



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

JOCIMAR DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA *Spondias tuberosa* A. COMO ANTIMICROBIANA E MODULADORA
DA RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli***

**Campina Grande, PB
2015**

JOCIMAR DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA *Spondias tuberosa* A. COMO ANTIMICROBIANA E MODULADORA
DA RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Dr. Delcio de Castro Felismino

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.

S237a Santos, Jocimar da Silva

Avaliação da *Spondias tuberosa* A. como antimicrobiana e moduladora da resistência em cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [manuscrito] / Jocimar da Silva Santos. – 2015.

28 p.: il.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em FARMÁCIA) – Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

“Orientação: Prof. Drº. Delcio de Castro Felismino, Departamento de Farmácia.”

1. Resistência Microbiana, 2. Plantas Medicinais, 3. Fitoquímica, 4. *Spondias tuberosa*. I. Título.

21. ed. CDD 616.014

JOCIMAR DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA *Spondias tuberosa* A. COMO ANTIMICROBIANA E
MODULADORA DA RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* E
*Escherichia coli***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 01 / 12 / 2015


Prof. Dr. Delcio de Castro Felismino
Depto Biologia/CCBS/UEPB
Orientador


Prof. Msc. Thiago Pereira Chaves
Depto Biologia/CPCE/UFPI
Examinador


Prof.^a. Dr.^a. Francinalva Dantas de Medeiros
Depto Farmácia/CCBS/UEPB
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ter traçado um plano de vida para mim e para minha família da forma mais feliz e correta, guiando meus passos e permitindo mais uma conquista.

À minha família, por estarem sempre ao meu lado, me aconselhando e me dando condições materiais e emocionais de concluir o curso. Em especial ao meu pai e a minha mãe por todo o amor, carinho e zelo que sempre tiveram por mim. As minhas 4 irmãs que estiveram sempre ao meu lado em todas as dificuldades e alegrias.

Aos meus amigos Simone, Romário e Alline, que desde criança estiveram ao meu lado partilhando de momentos tristes, felizes e difíceis. Estes que tiveram a oportunidade de ver um menino se transformar em um homem e principalmente puderam contribuir com essa transformação.

Aos meus orientadores de fato e de direito Dr. Humberto, Dr. Delcio e Dra. Ana Claudia por todo o conhecimento partilhado durante os anos de convívio. Aos professores que compõe a banca avaliadora, por aceitarem o convite e contribuírem com o engrandecimento deste trabalho. E também aos professores de toda a graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, que durante os últimos 5 anos contribuíram para minha formação.

Agradeço ao LABDEM, em especial, Thiago, Elaine, Davy, Fernanda, Cleildo, Lianne e Francinalva, pois foram colegas e cuidadosos professores durante a iniciação científica, o que me proporcionou valiosos conhecimentos.

Por fim, agradeço a minha amiga Suênia, uma pessoa que a vida me presenteou para que pudéssemos partilhar segredos, emoções, experiências, aprendizado, aulas práticas, estágios e uma grande cumplicidade que gerou um sentimento de amizade recíproca.

Obrigado.

AVALIAÇÃO DA *Spondias tuberosa* A. COMO ANTIMICROBIANA E MODULADORA DA RESISTÊNCIA EM CEPAS DE *Staphylococcus aureus* E *Escherichia coli*

SANTOS, Jocimar da Silva¹

RESUMO

A evolução de cepas resistentes aos antibióticos convencionais é preocupante no âmbito hospitalar. A resistência microbiana exige a pesquisa e o desenvolvimento de novas formas de tratamento de infecções, nesta perspectiva os metabólitos secundários são vistos como base de substâncias ativas e bastante promissoras. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) é indicada pela medicina popular na prevenção de aterosclerose e no tratamento de doenças como infecções parasitárias e microbianas. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar uma prospecção da atividade e modulação antimicrobiana da *S. tuberosa* contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A partir do extrato etanólico de *S. tuberosa* foram determinadas a presença de polifenóis totais, flavonoides e taninos por espectrofotometria na região do visível. A ação antimicrobiana e a capacidade do extrato de modular a resistência foi observada pelo método de microdiluição em caldo, de forma a observar a concentração inibitória mínima (CIM) e a alteração que a presença do extrato causa na ação do antimicrobiano, para isso foram utilizadas cepas ATCC e clínicas multirresistentes. Para avaliar a interferência da *S. tuberosa* na curva de crescimento bacteriano das cepas, utilizou-se o método de contagem de unidade formadora de colônias em um período de tempo. No extrato foi observado grandes concentrações de taninos e a atividade antimicrobiana pode estar relacionada com a presença desses compostos fenólicos. O extrato de *S. tuberosa* foi capaz de diminuir a CIM dos antibióticos ampicilina, amoxicilina, eritromicina frente a *S. aureus* e dos antibióticos gentamicina, cefalotina e levofloxacino frente a cepa de *E. coli*. A curva de crescimento microbiano demonstrou que o extrato possui ação bactericida frente a *S. aureus* e bacteriostática frente a *E. coli*. A espécie *S. tuberosa* é uma espécie com ação antimicrobiana e moduladora da resistência a antibióticos, podendo ser uma espécie promissora para o desenvolvimento de fitoterápico antimicrobiano, necessitando de estudos posteriores para sua utilização segura.

Palavras-chave: Resistência Microbiana. Planta Medicinal. Fitoquímica. *Spondias tuberosa*.

¹Graduando em Farmácia pela Universidade Estadual da Paraíba. E- mail: jocimarsantos08@gmail.com

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	5
2- REFERENCIAL TEÓRICO	6
2.1- Resistência Microbiana	6
2.2- Plantas Medicinais como Agente Antimicrobiano	7
2.3- <i>Spondias tuberosa</i> A.	7
3- REFERENCIAL METODOLÓGICO	8
3.1- Coleta do Material Vegetal	8
3.2- Análise de Metabólitos Secundários	9
3.2.1- Quantificação de Polifenóis Totais	9
3.2.2- Quantificação de Flavonoides	9
3.2.3- Quantificação de Taninos	9
3.3- Atividade Antimicrobiana	9
3.3.1- Cepas, Suspensão Microbiana e Antimicrobianos	9
3.3.2- Concentração Inibitória Mínima (CIM)	10
3.3.3- Modulação da Atividade Antimicrobiana	10
3.4- Determinação da Cinética de Inibição do Crescimento Microbiano	10
4- DADOS E ANÁLISES DA PESQUISA	11
4.1- Análise de Metabólitos Secundários	11
4.2- Atividade Antimicrobiana e Moduladora de Resistência Microbiana	12
4.3- Cinética de Inibição do Crescimento Microbiano	15
4.3.1- Cinética de Inibição do Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
4.3.2- Cinética de Inibição do Crescimento de <i>Escherichia coli</i>	17
5- CONCLUSÃO	19
ABSTRACT	20
REFERÊNCIAS	21

1- INTRODUÇÃO

A adaptação dos microrganismos aos antibióticos é um problema que preocupa profissionais de diversas áreas por representar maior mortalidade por infecções, aumento do custo de tratamento e um desafio à clínica médica (TEILLANT *et al.* 2015). A resistência microbiana é caracterizada pela acomodação por parte dos microrganismos frente aos antimicrobianos utilizados convencionalmente na clínica (MENEZES *et al.* 2015). Entende-se que as bactérias possuem grande capacidade de propagar suas características genéticas facilitando a sua sobrevivência (PURRELLO *et al.* 2014).

Staphylococcus aureus são patógenos responsáveis por causar doenças como pneumonia, osteomielite, endocardite, entre outras. Esta bactéria é amplamente estudada quanto ao seu crescimento, virulência e seus mecanismos de resistência, portanto diversas cepas e diversos mecanismos de resistências são conhecidos (PURRELLO *et al.* 2014). Assim como cepas de *Escherichia coli*, causadoras de infecção urinária, septicemia e apendicite, por exemplo, também têm demonstrado um perfil de resistência a diversos antimicrobianos utilizados na clínica (MOURA *et al.* 2013).

Algumas iniciativas com a finalidade de solucionar esse problema têm sido tomadas, como a regulamentação do uso dos antimicrobianos, a contenção da disseminação de cepas resistentes e a pesquisa de novas formas de combater estes microrganismos (JONES *et al.* 2002).

Diversas substâncias oriundas de fontes naturais mostram atividade contra muitas espécies de bactérias, um exemplo é a *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae). Ela é indicada pela medicina popular na prevenção de aterosclerose, carcinomas e no tratamento de infecções parasitárias e microbianas (OMENA *et al.* 2012; SILVA *et al.* 2012). A casca do caule é a principal parte utilizada em infusões, decocções e garrafadas. Estas atividades são atribuídas a grande quantidade de metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e esteroides (SILVA *et al.* 2012).

Uma outra opção viável é a associação de plantas e antibióticos, uma vez que os constituintes vegetais podem atuar como auxiliares na ação antibiótica, potencializando em proporção satisfatória a ação dos antimicrobianos. Esta associação pode atuar aumentando a atividade de antibióticos, diminuindo ou inibindo os mecanismos de resistência (COUTINHO *et al.* 2012; LANGEVELD *et al.* 2014).

A espécie em questão está presente no bioma Caatinga e possui risco de extinção, estudo científicos podem agregar valor e incentivar a preservação da mesma. Portanto, o

objetivo deste estudo é realizar uma prospecção da atividade antimicrobiana da *Spondias tuberosa* frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*, determinando seus principais componentes químicos.

2- REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 – Resistência Microbiana

Os microrganismos possuem diversos mecanismos para se defender da ação de antimicrobianos. Esses mecanismos permitem a adaptação das bactérias aos ambientes e componentes químicos que são expostos. Deste modo, as cepas são selecionadas de forma que as mais resistentes persistem e isso contribui para a ineficácia da terapia antibiótica atual (GOMEZ *et al.* 2014).

As estirpes tornam-se resistentes aos antimicrobianos utilizando diferentes elementos. Podem ser citadas pelo menos cinco maneiras gerais para uma bactéria adquirir resistência antimicrobiana: a mutação no local alvo do antibiótico; uma modificação enzimática com degradação do antibiótico; efluxo ativo dos antibióticos para fora da célula; resistência através da redução da permeabilidade aos antibióticos; e a aquisição de vias metabólicas alternativas (VRANAKIS *et al.* 2014).

Devido a essa característica e em resposta ao uso indiscriminado de antimicrobianos, a cada dia, surgem diversos microrganismos resistentes, dentre eles *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE); *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à carbapenens (PCR); *Acinetobacter* resistentes à carbapenens (ARC) e a mais recente *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (MORAES *et al.* 2013).

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica associada com uma vasta gama de infecções em humanos, incluindo infecções da pele, pneumonia e septicemia (GOLDSTEIN *et al.* 2012). As cepas de *S. aureus* podem ser classificadas como a segunda causa mais comum de infecções da corrente sanguínea e são associados com aumento da mortalidade e tempo de internação hospitalar (PURRELLO *et al.* 2014). De forma semelhante, cepas de *Escherichia coli* são amplamente encontradas em casos de infecções que não respondem a tratamentos com antibióticos convencionais. Os mecanismos de resistência expressados por essas cepas ainda não estão totalmente elucidados, porém investigações a respeito dos assuntos são bastantes disseminados (KONG *et al.* 2015).

Diversas cepas resistentes são encontradas principalmente no ambiente hospitalar, porém devido a rápida disseminação bacteriana passaram também a habitar fora destes

ambientes, tornando-se graves problemas de saúde pública (TEILLANT *et al.* 2015). Os órgãos governamentais responsáveis pela saúde, como a ANVISA, tomaram medidas como a RDC N°20 que aponta diretrizes para o controle dos antimicrobianos e inibe o surgimento de novas cepas resistentes (BRASIL, 2011).

2.2 – Plantas Medicinais como Agente Antimicrobiano

As associações entre antibiótico e extrato vegetal podem ser feitas para obter uma otimização da ação do antibiótico, ou seja, uma maior potência com a diminuição da concentração inibitória mínima. Nesta perspectiva, as associações podem ser classificadas em: sinergismo, quando os dois compostos interagem de forma positiva diminuindo significativamente a concentração do antibiótico resistido; indiferente, quando a interação dos compostos não apresenta mudanças significativas na ação do antibiótico; e antagonismo, quando a associação causa um efeito negativo podendo dificultar a ação do antibiótico (MATIAS *et al.* 2013).

Desta forma, diversas espécies vegetais possuem ação moduladora, de forma positiva, sobre a ação de antimicrobianos resistidos por cepas clínicas. Como exemplos, podemos citar as espécies *Spondias mombin*, *Spondias purpúrea* e *Murraya paniculata* (ALENCAR *et al.* 2015; MENEZES *et al.* 2015).

Um desafio para o entendimento da ação antibiótica dos extratos vegetais é a compreensão das vias metabólicas de produção dos metabólitos secundários, por parte da planta, bem como os mecanismos de ação de cada composto. As plantas produzem compostos e substâncias em variedades e concentrações diversas, isto é visto de acordo com o ambiente em que o organismo vegetal é exposto (VRANAKIS *et al.* 2014).

As plantas possuem uma capacidade inata para perceber sinais de potencial patógenos além de reprogramar os sistemas de defesa adequadamente para superar tais ameaças. A grande variedade de compostos produzidos pelas plantas, em especial os metabólitos secundários, desempenham uma importante função para a sobrevivência da espécie e de moldar as respostas de defesa contra micróbios (SARMA *et al.* 2015).

2.3 – *Spondias tuberosa* A.

S. tuberosa é uma espécie pertencente da família Anacardiaceae, apresenta-se distribuída por regiões tropicais como o norte e nordeste do Brasil, sendo bem adaptada a florestas secas como no Bioma Caatinga. Esta espécie é conhecida popularmente como umbuzeiro e seus frutos são utilizados pela comunidade com importância nutritiva, econômica e ecológica (ALMEIDA *et al.* 2011).

Apresenta forma biológica e estacional de uma planta arbórea. A altura varia de 4 m a 6 m e copa umbeliforme (que se assemelha a um guarda-chuva), com diâmetro em torno de 10 m a 15 m. A madeira do umbuzeiro é leve, naturalmente trabalhada, no entanto e de baixa durabilidade (LINS NETO et al. 2013). Os frutos de *S. tuberosa* são os órgãos vegetais mais comuns no cotidiano da população e vários dos seus metabolitos têm sido elucidados, tais como compostos voláteis que conferem sabor cítrico (GALVÃO et al. 2011).

A *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) é utilizada pela medicina popular, para diversas doenças sistêmicas (OMENA et al. 2012; SILVA et al. 2012). Estudos realizados por Omena et al. (2012) demonstraram que a *S. tuberosa* apresenta capacidade antioxidante, ação inibidora da acetilcolinesterase e citotóxica. Silva et al. (2012) também observou a atividade antibacteriana desta espécie, corroborada por Alencar et al. (2015) que comprovou a ação de espécies do gênero *Spondias* sobre cepas de *S. aureus*, além de possuir atividade moduladora da ação antimicrobiana da eritromicina.

Essas atividades são devidas a grande quantidade de metabólitos secundários que essa espécie produz. Omena et al. (2012) e Almeida et al. (2011) observaram mais de 20 estruturas químicas com possíveis ações farmacológicas, além de estudos realizados por Silva et al. (2012) que observaram a presença de grandes concentrações de compostos pertencentes as classes de alcaloides, taninos, saponinas, esteroides e flavonoides.

3- REFERENCIAL METODOLÓGICO

3.1- Coleta do Material Vegetal

A casca do caule de *S. tuberosa* foi coletada na Fazenda Farinha, zona rural do município de Pocinhos (07°04'37", 36°03'3"W), no estado da Paraíba, sendo a exsicata confeccionada e depositada no Herbário Arruda Câmara da Universidade Estadual da Paraíba, sob o número ACAM00176.

O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar, com temperatura de 40 °C (\pm 1°C), posteriormente foi pulverizado em moinho de facas e peneirado em tamis de 10 mesh. O pó da planta foi submetido à extração com etanol (96%) por percolação, até exaustão da extração. A proporção inicial de planta-solventes utilizada foi de 1:5, ou seja, 20g de pó da planta para cada 100 mL de etanol. A solução resultante foi então roto-evaporada para retirada de todo o solvente.

3.2- Análise de Metabólitos Secundários

Nos testes foram utilizadas reações colorimétricas, com visualização da absorbância em comprimento de onda na região do visível, utilizando um espectrofotômetro UV mini - 1240/Shimadzu®. Os padrões foram fornecidos pela Sigma/Aldrich®.

A quantificação foi realizada após a construção de uma curva de calibração, onde obteve-se as absorbâncias espectrofotométricas de soluções com concentrações crescentes dos padrões. As concentrações e absorbâncias foram utilizadas na construção de um gráfico linear para avaliação da precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e linearidade com valor de R² superior a 0,98.

3.2.1- Quantificação de Polifenóis Totais

Foi utilizada a metodologia adaptada de Chandra; Mejia (2004), onde uma solução do extrato em água deionizada, com concentração conhecida, foi posta em contato com o reagente Folin-Ciocalteu (1:1), após 2 min foi utilizado o carbonato de sódio (20 %) como segundo reagente. A absorbância da amostra foi requerida no comprimento de onda de 750 nm. O padrão utilizado para a curva de calibração foi o ácido gálico.

3.2.2- Quantificação de Flavonoides

De acordo com Meda *et al.* (2005) prosseguiu-se da seguinte forma: uma solução do extrato metanol, de concentração conhecida, foi posta em contato com uma solução de cloreto de alumínio (2%), para reação colorimétrica que evidencia os flavonoides. O comprimento de onda utilizado para as leituras das amostras foi 415 nm. Utilizou-se a quercetina como padrão.

3.2.3- Quantificação de Taninos

Foi utilizada a metodologia descrita por Makkar; Becker (1993), onde os reagentes utilizados foram a vanilina (4 %) e o ácido clorídrico (37%). O comprimento de onda utilizado para observação da absorbância foi 500 nm. O padrão utilizado foi a catequina.

3.3- Atividade Antimicrobiana

3.3.1- Cepas, Suspensão Microbiana e Antimicrobianos

Foram utilizadas cepas padronizadas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Também foram utilizadas cepas clínicas das mesmas espécies provenientes de exames laboratoriais cedidas pelo LAC/UEPB. As cepas foram isoladas, identificadas e avaliadas qualitativamente quanto a resistência a antimicrobianos, através de antibiograma pelo método de disco-difusão em ágar, recomendado pelo Clinical

and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012). A estirpe clínica de *S. aureus* apresentou resistência a penicilina, ampicilina, amoxicilina, cefalexina, eritromicina e ciprofloxacino, já a estirpe de *E. coli* apresentou resistência a amoxicilina, cloranfenicol, cefalotina, tetraciclina, gentamicina e levofloxacino.

Os microrganismos foram isolados em placa de Petri com ágar Mueller Hinton, por 24h, em estufa com temperatura controlada em 37 °C (± 1 °C). Após, foi produzida uma suspensão microbiana padronizada em 10^6 UFC.mL⁻¹, obtida através da observação da absorbância espectrofotométrica de uma suspensão de microrganismo em solução salina (0,9%), no comprimento de onda 625nm, de modo a obter uma absorbância entre 0,08 e 0,1 (CLSI, 2012).

Todos os antimicrobianos utilizados foram obtidos pela Sigma-Aldrich Chemical Corp., Louis, MO, USA.

3.3.2- Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O extrato foi diluído em DMSO 10% e os antibióticos em água deionizada, os dois na concentração de 2 mg.mL⁻¹. Realizou-se uma diluição seriada do extrato sozinho, do antibiótico sozinho e da combinação extrato-antibiótico de forma a obter um intervalo de diferentes concentrações testadas entre 125 a 0,008 µg.mL⁻¹. Foi então adicionada uma alíquota de 10µL da suspensão microbiana produzida anteriormente. Em seguida, as microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C (± 1 °C). Após 24 horas, foi realizada a leitura CIM (CLSI, 2012). Para visualizar a CIM foram utilizados 20µL da solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01% em cada poço. Foi considerada como CIM a menor concentração que inibiu o crescimento microbiano (SARKER *et al.* 2007; ANG *et al.* 2010).

3.3.3- Modulação da Atividade Antimicrobiana

A avaliação do extrato como modulador da resistência microbiana foi avaliada após observação da CIM do antibiótico, na presença do extrato em concentração sub-inibitória ($\frac{CIM}{8}$) (COUTINHO *et al.* 2012). Os resultados foram expressos como médias geométricas e graficamente, também foi realizada a análise de duas vias de variância (ANOVA two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

3.4- Determinação da Cinética de Inibição do Crescimento Microbiano

Foram determinadas as curvas de crescimento de *S. aureus* e *E. coli* em presença do extrato de *S. tuberosa*, de um antibiótico padrão (controle positivo) e da associação extrato/antibiótico padrão, pelo método adaptado de Peyret (1990).

As cepas ATCC de *S. aureus* e *E. coli* foram inoculadas em caldo nutritivo (BHI), incubadas a 37 °C (± 1 °C) por 24 horas e cultivadas em caldo Mueller Hinton. Produziu-se uma suspensão microbiana em solução salina a 9% na concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹. O extrato de *S. tuberosa* foi utilizado na concentração 1mg.mL⁻¹, utilizando como solvente o dimetilsulfóxido (10%). Transferiu-se 9 mL da cultura bacteriana e adicionou-se 1 mL da solução do extrato. Como controle negativo foi utilizado solução salina e como controle positivo foi utilizado o antibiótico cefalotina para *S. aureus* e gentamicina para *E. coli*. As diluições foram mantidas em estufa com temperatura controlada a 37 ± 1 °C por 24 horas, e alíquotas foram retiradas após 0, 2, 4, 8, 12 e 24 horas de incubação e semeadas em placas com ágar Mueller Hinton pelo método de pour-plate.

A cinética microbiana foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Para a análise da média geométrica e análise do gráfico utilizou-se o software estatístico OriginPro 8. Como modelo matemático, foi utilizado o cálculo da constante de inativação microbiana (K), sendo possível calcular o D (death), que representa o tempo de exposição necessário para redução em 90 % da população microbiana. O D pode ser definido graficamente utilizando a equação $D = \frac{2,303}{K}$ (CHATTERJEE *et al.* 2015).

4- DADOS E ANÁLISES DA PESQUISA

4.1- Análise de Metabólitos Secundários

Ao observar a tabela 1, constata-se as concentrações dos metabólitos secundários da *S. tuberosa*, identificando os taninos em maior concentração. Portanto, estudos de determinação do composto majoritário, de isolamento e purificação de substâncias podem ser direcionados para metabólitos pertencentes a estas classes, em especial os taninos.

Tabela 1. Principais metabólitos secundários e suas concentrações no extrato da *S. tuberosa*.

Metabólitos Secundários	Concentração
Polifenóis	17,47 µgEAG.g ⁻¹
Flavonoides	8,51 µgEQU.g ⁻¹
Taninos	47,17 µgECA.g ⁻¹

EAG: equivalentes de ácido gálico; QUE: equivalentes de quercetina; ECA: equivalentes de catequina.

Estudos realizados por Silva *et al.* (2012) demonstram a presença de compostos como rutina, quercetina e ácido elágico na *S. tuberosa*, pertencentes as classes de metabólitos

secundários flavonoides e taninos. Esses compostos são formados a partir da necessidade do organismo vegetal em se defender ou se adaptar ao ambiente em que está exposto. O organismo vegetal produz compostos com atividade antimicrobiana quando é atacado por microrganismos como fungos e bactérias (COWAN, 1999).

Estudos utilizando a *S. tuberosa* mostram também a presença de esteroides, saponinas, terpenos, óleos essenciais, alcaloides e compostos fenólicos, onde a ação antimicrobiana desta espécie pode ser atribuída aos mecanismos de ação desses compostos (OMENA *et al.* 2012).

Os metabólitos secundários podem ser utilizados de forma combinada ou de forma isolada. São bastantes promissores quando associados a outros metabólitos secundários, bem como associados a moléculas sintéticas, podendo potencializar o efeito das mesmas, pois seus mecanismos de ação sugerem ações coadjuvantes sobre a ação de um agente quimioterápico (ALENCAR *et al.* 2015).

Os polifenóis totais são potentes antioxidantes e antibacterianos, atuando sobre a membrana plasmática causando a diminuição de adesinas, enzimas e polipeptídeos da parede celular das bactérias (COUTINHO *et al.* 2012). Os taninos podem atuar sobre o metabolismo nos microrganismos através da inibição de enzimas e da inativação de proteínas do envelope celular (SCALBERT, 1991; COWAN, 1999). Os flavonoides podem atuar na inibição de síntese de ácidos nucleicos impedindo a formação de pontes de hidrogênio entre bases nitrogenadas, além de perturbar as bicamadas lipídicas penetrando diretamente e interrompendo a função de barreira, como também podem provocar a fusão da membrana, resultando em vazamento de materiais intramembranosos (IKIGAI *et al.* 1993; CUSHNIE; LAMB, 2005). Portanto, a atividade antimicrobiana da espécie está intimamente ligada a composição química do extrato.

Com a intenção de se produzir um medicamento, entende-se que a ação farmacológica de um fitoterápico é caracterizada pela dinâmica conjunta de todos os constituintes de um órgão vegetal, não necessitando o isolamento de moléculas químicas para utilização da mesma, porém a determinação do composto majoritário com ação biológica pode fornecer informações a respeito do mecanismo de ação da droga, bem como confiabilidade aos estudos, sendo indicado estudos posteriores com esta espécie para identificação e isolamento de moléculas (COWAN, 1999).

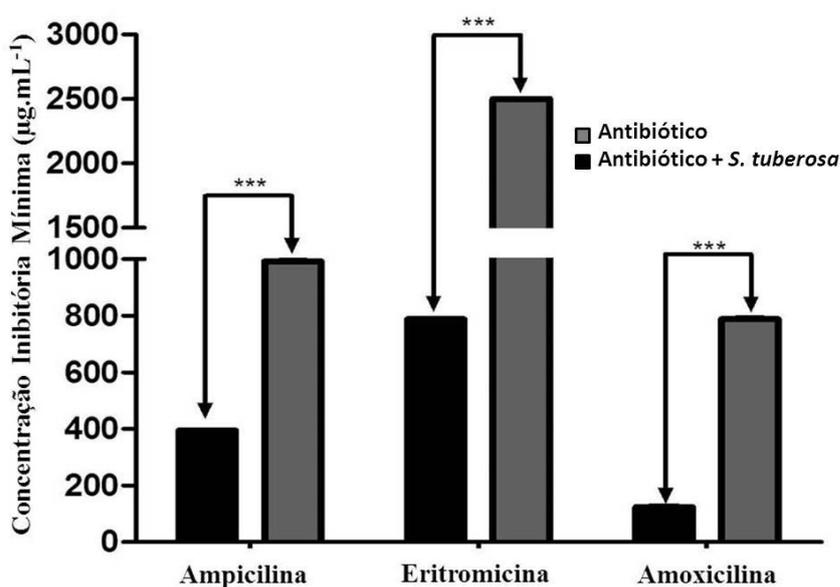
4.2- Atividade Antimicrobiana e Moduladora de Resistência Microbiana

O extrato etanólico de *S. tuberosa* obteve a CIM igual a 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente as cepas ATCC e clínica de *S. aureus*. Frente a cepa de *E. coli*, o extrato obteve CIM igual a 500

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a ATCC e 1 mg.mL^{-1} para a cepa clínica. Isto comprova a ação antimicrobiana da *Spondias tuberosa* e corrobora com o estudo realizado por Silva *et al.* (2012).

Frente a cepa de *S. aureus* os antimicrobianos ampicilina, eritromicina e amoxicilina inibiram o crescimento nas concentrações mínimas de 992,13; 2500,00 e 787,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Quando associados com o extrato de *S. tuberosa* é observado que as concentrações mínimas necessárias para utilização desses antibióticos são reduzidas para 393,73; 787,45 e 124,02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, como observado na figura 1.

Figura 1. Modulação da resistência microbiana pelo extrato de *S. tuberosa* frente a cepa clínica de *S. aureus*.

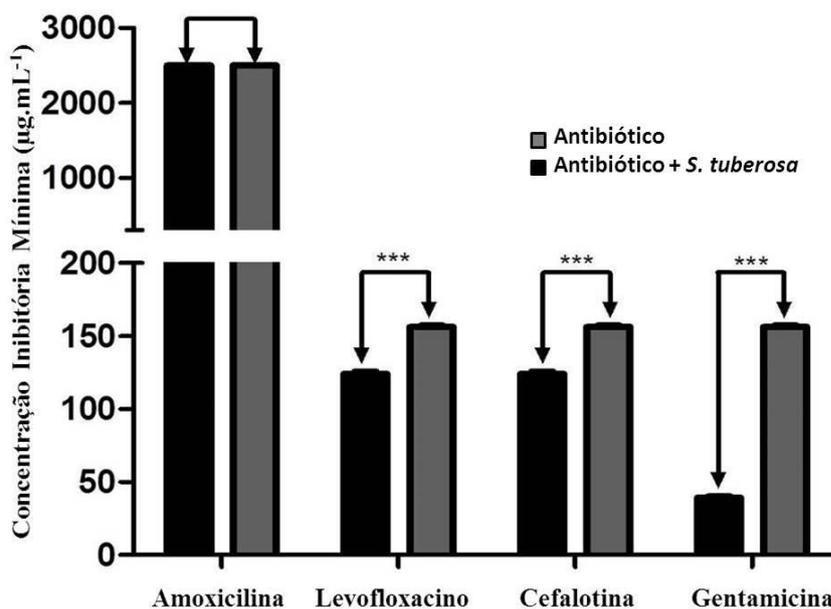


*** - valor estatisticamente significativo com $P < 0,001$.

Para as cepas de *E. coli*, é observado que a concentração necessária de amoxicilina para inibir o seu crescimento foi de 2500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e para levofloxacino, cefalotina e gentamicina foi de 156,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A associação desses antimicrobianos com a o extrato de *S. tuberosa* levou a uma concentração de inibição de 2500, 124,02, 124,02 e 39,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, como apresentado na figura 2.

Os antimicrobianos sintéticos testados são pertencentes a diferentes classes de antimicrobianos e possuem diferentes mecanismos de ação, portanto, possuem diferentes CIMs frente ao mesmo patógeno. Observando a interação dos antimicrobianos com o extrato de *S. tuberosa* existe uma redução da CIM dos mesmos, o que representa uma interação positiva entre as amostras.

Figura 2. Modulação da resistência microbiana pelo extrato de *S. tuberosa* frente a cepa clínica de *E. coli*.



*** - valor estatisticamente significativo com $P < 0,001$.

De acordo com Rios; Recio (2005), a concentração efetiva de um extrato vegetal deve ser menor que 1 mg.mL^{-1} , para que esse extrato seja melhor utilizado como fitoterápico. Porém, um composto vegetal pode não atuar com eficácia e potência em doses tão baixas, desta forma, outros meios de utilização são propostos para a utilização da porção vegetal, um exemplo é a associação de plantas com antibióticos resistentes.

Estudos realizados por Coutinho *et al.* (2012) abordando sinergismo, sugerem que os extratos das plantas atuam na membrana da célula bacteriana, facilitando a ação do antibiótico. Da mesma forma, várias hipóteses podem estar relacionadas ao sinergismo, como por exemplo, uma possível interação química entre o extrato e o antibiótico, potencializando a ação (BATISH *et al.* 2008).

Existem alvos celulares para a ação de antimicrobianos sobre a bactéria. Os antibióticos utilizados neste estudo atuam da seguinte forma: A amoxicilina, ampicilina e a cefalotina atuam inibindo a síntese da parede celular da bactéria; A eritromicina e a gentamicina atuam inibindo a síntese proteica da célula bacteriana; O levofloxacino atua inibindo a síntese de DNA no material genético do microrganismo (LEMIRE *et al.* 2013). Observando que os polifenóis, os flavonoides e os taninos atuam, de forma geral, sobre polipeptídeos da parede celular, enzimas celulares e síntese de ácidos nucleicos, acredita-se que o extrato apresenta ação acessória na ação dos antimicrobianos (ALENCAR *et al.* 2015).

Existem diversos mecanismos de resistência ao antimicrobianos utilizados convencionalmente na clínica e esses mecanismos se propagam por existir contato entre as cepas microbianas transmitindo informações genéticas (VRANAKIS *et al.* 2014). Entre outros mecanismos, as cepas de *S. aureus* podem resistir aos betalactâmicos por produzirem enzimas β -lactamases que modificam a estrutura do antimicrobiano. Por sua vez os taninos presentes na *S. tuberosa* podem atuar inibindo estas enzimas, tornando a associação antibiótico e *S. tuberosa* eficaz na resistência de *S. aureus*, como ocorre com a amoxicilina e a ampicilina (PURRELO *et al.* 2014; COWAN, 1999).

Estudos realizados por Alencar *et al.* (2015) utilizando espécies do gênero *Spondias*, demonstra que as espécies possuem ação moduladora sinérgica em relação a atividade da eritromicina frente a *S. aureus*, apontando que existem várias hipóteses para o extrato vegetal modular a ação do antibiótico, entre elas é possível citar a interação química entre o extrato e o antimicrobiano, a ação em diferentes sítios de ação com resultado farmacológico sinérgico, bem como inativação de mecanismos de resistência. Essas hipóteses também se estendem as cepas de *E. coli* (VRANAKIS *et al.* 2014).

As estirpes de *E. coli* apresentam perfil de multirresistência frente a diversos antimicrobianos, como por exemplo, cefalotina e gentamicina. Elas resistem por apresentarem sorotipos com diferentes mecanismos de resistência como a formação de biofilme, a produção de enzimas, vias alternativas de metabolismos, entre outras (MOURA *et al.* 2013). O extrato de *S. tuberosa* apresenta metabólitos secundários que atuam de forma conjunta inativando enzimas, perturbando bicamadas lipídicas e impedindo replicação do DNA, indicando a causa da redução da CIM nas associações entre o extrato e os antibióticos, apresentada na figura 2.

A redução da concentração mínima eficaz causada pela presença do extrato é de grande importância para potencializar a ação das drogas, pois a utilização de substâncias em doses pequenas diminuem riscos de toxicidade, além de existir menores efeitos adversos e proporcionar uma janela terapêutica maior do medicamento (LANGEVELD *et al.* 2014).

4.3- Cinética de Inibição do Crescimento Microbiano

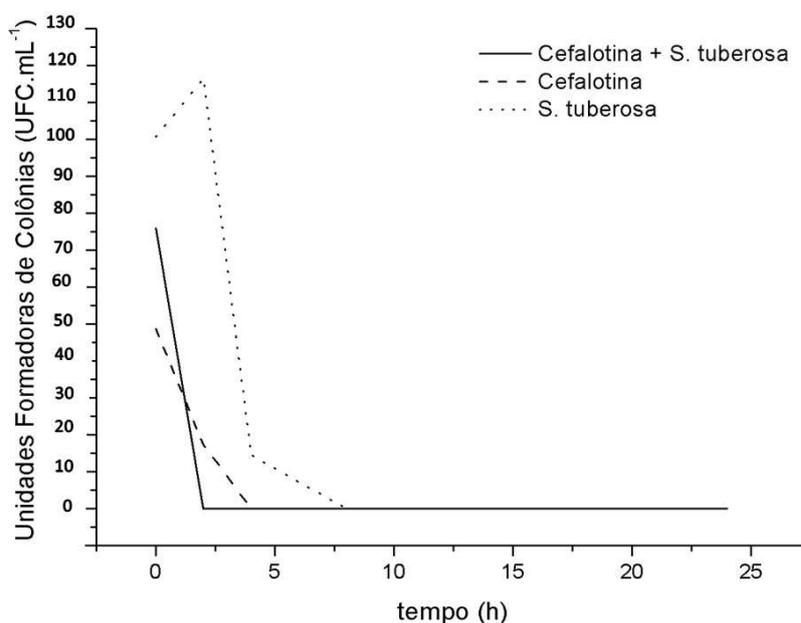
O perfil de multiplicação dos microrganismos em função do tempo demonstra a velocidade de ação, que está intimamente ligada com a potência do extrato de *S. tuberosa*. A contagem de UFC feita após a interação dos microrganismos com o extrato/antibiótico fornece a classificação da ação antimicrobiana em bacteriostática e bactericida (YATES; SMOTZER, 2007).

4.3.1- Cinética de Inibição do Crescimento de *Staphylococcus aureus*

A ação da *S. tuberosa* frente a *S. aureus* é bactericida, possuindo sua melhor atuação no período de tempo entre 2 e 8 horas após o contato com o extrato (Figura 3). A ação bactericida observada após 2 horas de atuação indica a ação do extrato na parede celular do microrganismo ou, de acordo com Shelburne *et al.* (2004), isso acontece pela necessidade de incorporação de quantidade suficiente de extrato no interior da bactéria.

Frente a *S. tuberosa*, a cepa de *S. aureus* apresentou crescimento microbiano expresso graficamente por uma equação linear, com constante de velocidade de inativação microbiana com inclinação negativa (-2,219), esse valor negativo é devido a ação bactericida do extrato frente a cepa (CHATTERJEE *et al.* 2014). Portanto, através do cálculo de D, o tempo necessário para redução em 90% da população microbiana é 1,04 h. Por se tratar de uma ação bactericida, a representação gráfica demonstrou-se de forma linear e decrescente, obedecendo a equação $y = -2,219x + 11,988$.

Figura 3. Curvas do tempo de susceptibilidade da cepa *S. aureus* frente a *S. tuberosa* e cefalotina.



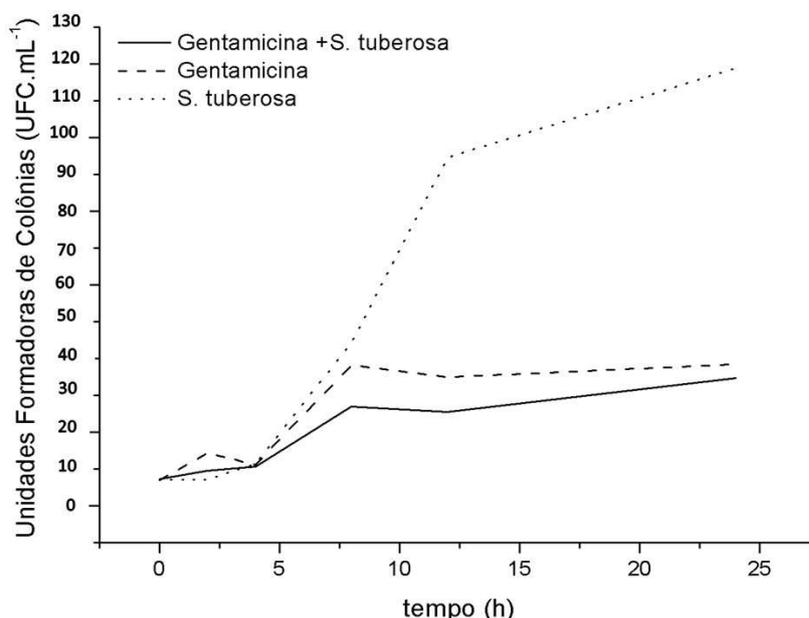
De acordo com Jones *et al.* (2002) para uma substância ter ação bactericida, seja ela uma molécula isolada ou um composto, o logarítmico da curva de crescimento do microrganismo precisa cair pelo menos três vezes em relação ao inóculo do logarítmico inicial. Dessa forma, na curva de crescimento da cepa *S. aureus*, todos os microrganismos foram inativados pela *S. tuberosa*, como observado na figura 3.

A cefalotina foi utilizada como controle positivo, sendo um antibiótico que atua impedindo a formação da parede celular, sua ação conjunta com o extrato apresentou uma diminuição do tempo necessário para inativar todos os microrganismos (LEMIRE *et al.* 2013). Além disso, a interação entre a cefalotina e o extrato de *S. tuberosa* proporcionou uma redução total do número de UFC em aproximadamente 2h, o que aponta a associação como eficaz e capaz de potencializar a ação antimicrobiana.

4.3.2- Cinética de Inibição do Crescimento de *Escherichia coli*

A ação da *S. tuberosa* é bacteriostática frente a *E. coli*. Isto é observado ao perceber que nas primeiras 24 horas após entrar em contato com o extrato, o crescimento dos microrganismos não ocorreu de forma logarítmica como esperado, como apresentado na figura 4 (JONES *et al.* 2002); no entanto apresentou-se de forma exponencial, obedecendo a equação $y=3E+08e^{0,6631x}$.

Figura 4. Curvas do tempo de susceptibilidade das cepas *E. coli* frente a *S. tuberosa* e gentamicina.



Frente a *E. coli* a *S. tuberosa* apresentou um crescimento exponencial com constante de inativação microbiana de 0,6631. A ação bacteriostática da *S. tuberosa* necessita de um tempo maior de exposição para inativação da população de células viáveis, mesmo estando em concentração constante (YATES; SMOTZER, 2007). O tempo necessário para diminuição em 90% da população microbiana é de 3,48 h.

A gentamicina foi utilizada como controle positivo e possui ação bacteriostática, a sua presença manteve constante o número de UFC após 8 h de contato com a cepa de *E. coli*. No entanto, a associação entre a gentamicina e o extrato de *S. tuberosa* apontou uma redução na população microbiana, mantendo os valores de UFC em números inferiores.

Este resultado corrobora com o estudo apresentado por Gomez *et al.* (2014), onde demonstrou que a presença dos metabólitos secundários ácido gálico e catequina proporcionou uma redução significativa no número de UFC de *E. coli*. O estudo fitoquímico demonstrou que a *S. tuberosa* contém grandes concentrações de polifenóis, podendo apontar para eles a ação antimicrobiana da *S. tuberosa* frente a *E. coli*.

Estudos mais detalhados de mecanismo de ação da atividade antimicrobiana devem ser feitos para comprovação, porém a observação da ação bactericida do extrato frente a cepas gram-positivas e de ação bacteriostática frente a gram-negativa pode indicar uma ação na parede celular do microrganismo (PURRELLO *et al.* 2014).

5- CONCLUSÃO

Os estudos fitoquímicos demonstraram a concentração dos metabólitos secundários polifenóis, flavonoides e taninos, sendo eles os possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato de *Spondias tuberosa* frente as cepas de *S. aureus* e *E. coli*. O extrato apresentou interação positiva em associação com os antibióticos amoxicilina, ampicilina, eritromicina, gentamicina, cefalotina e levofloxacino, diminuindo significativamente a concentração inibitória mínima dos antimicrobianos. Além disso, o extrato apresentou ação bactericida frente a cepa gram-positiva e bacteriostática frente a cepa gram-negativa. Portanto, a associação extrato-antibiótico é uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes, porém estudos mais detalhados e de toxicidade devem ser realizados, para segura utilização.

ABSTRACT

The resistant strains evolution to conventional antibiotics is a concern in hospitals. Microbial resistance requires research and development of new ways to treat infections. Thus, plants components are regarded as basic and promising active substances. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) is indicated by folk medicine in the prevention of atherosclerosis and treatment of diseases such as parasitic infections and microbial. Therefore, the aim of this study is to conduct a survey of the antimicrobial activity of *S. tuberosa* towards to strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. From the extract of *S. tuberosa*, it was determined the presence of total polyphenols, flavonoids and tannins spectrophotometrically in the visible region. The extract's capacity to modulate the antimicrobial activity of antibiotics it observed by the microdilution in broth method in order to observe the minimum inhibitory concentration (MIC) and the change that the presence of the extract causes in the antimicrobial action, ATCC strains were used and clinics. It also promoted the bacterial growth curve of the strains, in presence of extract, by method counting of colonies forming units in a time period. In the extract it was observed high concentrations of tannins and antimicrobial activity that may be related to the presence of these phenolic compounds. *S. tuberosa*' extract was able to decrease the effective concentration of ampicillin, amoxicillin and erythromycin against *S. aureus* and gentamicin, cephalothin, and levofloxacin against *E. coli* strain. The microbial growth curve showed that the extract has bactericidal action front *S. aureus* and bacteriostatic against *E. coli*. *S. tuberosa* is a species of antimicrobial activity and modulating antibiotic resistance that may be a promising species for the development of herbal medicines requiring further study for their safe use.

KEYWORDS: Microbial Resistance. Herbal. Phytochemistry. *Spondias tuberosa*.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, L. C. A.; CHAVES, T. P.; SANTOS, J. S.; NOBREGA, F. P.; ARAUJO, R. M.; SANTOS, V. L.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 111-116, 2015.

ALMEIDA, A. L. S.; ALBUQUERQUE, U. P.; CASTRO, C. C. Reproductive biology of *Spondia tuberosa* Arruda (Anacardiaceae), an endemic fructiferous species of Caatinga (dry forest), under different management conditions in northeastern Brazil. **Journal of Arid Environment**, v. 75, n. 4, p. 330- 337, 2011.

ANG, C. F.; MENDOZA, M. T., BULATAO, W. C. Evaluation of the resazurin microtiter assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **Philippine Journal of Microbiology and Infectious Diseases**. v. 39, n. 1, p. 96- 102, 2010.

BATISH, D. R.; SINGH, H. P; KOHLI, R. K.; KAUR, S. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. **Forest Ecology and Management**. v. 256, n. 12, p. 2166–2174, 2008.

CHANDRA, S.; MEJIA, 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, n. 11, p 3583–3589, 2004.

CHATTERJEE, T.; CHATTERJEE, B. K.; MAJUMDAR, D.; CHAKRABARTI, P. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 2, p. 299- 306, 2015.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 2012.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; LIMA, E. O. Fruits to potentiate the antibiotic activity: the effect of *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum* L. against MRSA. **Acta Alimentaria**, v. 41, n.1, p. 67- 72, 2012.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology**. v.12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSHNIE, T. P. T; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 26, n. 5, p. 343- 356, 2005.

GOMEZ, R. D.; ARAYA, H. T.; SOLIS, R. L.; SLIER, E. O. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 896- 900, 2014.

GALVÃO, M. S.; NARAIN, N.; SANTOS, M. S. P.; NUNES, M. L. Volatile compounds and descriptive odor attributes in umbu (*Spondias tuberosa*) fruits during maturation. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1919- 1926, 2011.

GOLDSTEIN, R. E.; MICALLEF, S. A.; GIBBS, S. G.; DAVIS, J. A.; HE, X.; GEORGE, A.; SAPKOTA, A. R. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) detected at four U.S. wastewater treatment plants. **Environmental Health Perspectives**, v. 120, n. 11, p. 1551-1558, 2012.

IKIGAI, H.; NAKAE, T.; HARA, Y.; SHIMAMURA, T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1147, n. 1, p.132-136, 1993.

JONES, R. N.; ANDEREGG, T. R.; DESHPANDE, L. M. A new oxazolidinone bactericidal activity and synergy studies combined with gentamicin or vancomycin against staphylococci and streptococcal stains. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v. 43, n. 1, p. 87-90, 2002.

KONG, H.; HONG, X.; Li, X. Current perspectives in pathogenesis and antimicrobial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**. v. 85, n. 1, p. 44-49, 2015.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J.; BURT, S. A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LEMIRE, J. A.; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms molecular target and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 371- 384, 2013.

LINS NETO, E. M. F.; OLIVEIRA, I. F.; BRITO, F. B.; ALBUQUERQUE, U. P. Traditional knowledge, genetic and morphological diversity in populations of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae). **Genetic Research Group Evolution**, v. 12, n. 1, p. 5- 12, 2013.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Vanilin-HCl method for condensed tannins: effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 4, n. 1, 613-621, 1993.

MATIAS, E. F. F.; ALVES, E. F.; SANTOS, B. S.; SOUSA, C. E. S.; FIGUEREDO, S. G.; COSTS, J. G. M. Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* D C. as tool to validate the ethnobiological usage. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 13, n. 1, p. 1- 7, 2013.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, 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, n. 3, p 571–577, 2005.

MENEZES I.R.A.; SANTANA, T. I.; VARELA, V. J.; SARAIVA, R. A.; MATIAS, E. F. F.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T. Chemical compositions and evaluation of acute toxicological, antimicrobial and modulatory resistance of the extract of *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 1, p. 185-191, 2015.

MONTEIRO, J, M.; LINS NETO, E. M. F.; AMORIM, E. L. C.; STRATTMANN, R. R.; ARAÚJO, E. L.; ALBUQUERQUE, U. P.; Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da Caatinga. **Revista Árvore**. v. 29, n. 6, p. 999-1005, 2005.

MORAES, G. M.; COHRS, F. M.; BATISTA, R. E. A.; GRINBAUM, R. S. Infecção ou colonização por microrganismos resistentes: identificação de preditores. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, n. 2, p. 185- 191, 2013.

MOURA, I.; TORRES, C.; SILVA, N.; SOMALO, S. IGREJAS, G.; POETA, P. Genomic description of antibiotic resistance in *Escherichia coli* and Enterococci isolates from Healthy Lusitano Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 1, p. 1057- 1063, 2013.

OMENA, C. M. B.; VALENTIM, I. B.; GUEDES, G. S.; RABELO, L. A.; MANO, C. M.; GOULART, M. O. F. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol

extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 334- 344, 2012.

PALOMINO, J. C. MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PEYRET, M. Etude mathematique de la curve de mortalite d' *Escherichia coli* exposeaux polymixines. **Pathology Biology**, v. 38, n. 1, p. 441- 445, 1990.

PURRELO, S. M.; DAUM, R. S.; EDWARDS, G. F. S.; LINA, G.; LINDSAY, J.; PETERS, G.; STEFANI, S. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) update: New insights into bacterial adaptation and therapeutic targets. **Journal of Global of Antimicrobial Resistance**, v. 70, n. 9, p. 1- 9, 2014.

RÍOS, J. L., RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n. 1, p. 80- 84, 2005.

SARMA, B. K.; YADAV, S. K.; SINGH, S.; SINGH, H. B. Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 87, n. 1, p. 25- 33, 2015.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 2, p. 321– 324, 2007.

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

SHELBURNE, S. A.; MUSHER, D. M.; HULTEN, K.; CEASAR, H.; LU, M. Y.; BHAILA, I.; HAMILL, J. In vitro killing of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with drugs combinations. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.48, n.10, p. 4016-4019, 2004.

SILVA, R. A.; MORAES, S. M.; MARQUES, M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; GUEDES, M. I. Chemical composition, antioxidant and antibacterial

activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 6, p. 740–746, 2012.

TEILLANT, A.; GANDRA. S.; BARTER, D.; MORGAN, D. J.; LAXMINARAYAN, R. Potential burden of antibiotic resistance on surgery and cancer chemotherapy antibiotic prophylaxis in the USA: a literature review and modelling study. **The Lancet**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2015.

VRANAKIS, I.; GONIOTAKIS, I.; PSAROULAKI, A.; SANDALAKIS, V.; TSELENTIS, Y.; GEVAERT, K.; TSIOTIS, G. Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. **Journal of Proteomics**. v. 97, n. 1, p. 88- 99, 2014.

YATES, G. T.; SMOTZER, T. On the lag phase and initial decline of microbial growth curves. **Journal of Theoretical Biology**, v. 244, n. 1, p. 511- 517, 2007.