da amostra vegetal.

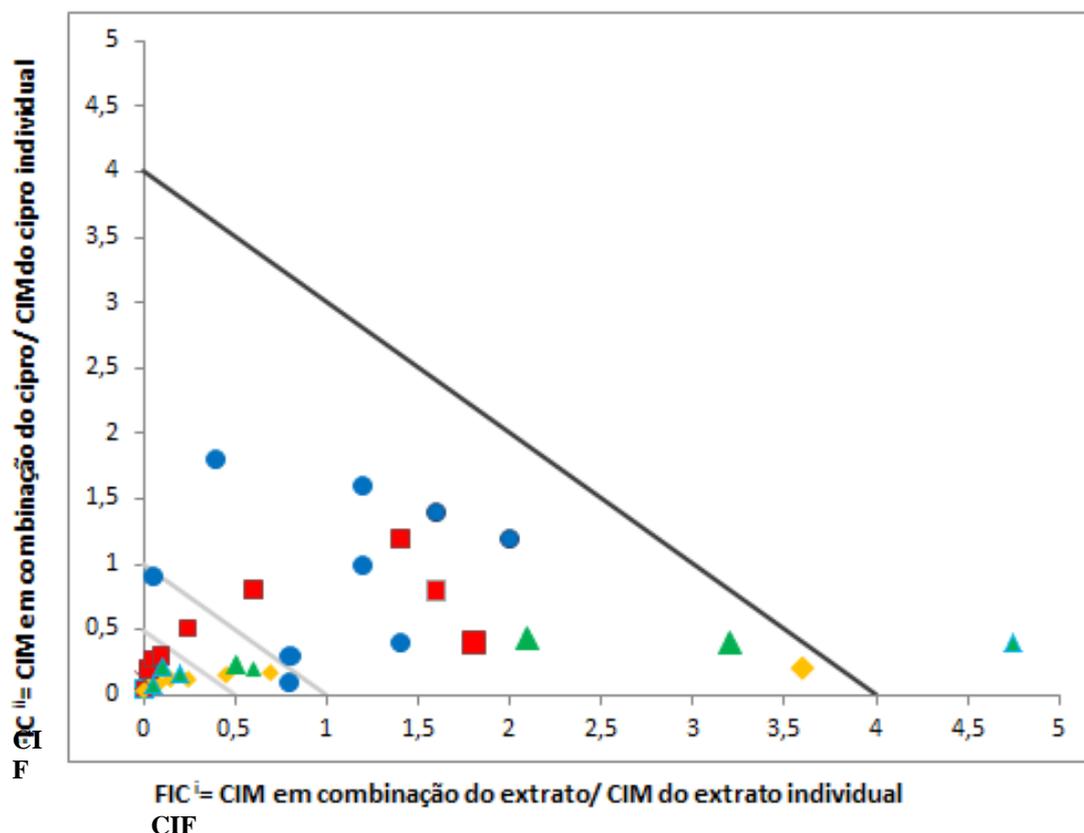
Figura 8: Isoblograma para *Zornia reticulata* em combinação com o ciprofloxacino, em diferentes concentrações, frente *E. coli* ATCC 25923



Legenda: (■ = extrato etanólico bruto; ● = fração clorofórmica; ▲ = fração hexânica; ◆ = fração acetato de etila)

As combinações das amostras vegetais e do antibiótico ciprofloxacino, frente à linhagem de *E.coli* 6, em suas variadas proporções também mostraram na maioria efeito sinérgico conforme figura 8 em que os pontos encontram-se abaixo da linha 0,5:0,5.

Figura 9: Isoblograma para *Zornia reticulata* em combinação com o ciprofloxacino, em diferentes concentrações, frente *E. coli* 6



Legenda: (■ = extrato etanólico bruto; ● = fração clorofórmica; ▲ = fração hexânica; ◆ = fração acetato de etila)

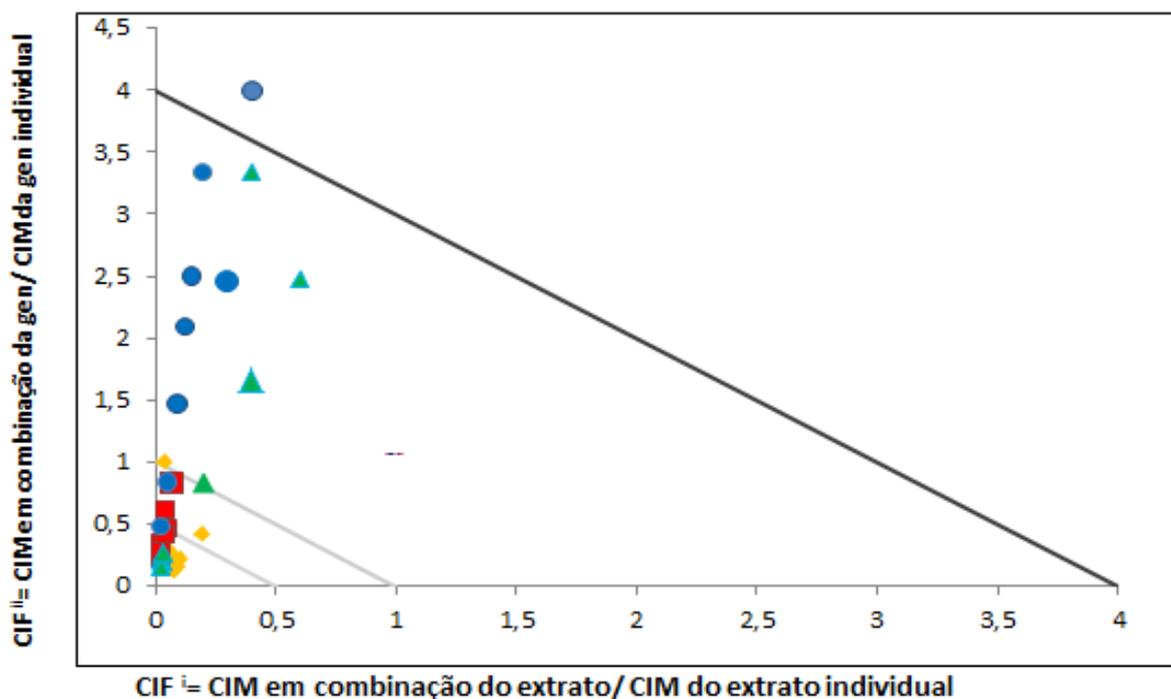
Essas interações sinérgicas identificadas pela combinação das amostras vegetais de *Z. reticulata* com o ciprofloxacino para o tratamento da infecção urinária, mostra uma alternativa terapêutica e uma ajuda na prevenção da resistência de *E. coli* este antibiótico, pois, esta resistência é uma preocupação mundial e crescente. A baixa susceptibilidade da *E. coli* também já está ocorrendo para outros tratamentos antimicrobianos, e, portanto, há uma necessidade urgente de identificar um tratamento alternativo para estas infecções (ARSLAN et al., 2005). Interações sinérgicas com o ciprofloxacino também é relatada por Hübsch et al. (2014), em associação com as espécies de *Agathosma betulina* (extrato aquoso e orgânico e óleo essencial), *Artemisia afra* (extrato orgânico e óleo

essencial), *Lippia javanica* (extrato orgânico e óleo essencial) e *Sutherlandia frutescens* (extrato orgânico).

Estudos mais aprofundados de validação lateral em relações quantitativas entre estrutura dos agentes combinados é sugerido por Montanari e Montanari(2000). Testes *in vivo* de atividade antimicrobiana e de toxicidade devem também ser realizados para comprovar esta eficácia e apoiar os resultados *in vitro* observados até aqui.

Outra combinação que foi realizada e tem relevante importância clínica é a associação das amostras vegetais com a gentamicina frente às linhagens padrão e multiresistente de *P. aeruginosa*. Essa bactéria pode causar infecções nosocomiais graves, com elevada letalidade. Relatos de redução da susceptibilidade da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos vêm sendo publicados no Brasil e em outros países destacando-se a diminuição de sensibilidade a vários antibióticos até mesmo os de largo espectro de ação (FIGUEIREDO, 2007). As combinações das amostras vegetais com a gentamicina frente à *P. aeruginosa* 1, observam-se majoritariamente interações sinérgicas e aditivas, avaliadas a partir do valor da Σ CIF. Os pontos 3:7; 2:8 e 1:9 da fração hexânica e os 6:4 até 2:8 da fração clorofórmica apresentaram interações indiferentes, em que o efeito de um não interfere no outro. Já os efeitos antagônicos, em que um prejudica o efeito do outro, foram relatados na proporção de 1:9 da fração clorofórmica (Figura 9).

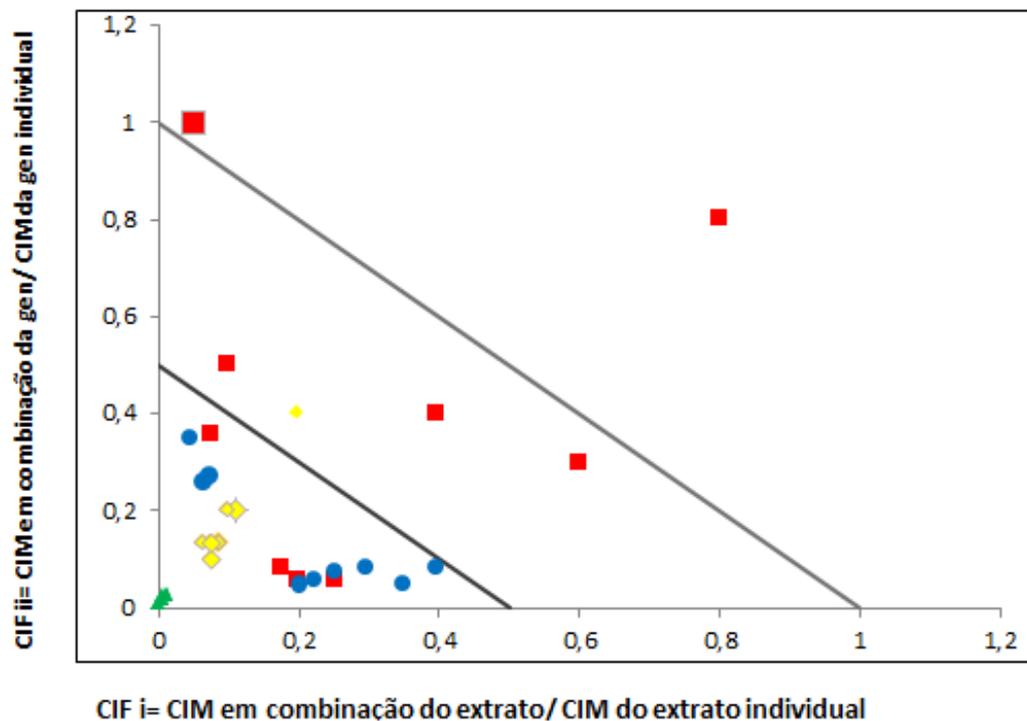
Figura 10: Isoblograma para *Zornia reticulata* em combinação com a gentamicina, em diferentes concentrações, frente *P. aeruginosa* 1



Legenda: (■ = extrato etanólico bruto; ● = fração clorofórmica; ▲ = fração hexânica; ◆ = fração acetato de etila)

Os estudos das proporções variadas nas concentrações das amostras vegetais com a gentamicina frente à *P. aeruginosa* ATCC não demonstraram nenhum antagonismo. A maioria das combinações resultou em interações sinérgicas com valores de Σ CIF entre 0,03 e 0,4. Apenas, duas interações indiferentes foram observadas (Figura 10). No estudo de Tintino et al. (2013), a atividade moduladora do extrato etanólico e hexânico de raiz de *Costus cf. arabicus* também foi associado ao aminoglicosídeo gentamicina frente à cepa de isolados clínicos de *P. aeruginosa* e *E. coli*, porém nenhum efeito sinérgico foi relatado. Efeito sinérgico foi relatado no estudo de Brito (2011), com esse mesmo aminoglicosídeo associado aos extratos e óleo essencial da leguminosa *Cajanus cajan*.

Figura 11: Isobolograma para *Zornia reticulata* em combinação com a gentamicina, em diferentes concentrações, frente *P. aeruginosa* ATCC 27853



Legenda: (■ = extrato etanólico bruto; ● = fração clorofórmica; ▲ = fração hexânica; ◆ = fração acetato de etila)

Há diferenças entre os resultados, quando as combinações são comparadas para uma bactéria padrão ATCC, em relação a uma bactéria multirresistente, porém é possível verificar combinações sinérgicas nos dois casos. Para *P. aeruginosa* 1 foi a fração acetato de etila que se destacou e para *P. aeruginosa* ATCC a fração hexânica teve melhor resultado de modulação com a gentamicina com valores de $\sum \text{CIF} \leq 0,5$ para todas as proporções, mostrando ter segurança na eficácia tanto com concentrações maiores ou menores da fração acetato de etila.

A resistência das *P. aeruginosa* se dá principalmente pela produção de enzimas beta-lactamases e metallo-beta-lactamases, sendo também susceptível a resistência cruzada aos antimicrobianos quando ocorre o uso de múltiplos fármacos. Em interações com um vegetal o desenvolvimento de resistência dos microrganismos é dificultada, pois os extratos vegetais tem caráter hidrofóbico que interagem na bicamada lipídica da membrana celular levando ao aumento da fragilidade do microrganismo ao antibiótico (BURT, 2004 ; MATIAS et al., 2010).

Os resultados indicam que o extrato e as frações de *Z. reticulata* foram eficazes em potencializar a ação antibacteriana dos antibióticos convencionais gentamicina e ciprofloxacino, frente aos microrganismos avaliados, certificando que plantas medicinais que

possuem compostos com reconhecida atividade antibacteriana podem modular a ação de antibiótico como relatado por Endo et al.(2010),Iwazaki et al.(2010), Okusa et al. (2007),Silva et al.(2015), Coutinho et al. (2009; 2010), Morais-Braga et al.(2013), Tintino et al.(2013)dentre outros, evidenciando a possibilidade do uso de produtos naturais de *Z. reticulata* como agente modulador para gentamicina e ciprofloxacino frente linhagens de bactérias resistentes.

Na determinação da atividade antioxidante o ensaio de DPPH tem sido amplamente utilizado tanto para análise de compostos antioxidantes puros como para diferentes extratos de plantas. O resultado foi expresso por IC50 que mede o quão forte é a capacidade antioxidante daquele composto.Quanto menor o IC50, maior a capacidade de redução do DPPH em 50%. Para a avaliação da atividade antioxidante de *Z. reticulata*, seu extrato e suas frações tiveram sua capacidade sequestrante de radicais livres medidas e comparadas com os padrões (Tabela 15). Entre as quatro amostras, a atividade de eliminação de radicais foi maior para a fração de acetato de etila com o menor valor médio de IC50 de 53,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido pela fração clorofórmica(193,76 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), extrato etanólico bruto (202,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e fração hexânica (213,18 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).A atividade antioxidante um pouco melhor da fração de acetato de etila em relação às demais pode ser justificada pelo maior teor de compostos fenólicos e flavonoides encontrados nesta fração. O DPPH é um radical livre estável e sua ação sequestrante deve-se à apreensão de um radical hidrogênio de compostos presentes nos extratos e frações, que são geralmente compostos fenólicos. Leite et al. (2014), avaliou o potencial antioxidante e quantificou fenóis e flavonoides presentes nos extratos de *Psidium guajava* L. var. pyriferia e *Psidium guajava* L. var. pomifera e verificou que esta apresentou maior capacidade antioxidante, assim como maior teor de fenóis e flavonoides. Em outros estudos com diferentes plantas Souza et al. (2014), também afirma que o extrato etanólico de *Eugenia uniflora* tem elevada presença de flavonoides e maior capacidade antioxidante quando comparada a *Psidium sobleleanum*.

Tabela 15: Atividade antioxidante de *Zornia reticulata*

	PADRÕES			AMOSTRAS		
	Ácido gálico	Quercetina	EEB	F. Hex	F. AcOEt	F. CHCl ₃
IC50($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	3,37	5,37	202,15	213,18	53,37	193,76

Legenda: Extrato Etanólico Bruto (EEB); Fração Hexânica (F. Hex); Fração Clorofórmica (F. CHCl₃); Fração Acetato de Etila (F. AcOEt).

4 CONCLUSÃO

A *Z. reticulata* mostrou ser uma via alternativa na busca de compostos que potencializam ação de drogas antimicrobianas, de modo que quando testada com bactérias Gram negativas, observou-se sinergismo em combinação com as drogas, assim como também foi observado potencial antioxidante principalmente na fração acetato de etila. Estes dados são promissores e incentivam mais estudos com esta planta, para assim, apoiar as suas possíveis utilizações em terapias antioxidantes e, principalmente, antimicrobianas e moduladoras. Portanto, a *Z. reticulata* apresenta-se como um agente modulador da atividade antimicrobiana, sendo um produto natural que pode representar uma alternativa interessante nos esforços para combater doenças infecciosas causadas por bactérias resistentes aos antibióticos atuais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando-se as análises realizadas nesse trabalho pode-se afirmar que a espécie *Z. reticulata* é uma planta medicinal com atividades biológicas relevantes. A fração acetato de etila é a que apresenta maior quantidade de flavonoides e isso justifica seu potencial antioxidante, porém, outros ensaios de atividade antioxidante por TBAR (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), por inibição de peroxidação lipídica, por óxido nítrico e por FRAP (capacidade antioxidante total) devem ser realizados para confirmar essa ação biológica. As amostras vegetais da *Z. reticulata* apresentaram atividade antimicrobiana frente a maioria das bactérias testadas, entre elas, cepas padrão ATCC e multirresistente de *S. oralis*, *S. mutans*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Na análise dessas amostras vegetais como modificadores da atividade antibiótica o efeito sinérgico prevaleceu entre as inúmeras combinações realizadas. E, além de tudo, no ensaio de citotoxicidade, essa planta teve baixo índice de potencial hemolisante, principalmente na fração clorofórmica. Contudo, é necessário também que outros ensaios

toxicológicos sejam realizados. Na análise cromatográfica realizada, com os padrões de ácido caféico, ácido gálico, canferol, catequina, rutina e quercetina, não foi possível identificar esses compostos em todas as amostras da planta. Outros padrões flavonoídicos devem ser investigados em estudos futuros para, assim, identificar o possível marcador quimiotaxonomico de *Z. reticulata*. Os produtos vegetais derivados de *Z. reticulata* tem grande probabilidade de serem alternativas na problemática das infecções e da resistência dos microrganismos.

REFERÊNCIAS

- ARSLAN, H.; AZAP, O. K.; ERGÖNÜL, O.; TIMURKAYNAK, F. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, n. 5, p. 914 – 918, 2005.
- BAND, V. I.; WEISS, D. S. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics (Basel)**. v. 4, n. 1, p. 18-41, 2015.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M.; C, FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentos e Nutrição**. v.15, n. 3, p. 285-92, 2004
- BRITO, S. S.; **Estudo químico e biológico de *Cajanus cajan* (L.) Millsp (FABACEAE)**. 2011. 111f. Dissertação (Mestrado em Bios prospecção Molecular)-Programa de Pós Graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, 2011.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, p. 223-253. 2004.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty- Second Informational Supplement, ninth ed. Document M100– S22. Pensilâvnia, USA: NIH.
- CASELLAS, J. M.; TOME G. Resistencia a los antibióticos: algo facil de lograr pero difícil de perder. **Epidemiologia Y Vacunas** v. 2, p. 1-6, 1998.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy (Basel)**, v. 54, p. 328-330, 2008.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; SILVA, V. S.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 24-27, 2009.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA-JR, J. P. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 131, p. 106-108, 2010.
- DANTAS, I.C. **O raizeiro**. Campina Grande: EDUEP, 2007.
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**. v. 64, 1998.

ENDO, E. H.; CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**. v. 161, p. 534-540, 2010.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. **São Paulo Medical Journal**. v. 118, n. 1, p. 21–29, 2000.

FERREIRA, H.; ELIENE, R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Pan-americana Infectologia**. v. 12, p. 44-50 2010.

FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H.; MACIEL, M. A. V.; VILAR, M. C. M.; LOUREIRO, G. N.; PEREIRA, R. G. *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE **Revista Brasileira Terapia Intensiva**. v.19, n.4, Out./Dez. 2007.

FABRY, W.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 60, p. 79–84, 1998.

GANDEE, L.; HSIEH, J.T.; SPERANDIO, V.; MOREIRA, C. G.; LAI, C. H.; ZIMMERN, P. E. The efficacy of immediate versus delayed antibiotic administration on bacterial growth and biofilm production of selected strains of uropathogenic *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **International Brazilian journal of urology**. v.41, n. 1, p. 67-77, 2015

HÜBSCH, Z. **Antimicrobial efficacy and toxicity profiles of conventional antimicrobial agents in combination with commercially relevant southern African medicinal plants**. 2014. 198f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) Universidade de Witwatersrand, Johannesburg, 2014.

HÜBSCH, Z.; VAN ZIL, R. L.; COCK, I. E.; VAN VUUREN, S. F. Interactive antimicrobial and toxicity profiles of conventional antimicrobials with Southern African medicinal plants. **South African Journal of Botany**. v. 93, p. 185-197, 2014.

IWAZAKI, R. S. et al. In vitro antifungal activity of the berberine and its synergism with fluconazole. **Antonie van Leeuwenhoek (Gedrukt)**. v. 97, p. 201-205, 2010.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**. v. 10, n. 10, p. 813–829, 2003.

KAMATOU, G. P. P.; VIJOEN, A. M.; VAN VUUREN, S. F. VAN ZYL, R. L. In vitro evidence of antimicrobial synergy between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonoru*. **South African Journal of Botany**. v. 72, p. 634-636, 2006.

LEITE, L. H. ; TINTINO, S. R. ; FIGUEREDO, F. G. ; OLIVEIRA, C. D. M. ; SIEBRA, A. L. A. ; SAMPAIO, R. S. ; ATHAYDE, M. L. ; KERNTOPF, M. R. ; COUTINHO, H. D. M. ; MENEZES I.R.A. ; COSTA, J. G. M. Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichia Virgilioides Kunth* (Sucupira) - Fabaceae Papilionoidae. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 13, p. 477-487, 2014.

- LOEWE, S. Die quantitativen probleme der pharmakologie. **Ergebn Physiol.** v. 27, p. 47-187. 1928.
- LOEWE, S. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. **Arzneimittelforschung.** v. 3, p. 285-290, 1953.
- LOEWE, S. Antagonisms and antagonists. **Pharmacol Rev.** v. 9, p. 237-242, 1957.
- MARTINS, M. A. P.; STARLING, S. M.; BORGES, S. A. Utilização de gentamicina no tratamento de neonatos atendidos em uma maternidade pública da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais (1999). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 41, n. 1, jan./mar., 2005.
- MATIAS, E. F. F., SANTOS, K. K. A., ALMEIDA, T. S., COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências.** v. 8, p. 294-298, 2010.
- MEHRAD, B.; CLARK, N. M.; ZHANEL, G. G.; LYNCH, J. P. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Contemporary Reviews in Critical Care Medicine-Chest.* v. 147, n. 5, p. 1413-21, 2015
- MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 28, n. 3, p. 565-591, 2015.
- MONTANARI, M. L. C.; MONTANARI, C. A. Validação lateral em relações quantitativas entre estrutura e atividade farmacológica, qsar. **Química Nova.** v. 25, n. 2, p. 231-240, 2002.
- MORAIS-BRAGA, M. F. B.; SOUZA, T. M.; SANTOS, K. K. A.; GUEDES, G. M. M.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I.R.A.; SARAIVA, A. Á. F.; COUTINHO, H. D.M. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.** v. 12, n. 1, p. 38 – 43, 2013.
- MORENO, P. R. H.; COSTA-ISSA, F. I. C.; RAJCA-FERREIRA, A. K.; PEREIRA, M. A. A.; KANEKO, M. T. Native Brazilian Plants Against Nosocomial Infections: A Critical Review on their Potential and the Antimicrobial Methodology. **Bentham Science Publishers.** v. 13, p. 3040-3078, 2013.
- OKUSA, P. N.; PENGE, O.; DEVLEESCHOUWER, M.; DUEZA, P. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). **Journal Ethnopharmacoly.** v.112, p.476-481, 2007.
- PITA, N. O. G.; PRATES, E. C.; FERRAZ, H. G. Avaliação do perfil de dissolução de comprimidos de ciprofloxacino 250 mg comercializados como similares no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 40, n. 3, jul./set., 2004.
- RAPPER, S; VAN VUUREN, S. F.; KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; DAGNE, E. The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and myrrh oils – a combination from the pharaonic pharmacopoeia. **Letters in Applied Microbiology.** v. 54, p. 352–358, 2012.

SALVAT, A. A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R.H.; SUAREZ, E.Y. Screening of some plants from northern argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbial**. v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.

SILVA, K. M.; CHAVES, T. P.; SANTOS, R. L.; BRANDÃO, D. O.; FERNANDES, F. H. A.; RAMOS JÚNIOR, F. J. L.; SANTOS, V. L.; FELISMIMO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D. Modulation of the erythromycin in *staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximenia americana* L and *Schinopsis brasiliensis* Engl. . **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. v. 14, n. 2, p. 92-98, 2015.

SOUZA, D. O.; TINTINO S. R.; FIGUEREDO, F. G.; BORGES, M.C. M.; BRAGA, M, F. B.M.; FELIPE, C. F. B. COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.I MENEZES, I. R. A.; KERNTOPFI, M. R. Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya* Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 19, n. 3, 2014.

TALLARIDA, R. J.; MIDIC, U.; LAMARRE, N. S.; OBRADOVIC, Z. A search interaction Among Combinations of Drugs of Abuse and the Use of Isobolographic Analysis. **Jornal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, 38, 190-195, 2013.

TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis current methods for assessinh the in vitro antioxidante and antibacterial activity of plants extracts. **Food Chemistry**. v. 172, p. 814-822, 2015.

TINTINO, S. R et al. In vitro evaluation of antimicrobial activity and modulating the ethanol and hexane extracts of *Costus arabicus* bulb. **Bioscience Journal**. v. 29, p. 732 – 738, 2013.

VAN VUUREN, S.F.; VILJOEN, A. Plant-Based Antimicrobial Studies – Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products. **PlantaMed**. v. 77, p. 1168–1182, 2011.

WANG, S. S.; WANG, D. M.; PU, W. J.; LI, D. W. Phytochemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of three *Potentilla* species. **BMC Complement Altern Med**. v. 13, p. 321–331, 2013.

WILLIAMS, W. B.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol**. v. 28, n. 14, p. 25–30, 1995.