



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA



MANUELA OLIVEIRA LINS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SINÉRGICA DE
METABÓLITOS DE RUTACEAE.**

SALVADOR

2011

MANUELA OLIVEIRA LINS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E SINÉRGICA DE
METABÓLITOS DE RUTACEAE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Tânia Fraga Barros

SALVADOR

2011

Lins, Manuela Oliveira.

Atividade antimicrobiana e sinérgica de metabólitos de Rutaceae / Manuela Oliveira Lins. -
2011.

92 f.

Orientador: Prof. Dr. Eudes da Silva Velozo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Tânia Fraga Barros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador,

Dedico este trabalho

**à minha co-orientadora Tânia Barros que há cinco anos
contribui para o meu crescimento científico e
profissional.**

Agradecimentos

A Deus pela presença constante na minha vida.

Aos meus pais e irmãs pela compreensão, paciência e confiança.

A Mateus pelo amor, carinho e incentivo.

Ao professor Dr. Eudes Velozo por acreditar no meu potencial e transmitir suas experiências.

À professora Dra. Tânia Barros, pessoa muito especial, que mostrou ser muito mais que uma co-orientadora.

As amigas do LPMC, em especial a Carol, Coris, Silvia, Drica e Debinha, pela amizade, companherismo e momentos de descontração vividos.

Aos amigos do LAPEMM pela colaboração, em especial a Railda pelo apoio.

Aos colegas do mestrado pela troca de conhecimentos em especial a Coris pela experiência compartilhada.

Aos professores do programa de pós graduação que contribuíram para o meu crescimento científico.

A CAPES e FAPESB pelo financiamento do projeto.

As doenças infecciosas têm um papel marcante na história da humanidade, pois a descoberta dos primeiros antimicrobianos revolucionou o tratamento das infecções diminuindo seus índices de mortalidade. Porém, concomitantemente com a aplicação clínica das primeiras gerações de antimicrobianos, a resistência microbiana surgiu. A seleção de cepas resistentes se deve principalmente à utilização indiscriminada dos agentes antimicrobianos, à capacidade dos micro-organismos de adquirirem e disseminarem a resistência e à capacidade dos seres humanos de transmitir micro-organismos. As propriedades farmacológicas das plantas têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, plantas com propriedades medicinais são, desde a antiguidade, utilizados no tratamento de diversas doenças. O interesse por esses metabólitos se deve principalmente à capacidade de produzir compostos biologicamente ativos que podem servir de modelos para a síntese de novos fármacos. Além da atividade antimicrobiana de metabólitos extraídos de plantas, um novo conceito na utilização desses produtos vem sendo estudado, a associação com antimicrobianos sintéticos. O produto natural pode agir tendo como alvo o mecanismo de resistência microbiana ou agir de forma sinérgica com o antimicrobiano, através de mecanismo ainda não caracterizado. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e sinérgica de duas espécies de plantas da família Rutaceae: *Zanthoxylum tingoassuiba* e *Dictyoloma vandellianum*. Os metabólitos naturais foram produzidos através da hidro destilação, no caso do óleo essencial, maceração a frio, para os extratos metanólico, hexânico, diclorometânico e partição para os extratos aquoso e acetato de etila. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelas técnicas da difusão em disco, difusão em poço, macrodiluição em agar e microdiluição em caldo, descritas pelo CLSI. Enquanto o sinergismo foi avaliado através da associação dos extratos aos discos de antibiótico, na técnica da difusão em disco, e através da associação do óleo essencial, em concentrações subinibitórias ($\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CIM) à solução antibiótica na técnica da microdiluição em caldo. Os resultados mostraram que o óleo essencial de *Z. tingoassuiba* e 08 dos 15 extratos testados apresentaram atividade antibacteriana frente a isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes; que o óleo potencializou a ação das fluoroquinolonas diminuindo os valores de CIM em no mínimo 02 vezes; que alguns extratos de *Z. tingoassuiba* (metanólico e hexânico das folhas, hexânico e metanólico do caule) e o extrato diclorometânico da *D. vandellianum* potencializou a ação das fluoroquinolonas aumentando os halos de inibição de crescimento bacteriano e que, apesar de não ter sido observada atividade antifúngica, os metabólitos de *D. vandellianum* potencializaram a ação do fluconazol frente a isolados de *Candida* resistentes. Portanto, foi possível concluir que metabólitos extraídos das espécies em estudo possuem potencial antimicrobiano e sinérgico.

Palavras-chave: Rutaceae, *Zanthoxylum tingoassuiba*, *Dictyoloma vandellianum*, resistência antimicrobiana, atividade antimicrobiana, sinergismo.

Infectious diseases have a remarkable role in the history of humanity, since the discovery of the first antimicrobial revolutionized the treatment of infections by decreasing their mortality rates. However, concurrently with the clinical application of the first generation of antibiotics, antimicrobial resistance has emerged. The selection of resistant strains is mainly due to indiscriminate use of antimicrobial agents, the ability of microorganisms to acquire and spread resistance and the ability of humans to transmit microorganisms. The pharmacological properties of plants have been known empirically for centuries, the plants with medicinal properties are since ancient times, used in treating of various diseases. Interest in these metabolites is mainly due to the ability to produce biologically active compounds that can serve as models for synthesizing new drugs. Besides the antimicrobial activity of metabolites from plants, a new concept in the use of these products is being studied, the association with synthetic antimicrobial. The natural product may act to the target, the mechanism of microbial resistance or act synergistically with the antimicrobial agent through mechanism not yet characterized. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity and synergy of two plant species of the family Rutaceae: *Zanthoxylum tingoassuiba* and *Dictyoloma vandellianum*. The natural metabolites were produced through the hydro distillation in the case of essential oil, cold maceration for the methanol, hexane and dichloromethane extract, and partition for the aqueous and ethyl acetate extract. Antimicrobial activity was evaluated by the techniques disc diffusion, diffusion in well, macrodilution in agar and microdilution in broth, described by CLSI. While synergism was evaluated by combining the extracts of the antibiotic disks in the disk diffusion technique, and through association of the essential oil at concentrations subinibitory ($\frac{1}{2}$ and $\frac{1}{4}$ of the MIC) of antibiotic solution in broth microdilution technique. The results show that the essential oil of *Z. Tingoassuiba* and 08 of the 15 extracts showed antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, that oil enhanced the action of fluoroquinolones decreased MIC values in at least 02 times, that some extracts of *Z. tingoassuiba* (hexane and methanol extracts of leaves, hexane and methanol of stem) and dichloromethane extract of *D. vandellianum* potentiated the action of fluoroquinolones increased the inhibition of bacterial growth and, although not observed antifungal activity, the metabolites of *D. vandellianum* potentiated the action against fluconazole-resistant *Candida* isolates. Therefore, we concluded that metabolites extracted from the species under study have potential antimicrobial and synergistic.

Keywords: Rutaceae, *Zanthoxylum tingoassuiba*, *Dictyoloma vandellianum*, antimicrobial resistance, antimicrobial activity, synergism

Lista de Esquemas

Esquema 01	Placa de micro diluição de 96 poços	42
------------	--	-----------

Lista de Figuras

Figura 01	Mecanismo de resistência bacteriana	20
Figura 02	Estratégias bacterianas para antagonizar efeitos dos antibióticos e compostos inibidores de resistencia	23
Figura 03	Exsicata de <i>Zanthoxylum tingoassuiba</i>	29
Figura 04	Exsicata de <i>Dictyoloma vandellianum</i>	30
Figura 05	Fluxograma de Extração das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>	32
Figura 06	Fluxograma de Extração do caule de <i>Z. tingoassuiba</i>	33
Figura 07	Fluxograma de Extração da casca de raiz da <i>Z. tingoassuiba</i>	34
Figura 08	Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico das folhas da <i>D. vandellianum</i>	35
Figura 09	Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico da inflorescência da <i>D. vandellianum</i>	36
Figura 10	Esquema da Metodologia da difusão em poço	39
Figura 11	Atividade antibacteriana de extratos de <i>Z. tingoassuiba</i>, através do teste de difusão em disco frente ao isolado clínico de <i>S.aureus</i>.	52
Figura 12	Atividade antibacteriana do óleo de <i>Z. tingoassuiba</i>, através do teste de difusão em poço frente à cepa de <i>S.aureus</i> induzida 07.	52
Figura 13	Concentração Inibitória Mínima de extratos de <i>Z. tingoassuiba</i>, através da técnica da microdiluição para <i>S. aureus</i> cepa induzida 08	56

Figura 14	Concentração Inibitória Mínima de extratos de <i>D. vandellianum</i>, através da técnica da microdiluição para <i>S. aureus</i> cepa induzida 08	58
Figura 15	Efeito da associação do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i> (Zóleo) e ciprofloxacina (CIP) na atividade antibacteriana	59
Figura 16	Efeito da associação do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i> (Zóleo) e norfloxacina (NOR) na atividade antibacteriana	61
Figura 17	Efeito da associação do extrato metanólico das folhas de <i>D. vandellianum</i> e fluconazol na atividade antifúngica	69

Lista de quadros

Quadro 01	Extratos da espécie <i>D.vandellianum</i> cedidos para estudo	34
Quadro 02	Rendimento dos extratos de <i>Z. tingoassuiba</i>	47
Quadro 03	Rendimento das frações do extrato metanólico das folhas de <i>D. vandellianum</i>	48
Quadro 04	Rendimento das frações do extrato metanólico da inflorescência de <i>D. vandellianum</i>	48
Quadro 05	Perfil de susceptibilidade das cepas de <i>S.aureus</i>	49
Quadro 06	Atividade antibacteriana de algumas plantas da família de Rutaceae	76

Lista de tabelas

Tabela 01	Perfil de susceptibilidade de <i>S. aureus</i> antes e após indução de resistência frente à fluoroquinolonas	50
Tabela 02	Média dos halos de inibição de crescimento bacteriano dos metabólitos das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>, em milímetros de diâmetros	51
Tabela 03	Média dos halos de inibição de crescimento bacteriano dos metabólitos da casca da raiz e do caule de <i>Z. tingoassuiba</i>, em milímetros de diâmetro	53
Tabela 04	Média dos halos de inibição de crescimento bacteriano dos metabólitos de <i>D. vandelianum</i>, em milímetros de diâmetros	54
Tabela 05	Concentração inibitória mínima (CIM) de metabólitos de <i>Z. tingoassuiba</i>	56
Tabela 06	Concentração inibitória mínima (CIM) de metabólitos de extratos da <i>D.vandelianum</i>, em mg/mL	57
Tabela 07	Efeito da associação do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i> a ciprofloxacina na atividade antibacteriana, em mg/mL	59
Tabela 08	Efeito da associação do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i> a norfloxacina na atividade antibacteriana, em (mg/mL)	60
Tabela 09	Efeito da associação de metabólitos de Rutaceae ao disco de Ciprofloxacina na atividade antibacteriana	64
Tabela 10	Efeito da associação de metabólitos de Rutaceae ao disco de Norfloxacina na atividade antibacteriana	65
Tabela 11	Efeito da associação do extrato metanólico do caule de <i>Z. tingoassuiba</i> a fluoroquinolonas, na atividade antibacteriana	66

Tabela 12	Efeito da associação do extratos metanólicos de <i>D. vandellianum</i> ao fluconazol na atividade antifúngica, em milímetros de diâmetro	68
Tabela 13	Efeito da associação do extratos metanólicos das folhas de <i>D. vandellianum</i> ao fluconazol na atividade antifúngica, em milímetros de diâmetro.	69
Tabela 14	Efeito da associação das frações do extrato metanólico das folhas de <i>D. vandellianum</i> ao fluconazol na atividade antifúngica, em milímetros de diâmetro	71
Tabela 15	Efeito da associação das frações do extrato metanólico da inflorescência de <i>D. vandellianum</i> ao fluconazol na atividade antifúngica, em milímetros de diâmetro.	72

SUMÁRIO

1.0	Introdução	15
2.0	Justificativa e Objetivos.	26
3.0	Material e Métodos	28
3.1	Reagentes e equipamentos	28
3.2	Coleta e identificação do material vegetal	28
3.3	Obtenção de metabólitos	31
3.3.1	<i>Zanthoxylum tingoassuiba</i>	31
3.3.1.1	Obtenção do óleo essencial	31
3.3.1.2	Obtenção dos extratos	31
3.3.1.2.1	Extratos das folhas	31
3.3.1.2.2	Extratos do caule	32
3.3.1.2.3	Extratos da casca de raiz	33
3.3.2	<i>Dictyoloma vandellianum</i>	34
3.3.2.1	Fracionamento de extratos de <i>D. vandellianum</i>	35
3.3.2.1.1	Extrato metanólico das folhas	35
3.3.2.1.2	Extrato metanólico da inflorescência	36
3.4	Ensaio microbianos	37
3.4.1	Micro-organismos	37
3.4.2	Determinação do perfil de susceptibilidade antibacteriana	37
3.4.2.1	Difusão de disco	37
3.4.2.2	Difusão em poço.	39
3.4.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	40
3.4.3.1	Microdiluição em caldo	40
3.4.3.2	Macrodiluição em Agar	42

3.4.4	Determinação do perfil de susceptibilidade antifúngica	43
3.4.4.1	Difusão de disco	43
3.4.5	Avaliação da interferência dos metabólitos na atividade antimicrobiana	44
3.4.5.1	Através da difusão de disco	44
3.4.5.2	Através da técnica de microdiluição em caldo	45
3.4.6	Indução de resistência de <i>S.aureus</i> a fluoroquinolonas	46
3.4.7	Análise estatística	46
4.0	Resultados	47
4.1	Resultados fitoquímicos	47
4.1.1	Extração de metabólitos de <i>Z. tingoassuiba</i>	47
4.1.2	Fracionamento de extratos de <i>D. vandellianum</i>	48
4.2	Ensaio microbianos	49
4.2.1	Seleção de cepas para o estudo	49
4.2.2	Atividade antibacteriana dos metabólitos naturais	50
4.2.2.1	Difusão em disco e em poço	50
4.2.2.2	Determinação da concentração Inibitória Mínima (CIM)	55
4.2.3	Interferência de metabólitos naturais na atividade de fluoroquinolonas <i>S.aureus</i>	58
4.2.3.1	Do óleo essencial de <i>Z. tingoassuiba</i>	58
4.2.3.2	Dos extratos de <i>Z. tingoassuiba</i> e <i>D.vandellianum</i>	61
4.2.4	Atividade antifúngica dos extratos e frações de <i>D. vandellianum</i>	67
4.2.5	Interferência de metabólitos naturais na atividade do fluconazol frente aos isolados de <i>Candida spp</i> e <i>Cryptococcus spp</i>	67
4.2.5.1	Extratos de <i>D. vandellianum</i>	67
4.2.5.2	Frações dos extratos D6 e D2	70
5.0	Discussão	73
6.0	Conclusão	81

7.0 Perspectivas	82
8.0 Referências	83

1.0 Introdução

Doenças infecciosas representam uma das principais causas de morte no mundo com predominância em regiões tropicais. Nos países em desenvolvimento, o tratamento de tais doenças é difícil não só devido à ocorrência de micro-organismos resistentes, mas também por causa da baixa renda da população, que reduz drasticamente a acessibilidade a medicamentos adequados (KUETE et al, 2011).

As infecções microbianas tem papel marcante na história da humanidade e, de forma crescente, acumula evidências de que as intervenções humanas, associadas ao potencial de mudanças na estrutura genética dos micro-organismos, têm atuado sinergicamente no sentido de gerar variantes bacterianas de maior patogenicidade ou dotadas de resistência aos antibióticos disponíveis (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008)

Frequentemente citado como patógeno em infecções hospitalares, *Staphylococcus aureus* é um dos mais importantes agentes etiológicos de infecções humanas no século XXI. Isso se deve a sua virulência intrínseca, sua capacidade de causar infecções diversificadas (endocardites, pneumonia, meningites bacterianas e infecções purulentas) e a facilidade de adaptação às diferentes condições ambientais (LOWY, 2003; GIBBONS, 2004). São bactérias distribuídas na natureza como microbiota normal de pele e mucosa de indivíduos saudáveis, que com o aparecimento de lesões penetram no organismo (COUTINHO et al, 2009; MATIAS et al, 2010). Seu arsenal de fatores de virulência, como cápsula polissacarídica, peptidoglicano, ácido teicóico, proteína A, toxinas, permite contornar as defesas do hospedeiro e se estabelecer no organismo humano causando infecções graves (TANG e STRATTON, 2010).

Antes da descoberta dos antibióticos a mortalidade de pacientes com infecções causadas por *S. aureus* ultrapassava 80% (LOWY, 2003). Com a introdução da penicilina, no início dos anos 40, o prognóstico de pacientes com infecção estafilocócica melhorou, diminuindo a mortalidade e aumentando a qualidade de vida dos indivíduos infectados, já que o tempo de tratamento foi reduzido. No entanto, com o surgimento e disseminação de cepas resistentes a utilização desse antibiótico se tornou limitada. As penicilinas semissintéticas (metecilina e a oxacilina) foram então introduzidas na tentativa de solucionar o problema. Mas, pouco tempo depois surgiram os primeiros isolados de *S. aureus*

meticilina resistentes (MRSA) (REMONATTO et al, 2007; ANDRADE, 2008). Inicialmente, os MRSA's estavam associados restritamente a infecções nosocomiais, entretanto, novas cepas surgiram em meio à comunidade, tornando a prevalência dos MRSA's adquiridos na comunidade (CA-MRSA) cada vez maior (ZETOLA et al, 2005).

Enzimas denominadas beta-lactamases são produzidas por bactérias e responsáveis pela resistência à penicilina, pois hidrolisam o anel beta-lactâmico da estrutura química do antibiótico, inativando-o (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; SILVA, 2009). Já a resistência à meticilina está relacionada à produção de uma proteína de parede celular, chamada PBP (proteína ligadora de penicilina). Os beta-lactâmicos se ligam a essa proteína e impede a formação da parede celular, o que resulta na lise bacteriana. Os MRSA's produzem uma PBP modificada, denominada PBP2a, codificada pelo gene *mec A*, funcional para a célula bacteriana, porém com baixa afinidade pelo antimicrobiano permitindo a sobrevivência do estafilococo à exposição a altas concentrações desses agentes (SOUSA et al, 2005; REMONATTO et al, 2007).

Em 1980, fluoroquinolonas foram inicialmente introduzidas para o tratamento das infecções causadas por bactérias Gram negativas (LOWY, 2003). No entanto, devido ao seu amplo espectro de ação, toxicidade mínima sobre eucariotos, fácil penetração na maioria das células bacterianas e boas propriedades farmacocinéticas, esses antibióticos passaram a ser usados para tratar infecções causadas por pneumococos e estafilococos. As fluoroquinolonas foram consideradas agentes úteis no tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes de *S. aureus*, porém logo após a sua introdução em uso clínico, alto nível de resistência entre esses micro-organismos foi relatado (KAATZ e SEO, 1995; BLONDEAU, 1999).

Os mecanismos de resistência às fluoroquinolonas mais importantes e mais freqüentemente citados são alteração no sítio de ação desses antimicrobianos, pela DNA girase, através de mutações no gene *Gyr A*, e resistência mediada por transporte ativo da droga para fora da bactéria e proteínas de efluxo (LOWY, 2003).

Cepas MRSA são resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos o que inclui as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e representa um grande desafio no estabelecimento do tratamento. Entres os antibióticos mais antigos utilizados para o tratamento de MRSA estão a clindamicina e ciprofloxacina, porém,

no Brasil menos de 5% das cepas MRSA são sensíveis a esses antibióticos. O tratamento hospitalar de cepas MRSA geralmente é procedido com antibióticos potentes como vancomicina, linezulida e teicoplanida. No entanto, como alguns hospitais já apresentam casos de MRSA resistente também à vancomicina, a linezulida passa a ser a principal opção terapêutica (GIBBONS, 2005; MAHBOUBI e BIDGOLI 2009).

Dentre as infecções hospitalares, as oportunistas são aquelas causadas por agentes, muitas vezes presente no ambiente, mas incapazes de provocar doença caso o sistema imunológico do hospedeiro esteja intacto. Dentro do grupo dos agentes etiológicos destas infecções, as leveduras dos gêneros *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. são as mais frequentemente capazes de causar infecções em pacientes imunocomprometidos (LACAZ et al, 2002).

Candida spp. podem fazer parte da microbiota da pele e mucosas do ser humano desde o seu nascimento. Após a colonização, passam a causar infecções superficiais, em pessoas saudáveis, e sistêmicas em pacientes imunodeprimidos, como os indivíduos portadores de leucemia, linfoma, *Diabetes mellitus* e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), devido, principalmente, as alterações nos mecanismos de defesa, quebra das barreiras anatômicas e mudanças na microbiota normal do hospedeiro (NUNES, 2009).

A candidemia tem manifestações clínicas diversas e inespecíficas, sendo a febre a mais comum. A principal forma de contaminação é endógena, onde o paciente é colonizado e com a baixa do sistema imunológico a infecção se manifesta; entretanto pode ter origem exógena, principalmente em pacientes expostos a múltiplos procedimentos invasivos como uso de cateter venoso central, nutrição parenteral e pelas mãos colonizadas dos profissionais que prestam atendimento ao paciente (FRANÇA et al, 2008). No Brasil, as principais espécies causadoras de candidemia são *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*; já nos Estados Unidos da América (EUA) é crescente o número de casos de infecções por espécies não-*albicans* e esse fato tem estado associado à utilização indiscriminada do fluconazol (HINRICHSEN et al, 2008). As infecções fúngicas são tratadas com antimicrobianos do tipo azólicos (cetoconazol, econozal, sulconazol, miconazol, clotrimazol e feuconazol), alilaminas (naftina, terbinafina), hidroxipiridona, morfolina, compostos de selenium e anfotericina B lipossômica (PFALLER et al, 2010).

Já o gênero *Cryptococcus*, engloba 38 espécies sendo apenas duas envolvidas como patógeno humano: *C. neoformans* e *C.gattii* (LEITE, 2010). As doenças causadas por esses patógenos eram pouco comuns antes da epidemia da SIDA, porém surgiu como uma importante causa de morte em pessoas infectadas pelo vírus tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento (CABAÑES, 2008). A criptococose é uma doença infecciosa fúngica que atinge não somente o homem, mas também animais domésticos, principalmente os gatos e cães, e animais silvestres. Este patógeno oportunista é encontrado em frutas, pele de animais, mucosa oro nasal de pessoas saudáveis e, principalmente, no solo rico em excretas de aves (DE QUEIROZ et al, 2008).

São conhecidos cinco sorotipos (A, B, C, D e AD) que se distribuem entre as duas espécies da seguinte forma: *C. gattii* (sorotipos B e C), *C. neoformans* variedade *neoformans* (sorotipos D), *C. neoformans* variedade *grubii* (sorotipo A) e um híbrido AD, os quais diferem em aspectos bioquímicos, ecológicos, antigênicos e genéticos (KWON-CHUNG e VARMA, 2006; DE QUEIROZ et al, 2008). Os três principais fatores de virulência que conferem patogenicidade ao *Cryptococcus* são: capacidade do organismo de crescer a 37°C, de combater o dano oxidativo conferido pelo hospedeiro através da produção de melanina e desenvolvimento de cápsula polissacarídica de grande porte (LESTER et al, 2011). A infecção ocorre geralmente pela inalação de esporos da levedura presentes no ambiente, levando à infecção primária do sistema respiratório (DE QUEIROZ et al, 2008).

A infecção do sistema nervoso central, a meningite criptocócica, é a principal manifestação clínica do processo infeccioso por *Cryptococcus* e o arsenal de drogas antifúngicas utilizado no tratamento da mesma é restrito e atualmente se baseia na utilização de anfotericina B em associação com a 5-flucitosina, seguido de manutenção com o fluconazol. No entanto a disponibilidade de antifúngicos para tratamento de infecções fúngicas é pequena e ineficiente, além dessas drogas serem de alto custo e apresentarem grande toxicidade (LEITE, 2010). Portanto, de uma maneira geral, estas infecções são de difícil tratamento e a aquisição de resistência frente à ação de antifúngicos tem sido relatada (LIMA et al, 2006; CRUZ et al, 2007).

Dentre os mecanismos de resistência utilizados pelos fungos tem-se a superprodução de enzimas, implementações de vias metabólicas alternativas e a

produção de proteínas de bomba de efluxo que expulsam o medicamento da célula fungica (PINA-VAZ et al, 2005; LEITE, 2010).

A resistência microbiana surge quase concomitantemente com a aplicação clínica das primeiras gerações de antimicrobianos. Inicialmente o fenômeno da resistência não parecia ser um problema preocupante, pois era temporariamente resolvido com a introdução de novos agentes e alterações estruturais nos compostos já existentes que aumentavam o espectro de ação da droga. O aumento do arsenal de antibióticos e antifúngicos, cada vez mais potentes, associados a sua utilização indiscriminada, a capacidade microbiana de adquirir e disseminar resistência e a capacidade de seres humanos transmitirem micro-organismos, tem selecionado cepas microbianas cada vez mais resistentes. Esse fato tem levado mais rapidamente pacientes hospitalizados a óbito, além de aumentar significativamente os custos com relação ao tratamento da infecção (COUTINHO et al, 2009; MATIAS et al, 2010)

A resistência microbiana às drogas pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A intrínseca faz parte da herança genética do micro-organismo, das características naturais e fenotípicas e não apresenta qualquer risco à terapêutica, pois é previsível, basta conhecer o agente etiológico da infecção e os mecanismos de ação dos fármacos disponíveis clinicamente. 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. Essa nova propriedade é resultado de alterações estruturais ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extra-cromossômicas (plasmídios) podendo levar ao aparecimento de um exemplar muito resistente, que normalmente não perde viabilidade e patogenicidade (GOLD e MOELLERING,1996).

A aquisição de resistência pode ser originária de uma mutação ou da transferência de material genético. A mutação é um fenômeno espontâneo, resultado de um erro na replicação do DNA, normalmente envolvendo deleção, substituição ou adição de um ou mais pares de bases, levando a alterações na composição de aminoácidos de determinados peptídeos. Já a resistência transferível ocorre quando um dado micro-organismo recebe material genético de outro, passando a expressar a característica contida no gene recentemente adquirido (TAVARES, 2000)

Vários são os mecanismos através dos quais os micro-organismos se tornam resistentes às drogas (Figura 01). Um exemplo é a produção de enzimas inativadoras com capacidade de promover alterações estruturais na molécula da droga tornando-a inativa, como as beta-lactamases. Outro mecanismo conhecido é a alteração da permeabilidade da membrana bacteriana. Muitos antibióticos conseguem penetrar em bactérias através de canais protéicos presentes em sua membrana. Através desses canais, as drogas conseguem atingir seu receptor na parede celular e exercer sua ação bactericida. Como mecanismo de defesa, as bactérias, através de gerações, passaram a sintetizar esse canal em menor quantidade ou deixaram de produzi-los impedindo a entrada da droga na célula (HEMAISWARYA et al, 2008).

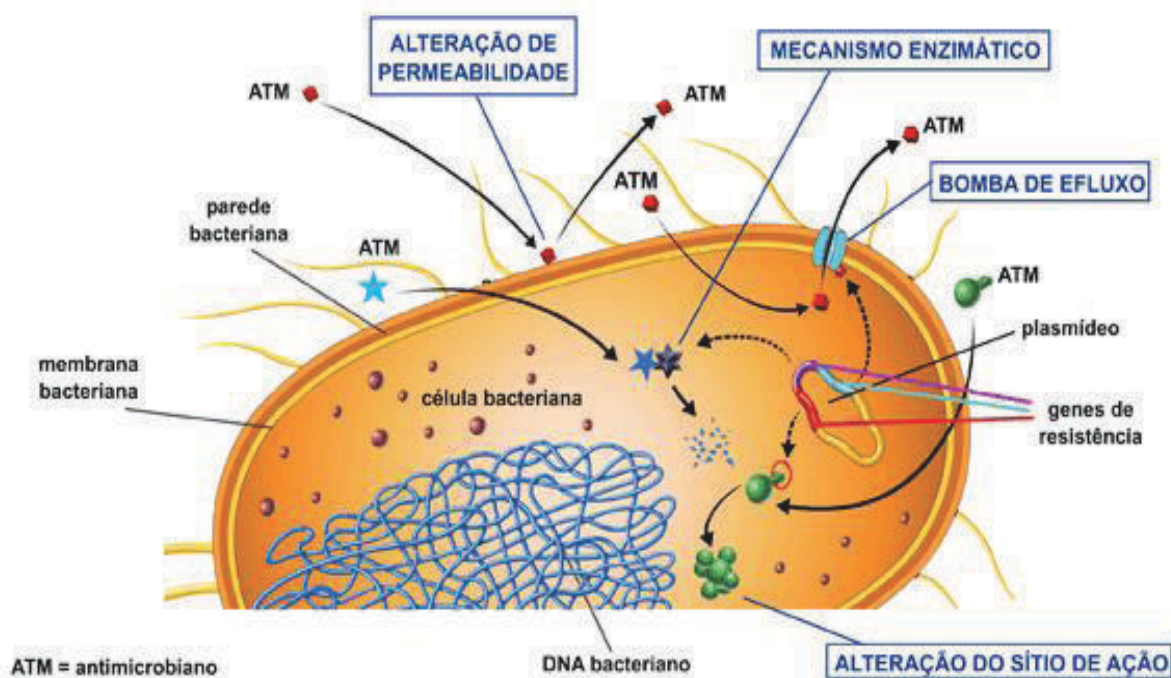


Figura 01 - Mecanismo de resistência bacteriana

Fonte: http://www.damedpel.com/CDD/4oAno/CGA/Antimicrobianos%20MS%20-%202008/opas_web/modulo3/image/geral.gif

Outro mecanismo de resistência cada vez mais relatado é o fenômeno da bomba de efluxo descrito em muitos organismos, incluindo bactérias, fungos e protozoários; além de células tumorais de mamífero. São proteínas de membrana capazes de expulsar o fármaco de dentro para fora da célula microbiana exportando uma grande variedade de drogas, resultando em uma redução na 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. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* são micro-organismos que utilizam estes transportadores, como parte de sua estratégia de resistência (GIBBONS et al, 2003b; SANGWAN et al, 2008).

Existe ainda o mecanismo de resistência baseado na alteração do sítio de ação da droga, como já foi relatado anteriormente para a penicilina. Mutações cromossômicas podem alterar bioquimicamente o receptor, impedindo a interação farmaco-receptor. As Proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) são enzimas envolvidas na síntese da parede celular bacteriana e servem como alvo para ação de drogas beta-lactâmicas. Sua inibição por essas drogas determina a formação de uma parede celular frágil que não suporta a diferença osmótica, levando à lise celular bacteriana. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é exemplo de micro-organismo que se torna insensível à ação de β -lactâmicos através de alterações nas PBPs, diminuindo a afinidade da droga pelas enzimas (HEMAISWARYA et al, 2008).

Todos esses mecanismos de expressão de resistência são cada vez mais freqüentes em inúmeros micro-organismos, alguns deles expressando mais de uma forma de resistência. Com o desenvolvimento progressivo da resistência aos antimicrobianos, as propriedades biológicas dos produtos vegetais vêm sendo estudadas em busca de novos alvos com ação antimicrobiana (ARYA et al, 2010).

As propriedades farmacológicas das plantas têm sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram cientificamente confirmadas apenas nas últimas décadas. Filtrados, infusões, macerados, sucos e extratos de plantas com propriedades medicinais são utilizados no tratamento de diversas doenças, desde a antiguidade (COUTINHO et al., 2008). O interesse por esses metabólitos extraídos de plantas se deve, principalmente, à capacidade de produção de compostos biologicamente ativos que podem servir de modelos para a síntese de novos fármacos e por possuírem propriedades terapêuticas utilizadas como tratamento alternativo no cuidado de saúde tradicional (GIBBONS, 2005).

O Brasil, detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, possui uma grande diversidade genética vegetal ainda pouco explorada. Dados revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (PINTO et al, 2002). Essa grande diversidade genética vegetal que

representa aproximadamente um terço da flora mundial é promissora em compostos com potencial bioativo (YUNES et al, 2001). Essa riqueza necessita ser mais explorada, pois compostos potencialmente úteis podem ser perdidos, deixando de serem descobertos, devido à extinção de algumas espécies (PATINÕ e CUCA, 2011).

A Organização Mundial de Saúde, desde 1977, incentiva estudos que avaliem cientificamente os benefícios e riscos do uso tradicional de plantas como medicamentos. São necessárias evidências laboratoriais e clínicas a respeito da eficácia dessas plantas medicinais utilizadas tradicionalmente pela população (LOGUERCIO et al, 2005).

Metabólitos secundários, produzidos por algumas espécies de plantas, são alvos de mais interesse, pois agem como substâncias de defesa contra micro-organismos patogênicos, insetos e animais herbívoros. Possuem composição química variada com presença de terpenóides, alcalóides e cumarinas, que apresentam, com freqüência, atividade antimicrobiana (RESCHKE et al, 2007).

Além da atividade antimicrobiana de metabólitos extraídos de plantas, um novo conceito na utilização desses produtos vem sendo estudado, a associação com antimicrobianos sintéticos (COUTINHO et al, 2009; MATIAS et al, 2010). O produto natural pode agir tendo como alvo o mecanismo de resistência microbiana e serem considerados como moduladores de resistência (Figura 02) ou agir de forma sinérgica com o antimicrobiano, através de mecanismo ainda não caracterizado (GIBBONS, 2005).

O conceito de utilização de um composto que inibe a resistência de um micro-organismo e que pode ser usado em associação com antimicrobiano convencional já é bem aceito clinicamente, como por exemplo, na combinação dos antibióticos amoxicilina (um beta-lactâmico) com ácido clavulânico (um inibidor microbiano de beta-lactamases). A eficácia da ação antibacteriana é aumentada, pois o inibidor estabiliza a amoxicilina, impedindo a degradação pelas enzimas beta-lactamases produzidas pela bactéria como um mecanismo de defesa e sobrevivência do micro-organismo (GIBBONS, 2004; SANGWAN et al, 2008).

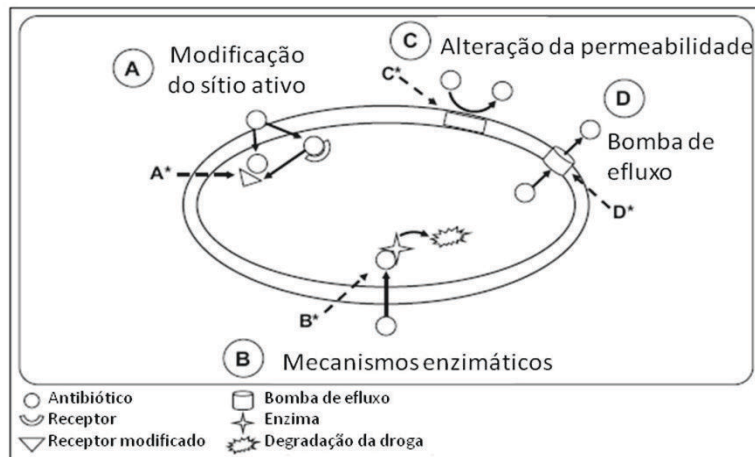


Figura 02- Estratégias bacterianas para antagonizar efeitos dos antibióticos

e compostos inibidores de resistência: (A*) modificadores de receptor dos antibióticos; (B*) inibidores enzimáticos; (C*), compostos que aumentam a permeabilidade da membrana e (D*) inibidores de bombas de efluxo.

Fonte: (WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009)

Várias plantas e substâncias extraídas das mesmas, quando associadas aos antimicrobianos possuem atividade moduladora de resistência ou ação sinérgica sobre os micro-organismos. Extratos da *Camellia sinensis* já foram descritos devido seu efeito sinérgico com metilina inibindo a resistência em cepas MRSA. Segundo Yam e colaboradores (1998) componentes da planta tem a propriedade de inibir a síntese de PBP2 além de inibir a liberação de beta-lactamases, esses compostos são considerados inibidores enzimáticos (Figura 02- B). A reserpina, alcalóide isolado da *Rauwolfia serpentina* (Apocynaceae), apresenta atividade potencializadora da ação de alguns antibióticos como tetraciclina, norfloxacina e ciprofloxacina em cepas multiresistentes (MDR) que possuem bomba de efluxo como mecanismo de resistência (GIBBONS e UDO, 2000) (Figura 02- D).

Outros alcalóides semelhantes à reserpina, e que possuem a mesma propriedade, são geralmente isolados de espécies das famílias Rutaceae, Ranunculaceae e Menispermaceae (GIBBONS, 2005). Agindo também como modificadores de resistência, os compostos isolados do óleo essencial da *Thymus vulgaris* facilitam a penetração do antibiótico aumentando a permeabilidade da membrana de bactérias Gram negativas (WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009) (figura 02- C). Outro exemplo é a associação natural do alcalóide berberina com o “5’methoxyhydnocarpin” (5-MHC). Berberina extraído das espécies *Hydrastis canadensis* e *Echinacea* species possui atividade antibacteriana excelente, porém é

facilmente bombeado para fora da célula bacteriana através do mecanismo de resistência de bomba de efluxo; entretanto, as espécies de plantas produzem além de berberina e o 5-MHC um inibidor de bomba de efluxo que quando associado potencializa a ação da berberina (BALL et al, 2006).

Incluída na ordem Rutales, a família Rutaceae é composta por árvores e arbustos que apresentam gêneros com importância econômica como exemplo *Citrus* com frutos comestíveis, *Flindersia* com sua madeira utilizada comercialmente na produção de brinquedos e como lenha, *Boronia* com seus óleos aromáticos. A família é composta por aproximadamente 150 gêneros e 1600 espécies, distribuídas em regiões tropicais e temperadas do mundo, sendo mais abundante na América tropical, sul da África e Austrália. No Brasil, existem cerca de 190 espécies que apresentam propriedades biológicas, sendo considerada como fonte de alcalóides, cumarinas, flavonóides e limonóides que apresentam atividade antibacteriana e antifúngica (SEVERINO et al, 2009; PAVITHRA, et al., 2009; DURAI PANDIYAN e IGNACIMUTHU, 2009).

Pertencente à família Rutaceae, o gênero *Zanthoxylum* compreende cerca de 550 espécies, distribuídas mundialmente, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. Diversas atividades biológicas e uso medicinal são descritas para partes aéreas e subterrâneas deste grupo como: atividade antidiarréica para *Z. rhetsa* (RAHMAN, 2002), leishmanicida de *Z. chiloperone* (FERREIRA et al, 2002), inibidora da monoamina oxidase de *Z. schinifolium* (JO et al, 2002) e antimicrobiana de *Z. rhoifolium* (DE ABREU, 2003), *Z. clava-herculis* (GIBBONS et al, 2003a), *Z. chiloperone* (THOUVENEL et al, 2003), *Z. xanthoxyloides* (DIEGUEZ-HURTADO et al, 2003), *Z. leprieurii* (TATSADJIEU et al, 2003) e *Z. chalybeum* (OLILA et al, 2001). Porém, os estudos com óleo essenciais e sua atividade antimicrobiana foram observados em: *Z. datum* (JAIN e KAR, 1971); *Z. xanthoxyloides* (NGASSOUM et al, 2003) e *Z. rhoifolium* (GONZAGA et al, 2003). Patinõ e Cuca (2011) acreditam que *Zanthoxylum* spp. têm grande importância etnobotânica e biológica sendo uma fonte promissora de alcalóides com interessantes propriedades antimicrobianas.

A espécie *Z. tingoassuiba* A. St. Hil. de sinônimas *Zanthoxylum articulatum* Engl., *Xanthoxylum tingoassuiba* ou *Fagara tingoassuiba* Hoene é popularmente conhecida como casca preciosa, tinguaciba-da-restinga, limão bravo, laranjeira-domato, mamica-de-porca ou limãozinho. Encontrada com ampla distribuição nos estados da Bahia, Maranhão, Amazonas, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de

Janeiro, Goiás e São Paulo, hoje, é extinta em muitos desses estados. Foi descrita na Farmacopéia Brasileira, 1^o edição, em 1926, dentre as 710 espécies de plantas com atividade farmacológica. É utilizada popularmente devido a sua ação antiespasmódica, relaxante muscular, anti-agregação plaquetária, diurética, antiparasitária, antifúngica além de antiinflamatória para infecções de garganta (DA SILVA et al, 2008).

Estudos fitoquímicos e antibacteriano do óleo essencial dessa espécie foram realizados por Detoni e colaboradores (2009) e o estudo fitoquímico dos frutos e caule descrito por Da Silva e colaboradores (2008), ambos colaboradores do nosso grupo. O óleo apresentou como componentes majoritários antranilato de metila e alfa-bisabolol e atividade antimicrobiana frente a cepas bacterianas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* e *Salmonella cholerae-suis* e para fungos dermatofitos como *Trichophyton mentagrophyes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum*. Já o estudo fitoquímico dos frutos e caule descreve a presença de triterpeno lupeol, lignana sesamina além dos alcalóides benzofenantridínico, que apresentam diversas atividades biológicas, inclusive anti-viral; alcalóide quaternário cloreto de 1-hidroxi-2,9,10-trimetoxi-*N,N*-dimetilaporfina, tembamida e o alcalóide aporfínico com efeito bloqueador neuromuscular (DA SILVA et al, 2008).

Dictyoloma spp. Juss., outro gênero da família Rutaceae, é composto apenas de duas espécies a *D. vandellianum* Adr. Juss. (Syn. *D. incanescens* DC), que ocorre no Brasil, e a *D. peruvianum* com distribuição no Peru e Bolívia. Popularmente conhecida como Tingui Preto, *D. vandellianum* é uma espécie arbórea com altura variando de 4,0 a 7,0m, com tronco de 20 a 30 cm de diâmetro. A madeira é indicada para a fabricação de forros, brinquedos e usada frequentemente como lenha ou carvão. Por ser uma árvore de pequeno porte pode ser empregada no paisagismo e na arborização de ruas. Além disso, é considerada planta de rápido crescimento podendo ser indicada para plantios mistos destinados à recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente (DA SILVA e PAOLI, 2006)

Mesmo tendo sido pouco estudada, a espécie é conhecida por conter alcalóides, cromonas prenilados e limonóides, compostos importantes para a classificação sistemática do gênero na família Rutaceae (SARTOR et al, 2003).

Alcalóides com atividade anti *Leishmania* com ação seletiva sobre o parasita foi descrita por LAVAUD e colaboradores (1995).

2.0 Justificativa e objetivos

Dictyoloma vandellianum e *Zanthoxylum tingoassuiba* foram selecionadas para esse estudo, por serem espécies nativas do estado da Bahia e conhecimentos gerados irão contribuir para a caracterização da flora regional e de sua potencial atividade antimicrobiana e sinérgica, além de dar continuidade a trabalhos desenvolvidos pelo grupo que mostram a capacidade de alguns metabólitos extraídos dessas plantas de inibir micro-organismos.

A bactéria *Staphylococcus aureus* é frequentemente citada como patógeno em infecções adquiridas em hospital e possuem grande capacidade em adquirir resistência, já mostrando alguns isolados resistentes a praticamente todos os agentes antimicrobianos da prática clínica. Resultados anteriores de atividade antibacteriana positiva de alguns metabólitos das plantas frente a *S. aureus* estimularam o uso desse micro-organismo como modelo na busca do esclarecimento da atividade moduladora da resistência. Para ampliar o estudo, leveduras dos gêneros *Candida* spp. e *Cryptococcus* ssp. foram escolhidas por serem os fungos mais frequentemente envolvidos como patógenos em infecções humanas, além da coleção de cultura do Laboratório de pesquisa em microbiologia clínica (LPMC) possuir um grande número de isolados clínicos armazenados.

Portanto, o objetivo geral desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e sinérgica de metabólitos extraídos das espécies *Z.tingoassuiba* e *D. vandellianum* (Rutaceae), na busca por novas substâncias que possam ser utilizadas como antimicrobianos ou em associações com aqueles existentes no mercado.

E como objetivos específicos foram traçados os seguintes itens:

1. Determinar a atividade anti estafilocócica de metabólitos extraídos das folhas, caule e casca de raiz de *Z.tingoassuiba* e das folhas, inflorescência, caule e raiz de *D. vandellianum*;
2. Avaliar a ação sinérgica dos metabólitos das espécies de planta *Z. tingoassuiba* e *D. vandellianum* com as fluoroquinolonas, norfloxacin e ciprofloxacina frente a isolados de *S. aureus* multirresistentes;

3. Determinar a atividade antifúngica dos extratos e frações provenientes das folhas e inflorescências da espécie *D. vandellianum* frente a isolados do gênero *Candida* e *Cryptococcus*;
4. Avaliar a ação sinérgica dos extratos e frações provenientes das folhas e inflorescências da espécie *D. vandellianum* com o fluconazol frente a isolados clínicos de *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.

3.0 Material e Métodos

3.1 Reagentes e equipamentos

Os solventes utilizados foram de grau analítico das marcas MERCK, GRUPO QUÍMICA, QUIMEX, SYNTH, CRQ e QHEMIS.

Para triturar o material vegetal estudado foi utilizado moinho THOMAS WILY LABORATORY MILL-MODEL 4.

A hidro destilação foi realizada em aparelho do tipo Clevenger.

As rotaevaporações dos solventes contidos em extratos e frações foram realizadas sob pressão reduzida utilizando evaporadores rotativos da marca FISATOM.

Nas separações cromatográficas em coluna foram usadas sílica gel 60 (70-230 mesh/ 0,063-0,200 mm/ 40-63 μm) das marcas Merck e Vetec.

3.2 Coleta e identificação do material vegetal

A coleta da *D. vandellianum* foi realizada no dia 02 de maio de 2009 na Chapada Diamantina - Bahia e a de *Z. tinguassuiba* foi coletada no dia 12 de agosto de 2009 no distrito de Jaíba município de Feira de Santana- Bahia. As folhas foram armazenadas em geladeira até o momento da extração e o caule , casca de raiz e raiz a temperatura ambiente.

As espécies foram encaminhadas para o Herbário Alexandre Leal Costa (ALCB) do Instituto de Biologia da Universidade de Federal da Bahia onde foram identificadas pela Prof^a Dr^a e curadora Maria Lenise Silva Guedes. Suas exsicatas encontram-se catalogadas no herbário ALCB, sob os números 88005 para a espécie *Z. tinguassuiba* (Figura 03) e sob o número 88951 para a *D. vandellianum* (Figura 04).

Folhas, caule e casca de raiz de *Z. tinguassuiba* e folhas, inflorescência, caule e raiz de *D. vandellianum* foram os órgãos estudados.

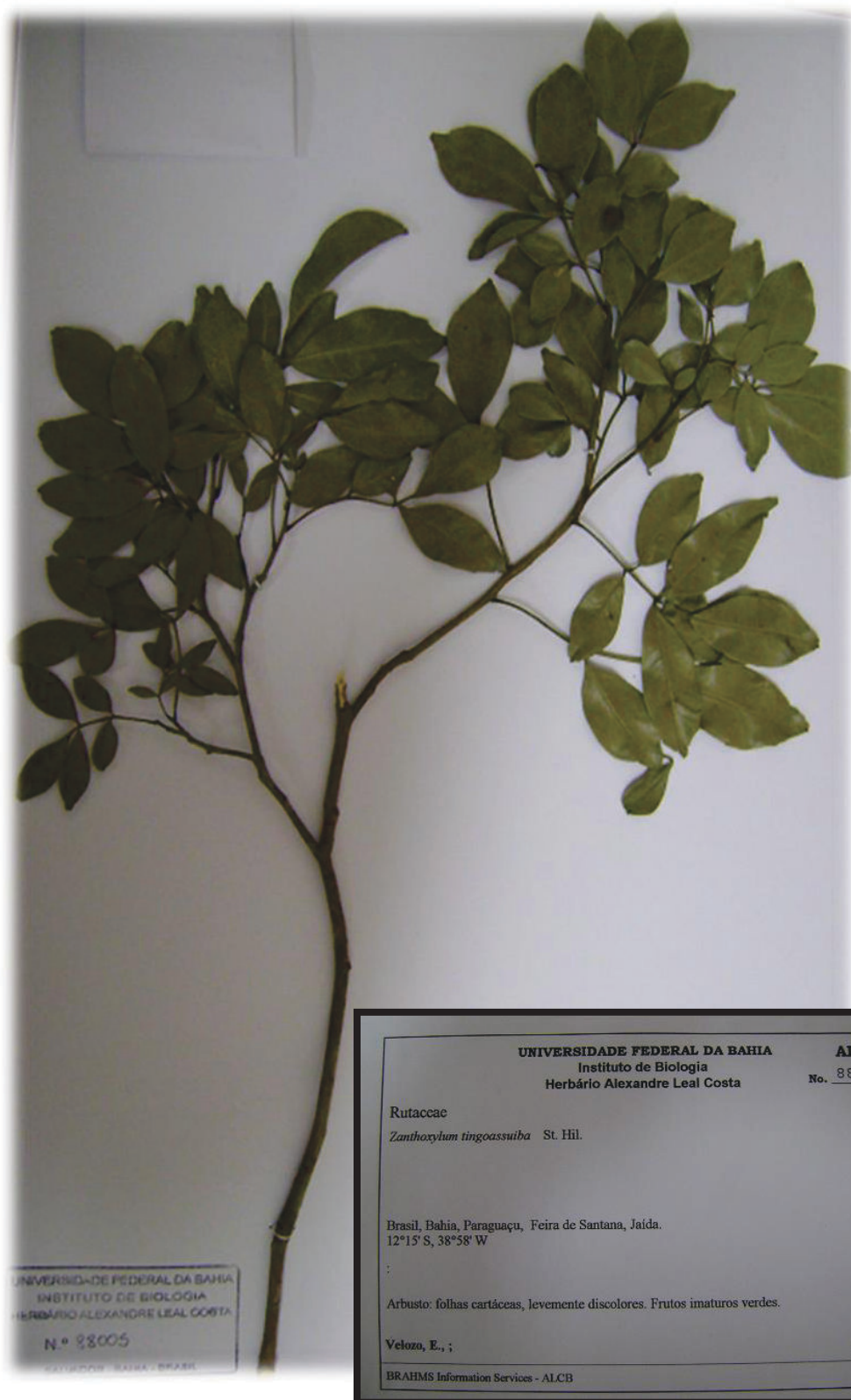


Figura 03 - Exsicata de *Zanthoxylum tingoassuiba*. Depositada no Herbário ALCB, sob o número 88005.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Biologia
Herbário Alexandre Leal Costa

ALCB
No. 88951

Rutaceae
Dictyoloma vandellianum A. Juss.

Determinador: Guedes, M.L. (Julho 2009)

Brasil, Bahia, Chapada Diamantina, Piatã, Caminho para Três Morros Ponto 01.
13°04'25" S, 41°04'51" W alt. 1304m

Árvore: de ca 3 m de altura. Foliólulos membranáceos, discoloros, face abaxial vilosa. Inflorescência uma longa panícula de flores cremes.

Guedes, M.L., 15082; Gomes F.G.; Alunos de Bot.III, 1º Semestre de... 2 Maio 2009

BRAHMS Information Services - ALCB

DIGITADA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
HERBÁRIO ALEXANDRE LEAL COSTA
Nº 88951
SALVADOR - BAHIA - BRASIL

Figura 04 - Exsicata de *Dictyoloma vandellianum*. Depositada no Herbário ALCB, sob o número 88951.

3.3 Obtenção de metabólitos

As extrações dos produtos naturais utilizados nesse estudo foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Matérias Médicas (LAPEMM) localizado na Faculdade de Farmácia da UFBA.

3.3.1 *Zanthoxylum tingoassuiba*

3.3.1.1 Obtenção do óleo essencial

Para a obtenção do óleo essencial, aproximadamente 1311,0g das folhas frescas foram submetidas ao processo de hidrodestilação durante 4 horas, em aparelho do tipo Clevenger a temperatura de 40°C.

3.3.1.2 Obtenção dos extratos

3.3.1.2.1 Extratos das folhas

Após o processo de hidro destilação, as folhas remanescentes e a água do decocto foram separadas por filtração. As folhas foram submetidas ao processo de maceração a frio com três extrações sucessivas com metanol, tendo como tempo de contato uma semana por extração. Após filtração do solvente extrator, o filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em rota evaporador e seco em capela e dessecador a vácuo até atingir massa constante. O extrato gerado foi o Metanólico 1 das folhas. A água do decocto foi particionada com o solvente acetato de etila gerando duas fases, a orgânica que deu origem ao extrato acetato de etila após concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador e secagem em capela e disseccador até atingir massa constante; e a fase inorgânica, após seco em estufa à temperatura de 80°C, originou o extrato aquoso.

Aproximadamente 716,7g das folhas verdes de *Z. tingoassuiba* foram submetidas a três extrações sucessivas com o solvente hexano e posteriormente outras três com metanol, com tempo de contato de uma semana por extração, originando os extratos hexânico e metanólico 2, respectivamente, após processo de

concentração em rotaevaporador e de secagem em dissecador até obter massa constante (Figura 05).

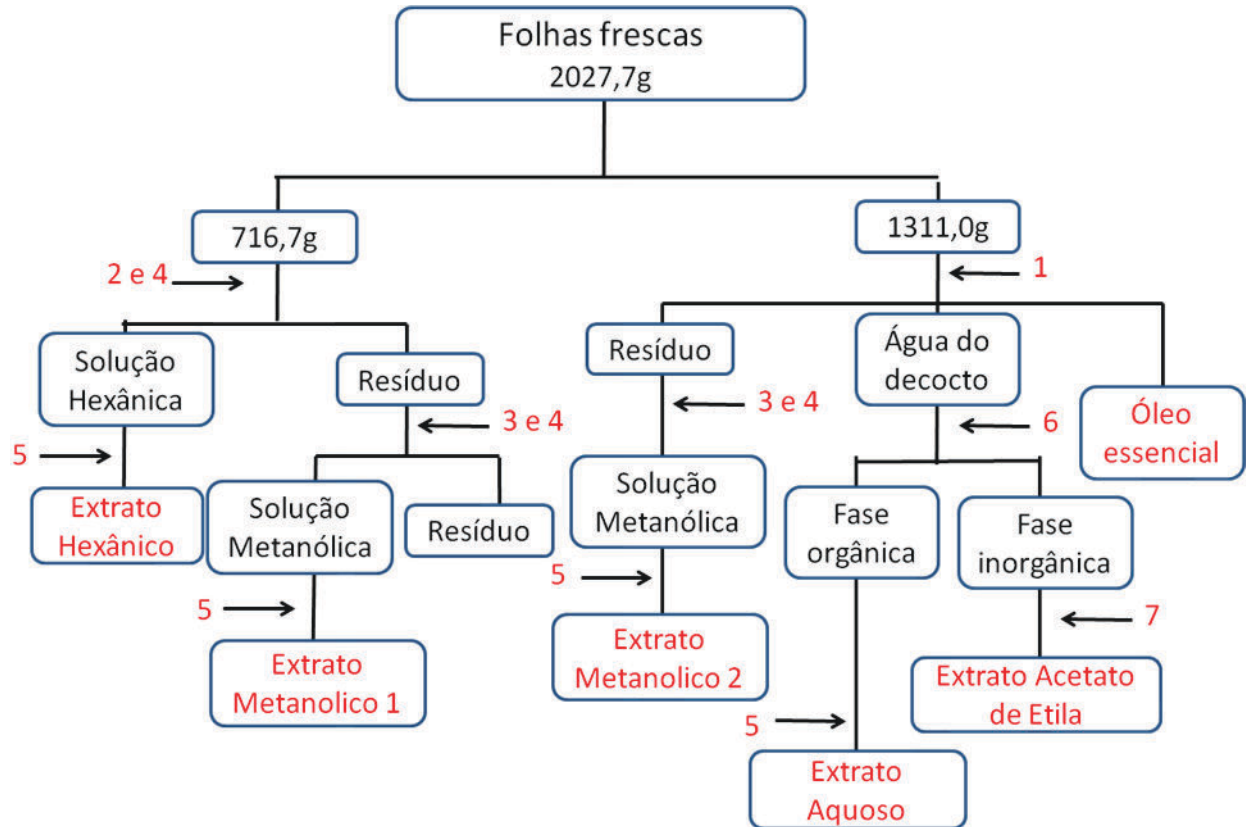


Figura 05- Fluxograma de Extração das folhas de *Z. tingoassuiba*.

1- Hidro destilação; 2- Maceração com Hexano (3x); 3- Maceração com Metanol (3x); 4- Filtração simples; 5- Evaporação sob baixa pressão; 5- Evaporação sob baixa pressão, 6- Partição com Acetato de Etila e 7- Evaporação em estufa a 80 °C.

3.3.1.2.2 Extratos do caule

Após seco à temperatura ambiente, o caule foi triturado e obteve-se uma massa de 931,7g. O material moído foi submetido a três extrações sucessivas com hexano e posteriormente, outras três extrações com metanol, com tempo de contato de uma semana por extração, originando os extratos hexânico e metanólico do caule após processo de concentração em rotaevaporador e de secagem em dissecador até obter massa constante (Figura 06).

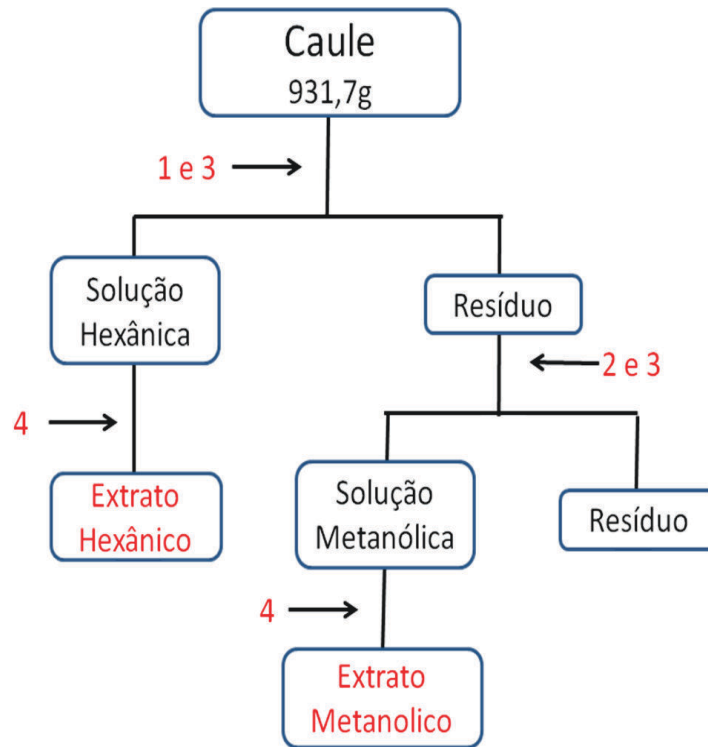


Figura 06- Fluxograma de Extração do caule de *Z. tingoassuiba*.

1- Maceração com Hexano (3x); 2- Maceração com Metanol (3x); 3- Filtração simples; e 4 - Evaporação sob baixa pressão.

3.3.1.2.3 Extratos da casca da raiz

A raiz seca, teve a parte cortical (casca) separada da parte medular. A casca da raiz foi triturada, obtendo-se uma massa de 217,7g. O material moído foi submetido a três extrações sucessivas com diclorometano e posteriormente, outras três extrações com metanol, com tempo de contato de uma semana por extração, originando os extratos diclorometânico e metanólico da casca de raiz, respectivamente, após processo de concentração em rota evaporador e de secagem em dissecador até obter massa constante (Figura 07).

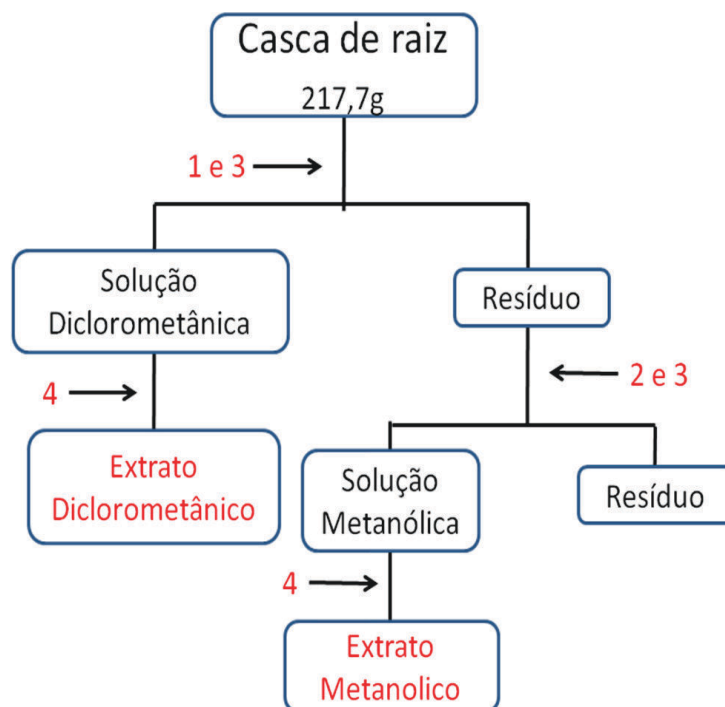


Figura 07 - Fluxograma de Extração da casca de raiz da *Z. tingoassuiba*.

1- Maceração com Diclorometano (3x); 2- Maceração com Metanol (3x); 3- Filtração simples e 4 - Evaporação sob baixa pressão.

3.3.2 *Dictyoloma vandellianum*

Os extratos da espécie *D. vandellianum* foram produzidos por alunos de iniciação científica do LAPEMM da UFBA sobre a orientação do Prof^o. Dr^o Eudes da Silva Velozo. Os extratos que foram cedidos para o estudo estão apresentados no Quadro 01.

Material Vegetal	Extrato
Raiz	Extrato Metanólico
Inflorescência	Extrato Metanólico
Caule	Extrato Hexânico
	Extrato Metanólico
Folha	Extrato Diclorometânico
	Extrato Metanólico

Quadro 01- Extratos da espécie *D.vandellianum* cedidos para estudo

3.3.2.1 Fracionamento de extratos de *D. vandellianum*

3.3.2.1.1 Extrato metanólico das folhas

Aproximadamente 106,0g do extrato metanólico das folhas foram submetidos a cromatografia em coluna rápida com o objetivo de fracionar o extrato com solventes de diferentes polaridades. Foi utilizado sílica gel em uma proporção extrato/sílica de 1:5 após maceração em gral até a formação de uma mistura homogênea. Os solventes utilizados como fases móveis foram o diclorometano, acetona, clorofórmio e metanol na proporção de 95:5 e metanol. Para auxiliar na sucção dos solventes foi utilizada uma bomba de baixa pressão. Após o processo de concentração em rotaevaporador e secagem em dissecador até obter massa constante foram originados quatro frações: a diclorometânica, a acetônica, a clorofórmio: metanol 95:5 e a metanólica (Figura 08).

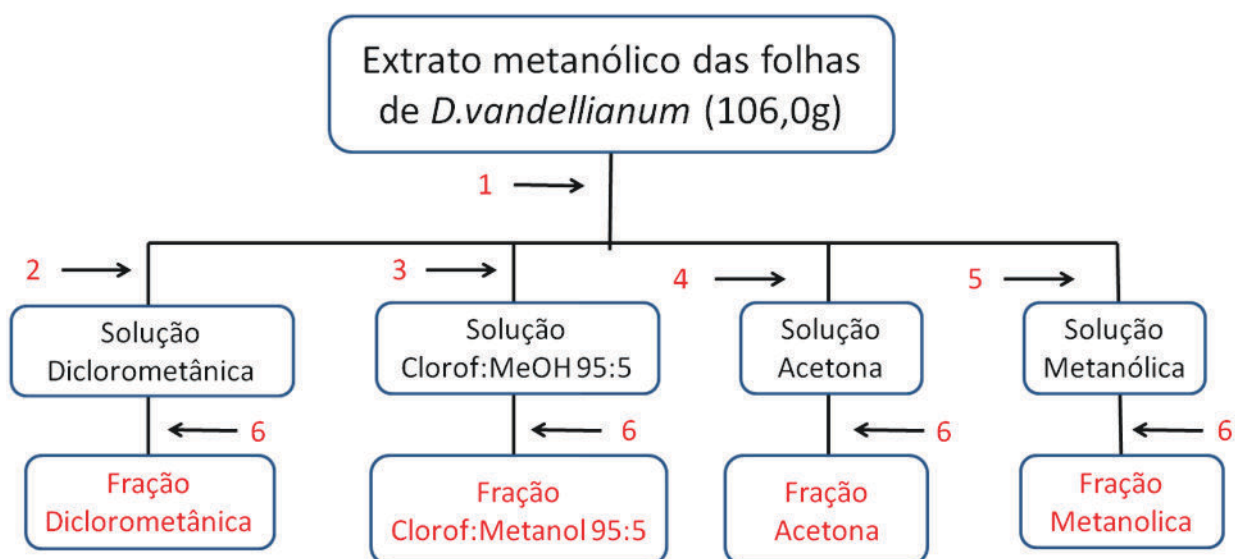


Figura 08 - Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico das folhas da *D. vandellianum*. 1- Cromatografia rápida; 2- Extração com Diclorometano; 3- Extração com Clorofórmio: MeOH 95:5; 4- Extração com Acetona; 5- Extração com Metanol e 6- Evaporação sob baixa pressão

3.3.2.1.2 Extrato metanólico da inflorescência

Aproximadamente 63,0g do extrato metanólico da inflorescência foram fracionados através do método de partição líquido-líquido, com água e diferentes solventes extratores. O extrato foi inicialmente diluído em água destilada e posteriormente filtrado obtendo-se a fração aquosa e o resíduo. A fração aquosa foi particionada, em funil de separação, inicialmente com o solvente clorofórmio seguido do acetato de etila e butanol. As frações resultantes desse processo foram a cloroformica, acetato de etila, butanólica, que foram originadas após concentração em rotaevaporador e secagem em dissecador até a obtenção de massa constante (Figura 09).

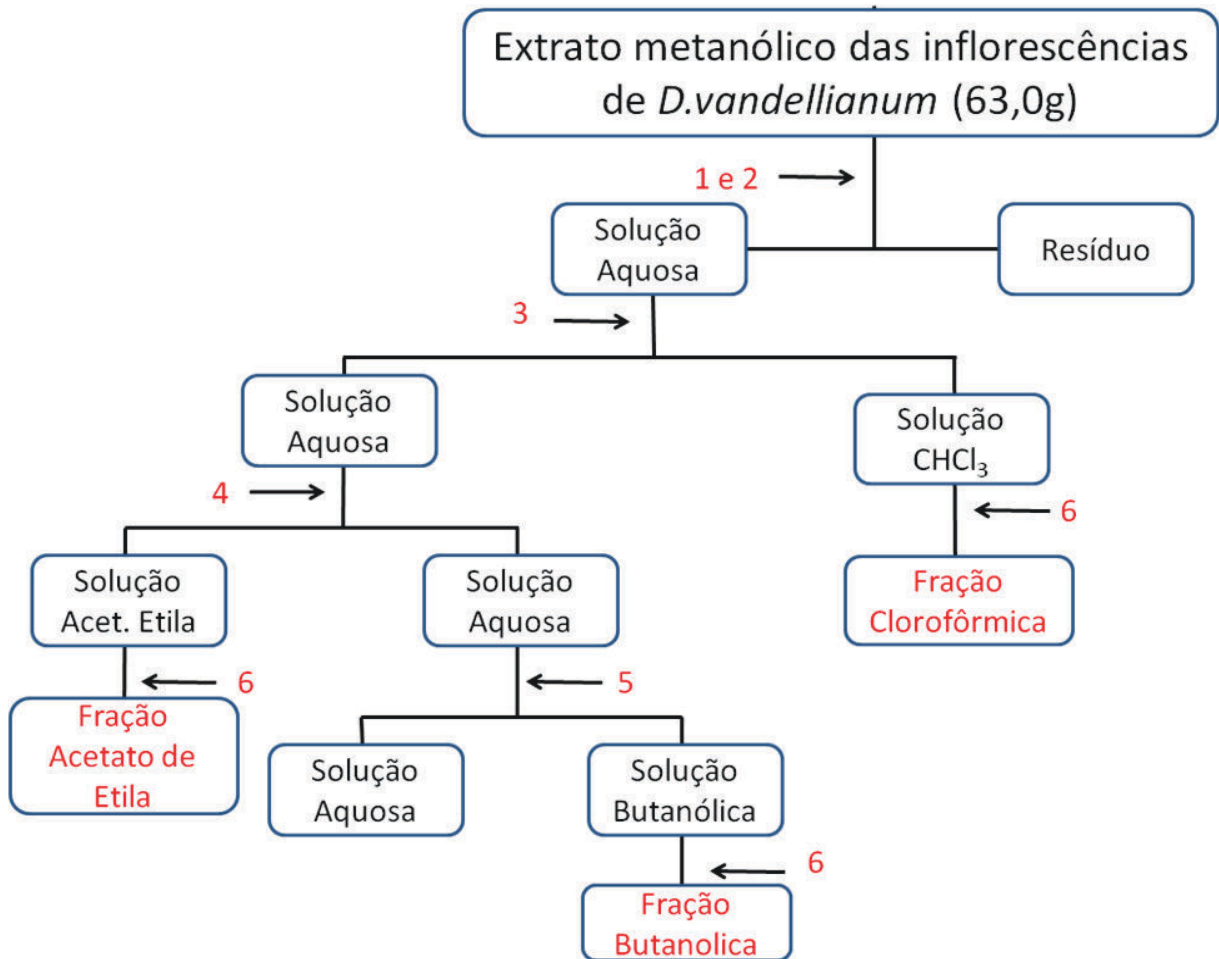


Figura 09 - Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico da inflorescência da *D. vandellianum*. 1- Solubilização do extrato em água destilada; 2- Filtração; 3- Partição com o solvente clorofórmio; 4- Partição com o solvente acetato de etila; 5- Partição com o solvente butanol; 6- Evaporação sob baixa pressão.

3.4 Ensaios microbianos

Os ensaios microbianos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Clínica (LPMC) da Faculdade de Farmácia da UFBA.

3.4.1 Micro-organismos

Um total de onze cepas de *Staphylococcus aureus* foi utilizado no estudo, oito isolados clínicos hospitalares e três cepas padrão da “American Type Culture Collection” (ATCC) de numerações 25923, 33591 e 43300. As bactérias foram armazenadas e conservadas na Coleção de Cultura do LPMC da Faculdade de Farmácia da UFBA, congeladas em freezer na temperatura de -20°C, em Caldo Mueller-Hinton (CMH – ACUMEDIA) acrescido de 20% de glicerol (SYNTH), e em geladeira por repiques freqüentes em agar de soja e tripticaseína (TSA – ACUMEDIA). No momento do uso, as bactérias foram subcultivadas em TSA e incubadas a 35°C por 24 horas.

Também foram utilizados oito isolados clínicos hospitalares de leveduras do gênero *Cryptococcus* sp., nove de *Candida* sp. e uma cepa padrão ATCC de *C. parapsilosis* sob número 22019 que também estavam conservadas em freezer na temperatura de -20°C, em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD– ACUMEDIA) acrescido de 20% de glicerol e glicerol puro e, em geladeira, por repiques sucessivos em Agar Sabouraud Dextrose (ASD – ACUMEDIA). No momento do uso, os fungos foram subcultivados em ASD e incubados a 35°C por 24 a 48 horas.

3.4.2 Determinação do perfil de susceptibilidade antibacteriana

3.4.2.1 Difusão de disco

Foram realizados ensaios utilizando as bactérias em estudo de acordo com o protocolo M02-A10 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009) para discos disponíveis no comércio e com o mesmo protocolo adaptado para produtos naturais.

a) Discos

Comerciais - foram utilizados discos de antibióticos disponíveis no comércio (Amoxicilina (30µg), Ampicilina (10µg), Oxacilina (1µg), Clindamicina (2µg), Eritromicina (15µg), Ciprofloxacina (5µg), Levofloxacina (5µg) e Ofloxacina (5µg) – (SENCIFAR)

De produtos naturais – discos de papel de filtro estéreis, de seis milímetros (mm) de diâmetro, foram impregnados com 10µL da solução do extrato dissolvido em Dimetilsulfóxido (DMSO - FMAIA) na concentração de 300µg/µL.

b) Preparo de inóculo bacteriano

Os isolados foram semeados em ágar Mueller-Hinton (AMH – ACUMEDIA) e incubados a 35°C por 18 a 24 horas. Após o período de incubação, colônias de morfologias semelhantes foram suspensas em solução salina (0,85%) estéril, cuja turvação foi ajustada a escala padrão de turbidez 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e, em seguida, com auxílio de swab estéril, a suspensão foi semeada na superfície de uma placa de petri contendo AMH, com espessura de quatro milímetros (mm), em três direções.

c) Aplicação de discos

Após seco o inóculo, os discos foram assepticamente distribuídos nas placas as quais foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após o período de incubação, os halos de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos discos foram medidos em mm de diâmetro e os resultados foram interpretados: para os discos comerciais de acordo com critérios sugeridos pelo protocolo do CLSI e para os discos preparados com metabólitos naturais foram considerados com atividade antimicrobiana positiva o extrato ou fração que apresentou formação de halo de inibição de crescimento microbiano igual ou superior a nove mm de diâmetro.

d) Controle de experimento

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e para controle de qualidade e reprodutibilidade foi utilizada a cepa padrão ATCC *Staphylococcus aureus* 25923 frente ao cloranfenicol (10µg – SENSIFAR) e como controle negativo foi utilizado disco de papel de filtro impregnado com 10µL do solvente DMSO.

3.4.2.2 Difusão em poço

Para determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Z. tingoassuiba* a técnica utilizada foi a de difusão em poço, segundo Araújo (2003).

Em uma placa de Petri estéril de 90 mm de diâmetro, foram distribuídos aproximadamente 8 mL de ágar bacteriológico (ACUMEDIA) a 1% (Figura 10A), obtendo uma fina camada de ágar na base da placa. Em seguida, 1 mL de suspensão bacteriana (item 3.4.2.1.b) foi homogeneizada a 13 mL de AMH fundido a 45°C e então dispersos sobre a placa contendo a fina camada de agar solidificado, contendo ponteiras estéreis de 100µL voltadas com suas pontas para cima (Figura 10B). Após solidificação, as ponteiras foram removidas e os poços de 6 mm de diâmetro foram formados (Figura 10C). A atividade antibacteriana foi testada adicionando 30µL do óleo no poço e o experimento realizado em triplicata. O controle de qualidade e reprodutibilidade foi realizado utilizando a cepa padrão ATCC *Staphylococcus aureus* 25923 frente a 30µL de solução etanólica de cloranfenicol (1µg/µL) e controle negativo com 30µL de etanol. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas e, após o período de incubação, os halos de inibição de crescimento bacteriano ao redor dos poços foram medidos em mm de diâmetro e atividade antibacteriana foi considerada positiva quando o halo foi igual ou superior a 9 mm.

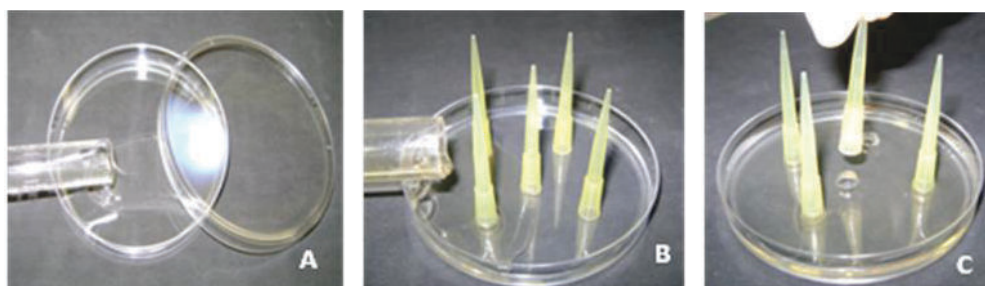


Figura 10 – Esquema da Metodologia da difusão em poço. (A) Distribuição do ágar bacteriológico a 1% sob a superfície da placa de Petri; (B) Distribuição do “pour plate” feito com o meio de cultura e a suspensão bacteriana, com ponteiras estéreis com as pontas voltadas para cima; (C) Remoção das ponteiras e formação dos poços.

3.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

3.4.3.1 Microdiluição em caldo

A CIM foi determinada, de acordo com o descrito no protocolo M07- A08 (CLSI, 2009), para avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados frente à ciprofloxacina e à norfloxacina e, de acordo com adaptação do mesmo protocolo, para determinar a CIM do brometo de etídio e dos metabólitos naturais quando os mesmos apresentaram atividade antibacteriana positiva nas técnicas de difusão. Como controle dos experimentos, foi utilizado cloranfenicol (SIGMA) frente a cepa padrão ATCC do *S. aureus* 25923.

a) Preparo de soluções

De Metabólitos:

Os extratos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 800 mg/mL, a qual foi diluída a 1:10 em solução de DMSO:CMH (1:10), com consecutiva diluição a 1:10 em CMH chegando a concentração de 8 mg/mL (solução teste), para atingir a concentração final dos extratos nos poços da placa teste na faixa de 4 a 0,03 µg/mL.

Para o óleo essencial, foi feita uma mistura de óleo, Tween (SYNTH) e CMH na proporção de 8, 17 e 75%, respectivamente, para atingir a concentração final nos poços da placa teste na faixa de 4 a 0,03%.

Antibióticos - Os antibióticos utilizados nos testes foram inicialmente diluídos para a obtenção de soluções na concentração de 5120µg/mL. Para isso, o cloranfenicol foi solubilizado em etanol a 95%, ciprofloxacina em água e norfloxacina em metade do volume de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L e posteriormente na outra metade do volume de água. Essa concentração foi então diluída 1:10 em água, para todos os antibióticos, chegando a concentração de 512 µg/mL e posteriormente 1:4 em água obtendo-se a solução de concentração de 128µg/mL, para atingir a concentração final nos poços da placa teste na faixa de 64 a 0,5 µg/mL

Brometo de Etídio- 10 µL da solução estoque de brometo de etídio na concentração de 10mg/mL foram diluídos em água resultando em uma solução de concentração 128µg/mL, para atingir a concentração final nos poços da placa teste na faixa de 64 a 0,5µg/mL.

b) Preparo da suspensão bacteriana

A suspensão bacteriana foi preparada de acordo com o item 3.4.2.1.b e, em seguida, duas diluições consecutivas de 1:10 foram realizadas em CMH de forma a atingir uma concentração celular de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL.

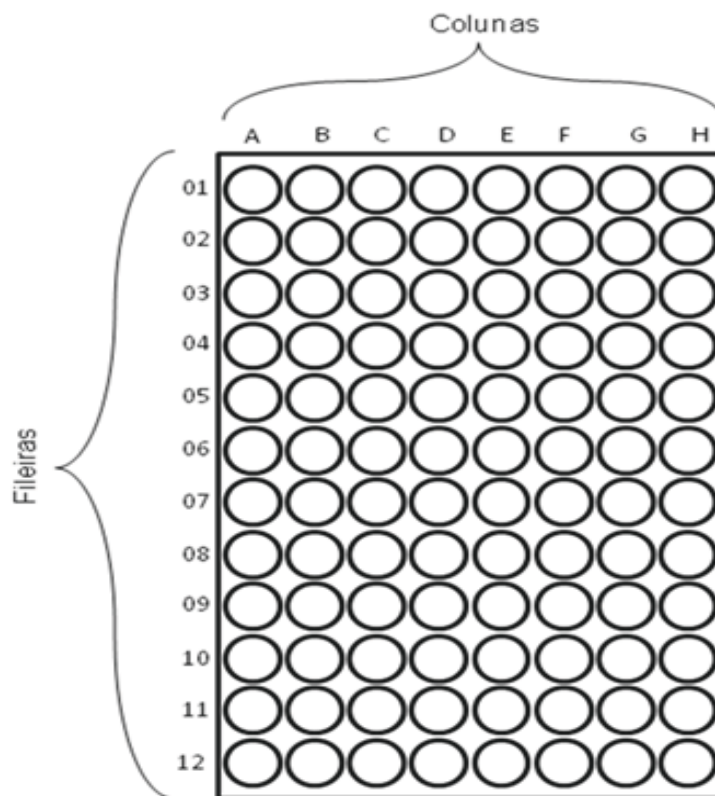
c) Técnica

O desenvolvimento do experimento foi realizado em placa de micro diluição de 96 poços com fundo em formato de “U”, invertida verticalmente (Esquema 01).

Assepticamente e com auxílio de uma pipeta automática multicanal, foram distribuídos 50µL de CMH nos poços da coluna B até a coluna H e, em seguida, 50µL da solução de cada metabólito (solução teste) ou solução de antibiótico ou de Brometo de Etídio foram colocados no primeiro e segundo poços de duas fileiras consecutivas para realização do experimento em duplicata (fileiras 01 e 02, metabólito 01; fileiras 03 e 04, metabólito 02; e assim sucessivamente até ao final da placa). Após homogeneização dos produtos nos poços da coluna B, foi feita diluição 1:2 transferindo 50µL da mistura para os poços da coluna C. Em seguida, diluições seriadas e sucessivas foram feitas transferindo sempre 50µL da mistura dos poços de uma coluna para a seguinte até os poços da coluna H, desprezando os 50µL restantes desses últimos poços. Em todos os poços foram adicionados 50 µL da suspensão bacteriana e, então, as placas foram incubadas a 35°C por 18-24 horas. Após o período de incubação, 15µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC - NUCLEAR) a 0,5% foram adicionados a todos os poços da placa e a presença de crescimento bacteriano visível foi observada através de coloração vermelha. A CIM foi definida como a menor concentração do metabólito em que se observou 100% de inibição do crescimento bacteriano.

d) Controle do experimento

Como controles do experimento foram procedidos controles de esterilidade do CMH (100µL do meio de cultura em um poço vazio) e dos extratos (50µL da solução teste dos extratos com 50µL do CMH); controles do crescimento bacteriano no caldo (50µL da suspensão bacteriana com 50µL do CMH) e nos diluentes dos metabólitos (10µL de Tween e 10µL DMSO com 40µL do CMH e 50 µL da suspensão bacteriana) e, por fim, controle de atividade antibacteriana feito com cloranfenicol frente a cepa ATCC do *S. aureus* 25923 .



Esquema 01 – Placa de micro diluição de 96 poços.

3.4.3.2 Macrodiluição em Agar

A CIM foi determinada de acordo com o descrito no protocolo M07- A08 (CLSI, 2009), adaptado para produtos naturais quando os mesmos apresentaram atividade antibacteriana nas técnicas de difusão em disco, porém apresentaram dificuldade de dissolução no CMH.

a) Preparo de soluções dos metabólitos

Os extratos foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 18mg/mL, em seguida diluições seriadas 1:2 em DMSO foram realizadas chegando a faixa concentração de 18 a 1,41mg/mL (soluções teste), para atingir a concentração final dos extratos nas placas na faixa de 3,91 a 1,96mg/mL.

b) Preparo de suspensão bacteriana

Suspensões das bactérias, feitas como descrito no item 3.4.2.1.b, foram diluídas de 1:10 em CMH, chegando a uma concentração celular de 1×10^7 UFC/mL.

c) Técnica

Assepticamente, 100µL de cada diluição do extrato foram associados a 4,5mL de AMH fundidos a 45°C e, após homogeneização, a mistura foi transferida para placas de Petri, com 60 mm de diâmetro, permitindo a formação de uma camada de ágar de aproximadamente 4 mm de espessura. Após solidificação, foram depositados 2µL da suspensão bacteriana sob a superfície do meio e as placas permaneceram a temperatura ambiente até que o inóculo fosse totalmente absorvido pelo agar, sem exceder 30 min. Em seguida, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 16 a 20 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do metabólito nas placas em que se observou inibição do crescimento bacteriano no local da inoculação, sem formação de colônia na superfície do meio de cultura. O experimento foi realizado em duplicata para cada diluição testada.

d) Controle do experimento

Como controles do experimento foram procedidos: controle do crescimento bacteriano inoculando 2µL da suspensão bacteriana em placas contendo apenas o meio de cultura; controle de diluente dos extratos, associando 100µL DMSO a 4,5mL de AMH, pois essa concentração de DMSO não deve interferir no crescimento bacteriano, e o controle da atividade antibacteriana feito com cloranfenicol frente a cepa ATCC do *S. aureus* 25923, nas concentrações estabelecidas pelo CLSI, na faixa de concentração de 64 a 0,5µg/mL.

3.4.4 Determinação do perfil de susceptibilidade antifúngica

3.4.4.1 Difusão em disco

O perfil de susceptibilidade antifúngica foi determinado de acordo com o descrito no protocolo M44- A2 (CLSI, 2009), adaptado para produtos naturais

a) Discos

Comercial - foi utilizado disco do antifúngico fluconazol (25µg - CECOM)

De produtos naturais – discos de papel foram preparados de acordo com o item 3.4.2.1.a. com extrato e frações provenientes da folha e inflorescência de *D. vandellianum*.

b) Preparo de inóculo fúngico

Colônias de morfologias semelhantes, de um crescimento de 24 horas para *Candida* e de 48 horas para *Cryptococcus* em ASD a 35°C, foram suspensas em solução salina estéril, e a turvação foi ajustada a escala padrão de turbidez 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) e em seguida, com auxílio de swab estéril, a suspensão foi semeada na superfície de AMH acrescido de 0,5 µg/mL de azul de metileno e 2,0% de glicose, com espessura de quatro mm, em três direções.

c) Aplicação de discos

Após seco o inóculo, os discos foram assepticamente distribuídos nas placas as quais foram incubadas a 35°C por 24 ou 48 horas. Após o período de incubação, os halos de inibição de crescimento fúngico ao redor dos discos foram medidos em mm de diâmetro e os resultados interpretados: para os discos comerciais de acordo com critérios sugeridos pelo protocolo do CLSI e para os discos preparados com metabólitos foi considerado com atividade antifúngica positiva o extrato ou fração que apresentou formação de halo de inibição de crescimento microbiano igual ou superior a nove mm de diâmetro.

d) Controle de experimento

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e para controle de qualidade e reprodutibilidade foi utilizado o fluconazol frente a cepa padrão ATCC de *C. parapsilosis* 22019 e como controle negativo foi utilizado discos de papel de filtro impregnados com 10µL do solvente DMSO.

3.4.5 Avaliação da interferência dos metabólitos na atividade antimicrobiana

3.4.5.1 Através da difusão em disco

A interferência dos extratos de *Z. tingoassuiba* e de *D. vandelianum* na atividade antibacteriana foi avaliada como descrito no item 3.4.2.1. associando 10µL da solução do extrato (300µg/µL) aos discos de ciprofloxacina e norfloxacina; enquanto a interferência dos extratos e frações de *D. vandelianum* na atividade

antifúngica foi avaliada como descrito no item 3.4.4.1. associando 10µL da solução do extrato (300µg/µL) ao disco do antifúngico fluconazol.

Halos de inibição de crescimento microbiano ao redor dos discos foram medidos em mm de diâmetro e a análise da interferência dos extratos foi feita comparando os resultados dos halos dos discos dos antimicrobianos com e sem associação com os metabólitos.

3.4.5.2 Através da técnica de microdiluição em caldo

A avaliação da interferência do óleo essencial de *Z.tingoassuiba* na atividade antibacteriana foi avaliada como descrito no item 3.4.3.1. associando o metabólito em concentrações sub inibitórias (1/2CIM, 1/4CIM) aos antibióticos ciprofloxacina e norfloxacina.

O experimento foi realizado em placa de microdiluição de 96 poços com fundo em formato de “U”, invertida verticalmente (Esquema 01). Assepticamente, com auxílio de uma pipeta multicanal, foram distribuídos 25µL de CMH nos poços da coluna B até a coluna H e, em seguida, 25µL da solução do antibiótico (3.4.3.1.a) foram colocados no primeiro e segundo poços de todas as fileiras. Após homogeneização do antibiótico nos poços da coluna B, foi feita diluição 1:2 transferindo 25µL da mistura para os poços da coluna C. Em seguida, diluições seriadas e sucessivas foram feitas transferindo sempre 25µL da mistura dos poços de uma coluna para a seguinte até os poços da coluna H, desprezando os 25µL restantes desses últimos poços. Em todos os poços de duas fileiras consecutivas, para caracterizar duplicata do experimento, foram adicionados 25µL da solução do óleo essencial em concentrações inibitórias mínima (CIM) e sub inibitórias (1/2CIM, 1/4CIM) determinadas anteriormente como descrito no item 3.4.3.1. Em todos os poços foram adicionados 50µL da suspensão bacteriana produzida como descrito no item 3.4.2.1.b e, então, as placas foram incubadas a 35°C por 18-24 horas. Após o período de incubação, 15µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC - NUCLEAR) a 0,5% foram adicionados a todos os poços da placa e a presença de crescimento bacteriano visível foi observada através de coloração vermelha.

A interferência do metabólito foi determinada após comparação dos valores de CIM das fluoroquinolonas com e sem adição dos metabólitos naturais e os controles do experimento foram os mesmos descrito no item 3.4.3.1.d.

3.4.6 Indução de resistência à fluoroquinolonas em cepas de *S.aureus*

A indução da resistência à fluoroquinolonas foi realizada com adaptações da técnica descrita por Kaatz e Seo (1995) em isolados de *S. aureus* sensíveis à fluoroquinolonas. Placas de AMH contendo ciprofloxacina em concentrações duas, três e quatro vezes maiores que o valor da CIM, determinadas como descrita no item 3.4.3.1, foram produzidas e 500µL de suspensão bacteriana, ajustada a escala padrão de turbidez 4,0 McFarland (12×10^8 UFC/mL) foi assepticamente distribuída sob a superfície das mesmas, com o auxílio da alça de Drigalsk, e, em seguida, incubadas a 35°C por 48h. No caso de observação de crescimento bacteriano, o procedimento foi repetido em AMH contendo concentrações maiores de ciprofloxacina, até obtenção de cepas resistentes com CIM maior ou igual a 4µg/mL (faixa de resistência adotada pelo CLSI), as quais foram expostas ao crescimento em AMH acrescido com brometo de etídio na concentração 2,5 vezes maior que o valor da CIM.

3.4.7 Análise estatística

Os experimentos de difusão em disco e em poço foram realizados em triplicata, desses resultados a média e o desvio padrão foram calculados. Foram aceitos apenas os valores de desvio padrão de zero ou próximos a zero. Nessas situações as medidas de halo de inibição da triplicata eram iguais ou variaram muito pouco. Caso contrário o experimento foi repetido.

4.0 Resultados

4.1 Resultados fitoquímicos

4.1.1 Extração de metabólitos de *Z. tingoassuiba*

Após extração dos metabólitos naturais da espécie *Z. tingoassuiba*, foram calculados os rendimentos de todos os extratos com base nos valores de massas das diferentes partes (aéreas e subterrâneas) da planta e das massas resultantes dos processos de extração. Os resultados são apresentados no Quadro 02 que mostra melhores rendimentos para os extratos provenientes da casca de raiz, sendo o extrato metanólico (Z8) o de maior rendimento, 34%.

O extrato acetato de etila (Z3), resultante da rota-evaporação da fase orgânica do processo de partição do decocto da hidrodestilação, foi o extrato de menor rendimento, 0,4%.

Material vegetal	Extrato	Massa Total (g)	Rendimento
Folha* 1311,0g	Metanólico 1	55,0	4,2%
	Aquoso	109,0	8,3%
	Acetato de Etila	5,2	0,4%
Folha• 716,7g	Metanólico 2	47,3	6,6%
	Hexânico	10,4	1,4%
Caule 931,7g	Hexânico	7,5	0,8%
	Metanólico	53,8	5,8%
Casca de Raiz 217,7g	Metanólico	73,9	34,0%
	Diclorometânico	18,1	8,3%

* Folhas que passaram primeiramente por processo de hidrodestilação para a extração do óleo essencial, •Folhas frescas

Quadro 02- Rendimento dos extratos de *Z. tingoassuiba* baseados nos valores de massa

4.1.2 Fracionamento de extratos de *D. vandellianum*

Testes microbiológicos preliminares guiaram a escolha dos extratos a serem fracionados. Foram escolhidos os extratos metanólicos das folhas e das inflorescências da *D. vandellianum*. Os resultados de massa total das frações obtidas no processo de fracionamento e seus rendimentos são apresentados nos Quadros 03 e 04.

Extrato	Solvente Extrator	Massa	Rendimento
Metanólico das folhas 106 g	CH ₂ Cl ₂	0,32g	0,3%
	CHCl ₃ : MeOH 95:5	0,87g	0,8%
	Acetona	35,43g	33,4%
	MeOH	43,79g	41,3%

Quadro 03 - Rendimento das frações do extrato metanólico das folhas de *D. vandellianum*

Extrato	Solvente Extrator	Massa (g)	Rendimento
Metanólico da inflorescência 63 g	CHCl ₃	5,74	9,1%
	AcO ϵ t	11,20	17,8%
	ButOH	8,22	13,0%

Quadro 04 - Rendimento das frações do extrato metanólico da inflorescência de *D. vandellianum*

A fração de maior rendimento do extrato metanólico das folhas foi a fração mais polar, a metanólica com 41,3% de rendimento, já a de menor rendimento foi a mais apolar extraída com o diclorometano tendo o rendimento de 0,3%.

No fracionamento extrato metanólico da inflorescência a fração com maior rendimento foi a acetato de etila enquanto a de menor rendimento foi a cloroformica.

4.2 Ensaios microbianos

4.2.1 Seleção de cepas para o estudo

A determinação do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos hospitalares e cepas ATCCs foi feita com o objetivo de selecionar *S.aureus* resistentes aos antimicrobianos utilizados na clínica. Dos oito isolados clínicos, seis (01 a 06) foram selecionados para os testes de atividade e sinergismo com os metabólitos naturais por apresentarem resistência a todas as classes de antibióticos testados e destes, apenas três (1, 2 e 3) apresentaram sensibilidade a levofloxacina e dois (1 e 2) a ofloxacina, porém todos foram resistentes a ciprofloxacina, o que descaracteriza sensibilidade as fluoroquinolonas (Quadro 05).

Antibióticos	<i>Staphylococcus aureus</i>										
	ATCC			Isolados Clínicos							
	25923	33591	43300	01	02	03	04	05	06	07	08
Amoxicilina	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilina	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Oxacilina	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Clindamicina	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Eritromicina	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Ciprofloxacina	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S
Levofloxacina	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
Ofloxacina	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S

(R) cepas resistente; (S) cepas sensível

Quadro 05 - Perfil de susceptibilidade das cepas de *S.aureus*

Os isolados clínicos 07 e 08 e as cepas ATCC 33591 e 43300 apresentaram sensibilidade frente a ciprofloxacina, levofloxacina e ofloxacina e foram selecionados para a realização do experimento de indução de resistência às fluoroquinolonas. Após a indução, indivíduos selecionados foram nomeados como cepas induzidas 07, 08, 09 e 10, as quais foram provenientes das cepas ATCC 33591, ATCC 43300,

isolado clínico 07 e isolado clínico 08, respectivamente. A Tabela 01 apresenta o perfil de susceptibilidade com as CIM das cepas de *S. aureus* antes e após a indução de resistência, frente à ciprofloxacina e norfloxacina, caracterizando mudança do perfil de sensível para resistente nas quatro cepas testadas frente a ambos antibióticos. Essa alteração foi caracterizada pelo aumento da CIM de no mínimo 16 vezes quando a ciprofloxacina foi testada e de no mínimo duas vezes para a norfloxacina. De acordo com o CLSI, isolados são resistente a ciprofloxacina quando o valor da CIM é superior ou igual a 4µg/mL e para a norfloxacina quando superior ou igual a 16µg/mL. Essas cepas induzidas foram também selecionadas para os testes de atividade e sinergismo com os metabólitos naturais.

Tabela 01 - Perfil de susceptibilidade de *S. aureus* antes e após indução de resistência frente a fluoroquinolonas

<i>S. aureus</i> induzidos	Ciprofloxacina				Norfloxacina			
	Antes		Depois		Antes		Depois	
	CIM (µg/mL)	Perfil	CIM (µg/mL)	Perfil	CIM (µg/mL)	Perfil	CIM (µg/mL)	Perfil
07	1	S	32	R	4	S	64	R
08	<0,5	S	16	R	<0,5	S	64	R
09	<0,5	S	8	R	4	S	64	R
10	<0,5	S	8	R	16	S	32	R

(R) cepas resistente; (S) cepas sensível

4.2.2 Atividade antibacteriana dos metabólitos naturais

4.2.2.1 Difusão em disco e em poço

O controle negativo não apresentou atividade antibacteriana mostrando que o diluente dos extratos (DMSO) não interferiu na atividade dos metabólitos testados; enquanto o controle positivo do experimento realizado com a cepa padrão ATCC *S. aureus* 25923 frente ao cloranfenicol apresentou um halo de inibição de crescimento dentro da zona preconizada pelo CLSI que é de 19 a 26 mm de diâmetro.

Os valores de desvio padrão que medem a variabilidade dos dados mostraram significância estatística já que a maioria dos valores foram zero (os halos

da triplicata foram iguais) ou 0,58 (um valor variou em 1mm dos outros dois valores de halos da triplicata).

Zanthoxylum tingoassuiba

Com relação aos metabólitos extraídos das folhas da planta, os extratos metanólicos e o hexânico não apresentaram atividade antibacteriana frente as cepas de *S.aureus* testadas (Figura 11). A Tabela 02 mostra que tanto o óleo essencial (Figura 12) quanto o extrato de acetato de etila revelaram atividade antibacteriana frente a todas as cepas testadas, sendo que o óleo apresentou halos de inibição de crescimento bacteriano com diâmetros maiores, variando de 12,3 a 20,0mm, em comparação aos halos apresentados para a atividade do extrato de acetato de etila, que variaram de 9,0 a 15,3mm. A Tabela 02 ainda mostra que dois isolados clínicos e a cepa ATCC não foram susceptíveis ao extrato aquoso e que a variação dos halos de inibição dos demais isolados foi da ordem de 10,3 a 19,0mm.

Tabela 02 - Média dos halos de inibição de crescimento bacteriano dos metabólitos das folhas de *Z. tingoassuiba*, em milímetros de diâmetros.

<i>S. aureus</i>	Óleo essencial		Extrato Acetato de Etila		Extrato aquoso	
	x	σ	X	σ	x	σ
ATCC25923	13,0	0	10,3	0,58	-	0
Isolado 01	14,0	0	14,3	0,58	10,3	0,58
Isolado 02	13,0	0	13,3	0,58	-	0
Isolado 03	18,0	0	9,0	0	10,3	0,58
Isolado 04	20,0	0	12,0	0	10,3	0,58
Isolado 05	12,7	0,58	11,3	0,58	-	0
Isolado 06	15,0	0	12,0	0	15,3	0,58
Induzida 07	12,3	0,58	15,3	0,58	17,7	1,15
Induzida 08	17,0	0	15,3	0,58	19,0	0
Induzida 09	19,0	0	9,0	0	13,3	0,58
Induzida 10	17,7	0,58	12,7	0,58	17,3	0,58

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos; (-) sem atividade antibacteriana



Figura 11 - Atividade antibacteriana de extratos de *Z. tingoassuiba*, através do teste de difusão em disco frente ao isolado clínico de *S.aureus*. Ausência de halo de inibição de crescimento bacteriano para os extratos (1) metanólico e (2) hexânico; presença de halo de inibição de crescimento bacteriano para o extrato (3) acetato de etila, em média de 13mm; (C+) controle positivo com disco de cloranfenicol (10µg), com halo de inibição de crescimento bacteriano de 26mm; (C-) controle negativo do experimento com 10 µl de dimetilsulfóxido.

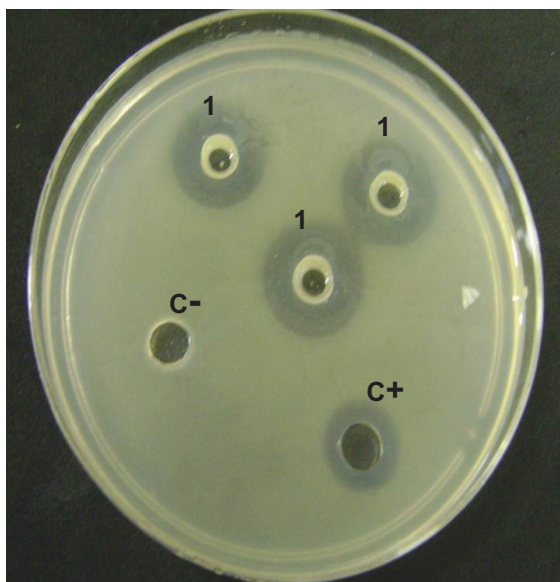


Figura 12 - Atividade antibacteriana do óleo de *Z. tingoassuiba*, através do teste de difusão em poço frente à cepa de *S.aureus* induzida 07. Presença de halo de inibição de crescimento bacteriano para o óleo essencial (1), em média de 12,3mm; (C+) controle positivo com 30µL de cloranfenicol (1µg/µL), com halo de inibição de crescimento bacteriano de 9 mm ; (C-) controle negativo do experimento com 30 µl de etanol.

Como pode ser observado na Tabela 03, dos metabólitos obtidos da casca da raiz, os extratos diclorometânico e o metanólico apresentaram atividade antibacteriana frente a todas as cepas testadas, sendo a faixa de tamanho de halo de inibição de crescimento bacteriano do diclorometânico de 11,0 a 20,3mm e a do metanólico de 15,0 a 23,3mm. No entanto, quando metabólitos do caule da planta foram analisados o extrato metanólico mostrou atividade apenas frente a dois isolados clínicos e a duas cepas induzidas, sendo a menor média de halo de 9,3mm e a maior de 15,7mm, enquanto o hexânico não apresentou nenhuma atividade antibacteriana.

Tabela 03 - Média dos halos de inibição de crescimento bacteriano dos metabólitos da casca da raiz e do caule de *Z. tingoassuiba*, em milímetros de diâmetros.

<i>S. aureus</i>	Diclorometânico da casca de raiz		Metanólico da casca da raiz		Metanólico do caule	
	x	σ	x	σ	x	σ
ATCC 25923	20,3	0,58	21,0	0	-	0
Isolado 01	15,3	0,58	19,7	0,58	-	0
Isolado 02	18,3	0,58	19,7	0,58	-	0
Isolado 03	19,7	0,58	23,3	0,58	-	0
Isolado 04	14,0	0	19,0	0	9,3	0,58
Isolado 05	13,3	0,58	22,0	0	-	0
Isolado 06	14,7	0,58	15,0	0	10,7	1,15
Induzida 07	12,0	0	20,0	0	13,3	0,58
Induzida 08	11,7	0,58	17,3	0,58	15,7	0,58
Induzida 09	15,7	0,58	20,0	0	-	0
Induzida 10	11,0	0	16,7	0,58	-	0

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos; (-) sem atividade antibacteriana

Dictyoloma vandellianum

Três metabólitos dessa planta não apresentaram atividade antibacteriana frente às cepas de *S. aureus* testadas: o extrato metanólico da raiz, o hexânico do caule e o diclorometânico das folhas. A Tabela 04 traz os resultados de atividade positiva para metabólitos de *D. vandellianum* frente a todas as cepas testadas, onde é possível observar a faixa de 13,0 a 23,0 mm de diâmetro de halo de inibição de crescimento bacteriano para o extrato metanólico do caule; uma variação de 14,3 a 22,7 mm para o extrato metanólico da inflorescência e de 12,0 a 22,7 mm para o extrato metanólico de folha.

Tabela 04 - Média dos halos de inibição de crescimento bacteriano dos metabólitos de *D. vandellianum*, em milímetros de diâmetros.

<i>S. aureus</i>	Metanólico do caule		Metanólico da inflorescência		Metanólico das folhas	
	x	σ	x	σ	x	σ
ATCC 25923	13,0	0	15,7	0,58	17,0	0
Isolado 01	13,0	0	16,3	0,58	18,3	0,58
Isolado 02	13,0	0	16,0	0	17,7	0,58
Isolado 03	15,0	0	19,0	0	21,7	0,58
Isolado 04	13,0	0	19,7	0,58	12,0	0
Isolado 05	13,7	0,58	14,3	0,58	15,7	0,58
Isolado 06	23,0	0	20,7	0,58	22,7	0,58
Induzida 07	19,3	0,58	22,3	0,58	17,7	0,58
Induzida 08	21,7	1,15	22,7	0,58	18,3	0,58
Induzida 09	16,0	0	19,7	0,58	17,3	0,58
Induzida 10	17,3	0,58	15,7	0,58	15,0	0

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos

4.2.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIM foram determinadas para os metabólitos que apresentaram atividade antibacteriana positiva através das técnicas de difusão. Nos controles de esterilidade do meio de cultura e dos extratos não foi observado nenhum crescimento bacteriano, enquanto que no controle do crescimento bacteriano e no controle dos diluentes dos metabólitos (Tween e DMSO) foi observado crescimento total da bactéria, mostrando que as cepas estavam viáveis para a realização dos testes e que os diluentes não interferiram na atividade dos metabólitos testados. O controle de atividade antibacteriana feito com a cepa padrão ATCC *S. aureus* 25923 frente ao cloranfenicol apresentou CIM dentro da faixa de leitura estabelecidas pelo CLSI , de 8 a 32µg/mL.

Não são apresentados os valores dos desvios padrões, pois o experimento foi realizado em duplicata e a CIM determinada apenas quando os valores de CIM das duas duplicatas foram iguais, caso contrário o experimento foi repetido.

Zanthoxylum tingoassuiba

Os valores das CIMs mostram que os extratos que apresentaram melhor atividade frente às cepas testadas foram os extraídos da casca da raiz, o diclorometânico apresentando CIM que variaram de 0,06 a 0,24mg/mL e o acetato de etila um valor de CIM de 0,98mg/mL para nove das onze cepas testadas. Os isolados 03 e 06 apresentaram menores valores de CIM com os extratos que foram produzidos com solventes apolares como os diclorometânico da casca de raiz e acetato de etila das folhas. Os valores de CIM do óleo essencial variaram de 0,06 a 0,50%, sendo o isolado 02 o mais susceptível a esse metabólito por apresentar o menor valor de CIM (Tabela 05).

O extrato metanólico do caule e o aquoso das folhas apresentam valores de CIM maiores que a maior concentração testada que foi de 4mg/mL para todas as cepas testadas (dados não tabelados) (Figura 13).

Tabela 05 - Concentração inibitória mínima (CIM) de metabólitos de *Z. tingoassuiba*

<i>S. aureus</i>	Extrato metanólico da casca da raiz	Extrato diclorometânico da casca de raiz	Extrato acetato de etila das folhas	Óleo essencial
	mg/mL			%
ATCC 25923	0,13	0,06	0,98	0,13
Isolado 01	0,25	0,12	0,98	0,25
Isolado 02	0,25	0,12	0,98	0,06
Isolado 03	0,25	0,06	0,49	0,50
Isolado 04	0,5	0,12	0,98	0,13
Isolado 05	0,25	0,24	0,98	0,13
Isolado 06	0,5	0,06	0,24	0,50
Induzida 07	0,25	0,24	0,98	0,25
Induzida 08	0,5	0,24	0,98	0,25
Induzida 09	0,50	0,24	0,98	0,13
Induzida 10	0,50	0,12	0,98	0,25

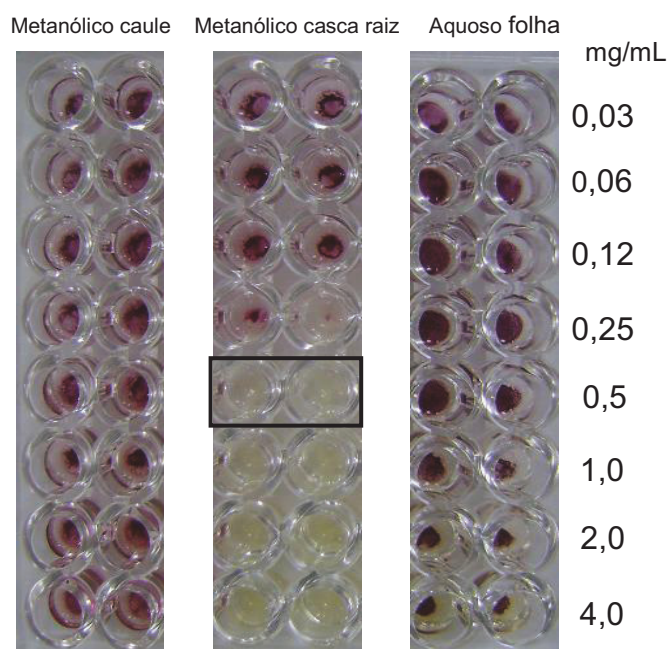


Figura 13 - Concentração Inibitória Mínima de extratos de *Z. tingoassuiba*, através da técnica da micro diluição para *S. aureus* cepa induzida 08. Extrato metanólico do caule e aquoso das folhas apresentando CIM >4mg/mL e o extrato metanólico da casca da raiz com CIM de 0,5mg/mL.

D. vandellianum

Os valores de CIM, apresentados na Tabela 06, são semelhantes para os extratos testados e variam de 1 a 2mg/mL. O extrato metanólico do caule apresentou CIM de 2mg/mL para todas as cepas testadas e o metanólico da inflorescência CIM iguais ou inferiores as apresentadas pelo extrato metanólico das folhas para cada cepa testada (Figura 14).

Tabela 06 - Concentração inibitória mínima (CIM) de metabólitos de extratos da *D.vandelianum*, em mg/mL.

<i>S. aureus</i>	Metanólico do caule	Metanólico das folhas	Metanólico da inflorescência
ATCC 25923	2,00	2,00	2,00
Isolado 01	2,00	1,00	1,00
Isolado 02	2,00	2,00	2,00
Isolado 03	2,00	1,00	1,00
Isolado 04	2,00	2,00	1,00
Isolado 05	2,00	2,00	1,00
Isolado 06	2,00	1,00	1,00
Induzida 07	2,00	2,00	1,00
Induzida 08	2,00	2,00	1,00
Induzida 09	2,00	2,00	2,00
Induzida 10	2,00	2,00	2,00

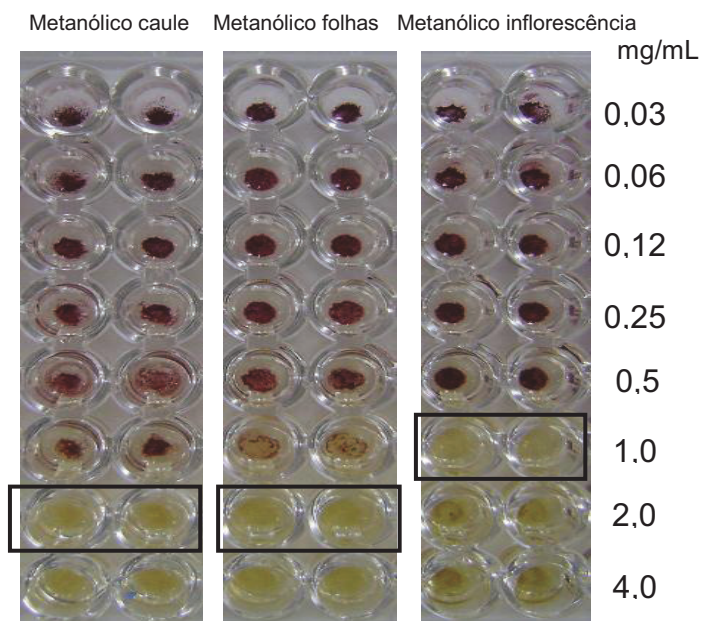


Figura 14 - Concentração Inibitória Mínima de extratos de *D. vandellianum*, através da técnica da micro diluição para *S. aureus* cepa induzida 08. Extratos metanólicos do caule e das folhas apresentando CIM de 2mg/mL e o extrato metanólico da inflorescência com CIM de 1mg/mL.

4.2.3 Interferência de metabólitos naturais na atividade de fluoroquinolonas *S.aureus*

4.2.3.1 Do óleo essencial de *Z. tingoassuiba*

As Tabelas 07 e 08 mostram que a associação do óleo essencial em concentrações subinibitórias ($\frac{1}{2}$ e $\frac{1}{4}$ da CIM apresentada na Tabela 05) com as fluoroquinolonas produziu efeito que diminuiu os valores de CIM dos antibióticos em no mínimo duas vezes em todas as cepas testadas.

Na Tabela 07 é possível observar que a associação do óleo com a ciprofloxacina foi mais eficiente quando $\frac{1}{2}$ da CIM do óleo foi testada em comparação com $\frac{1}{4}$ da CIM que somente diminui o valor de CIM de quatro cepas em apenas duas vezes e seis cepas não apresentaram diminuição de valor. Com $\frac{1}{2}$ da CIM, todas as cepas testadas apresentaram diminuição no valor de CIM após associação em pelo menos duas vezes (Figura 15), havendo alteração de perfil do isolado 03 e das cepas induzidas 08 e 10, de resistente para sensível.

Tabela 07 - Efeito da associação do óleo essencial de *Z. tingoassuiba* a ciprofloxacina na atividade antibacteriana, em mg/mL.

<i>S. aureus</i>	*	perfil	+ ½ CIM _o	perfil	+ ¼ CIM _o	perfil
Isolado 01	32	R	8 (4)*	R	16 (2)*	R
Isolado 02	32	R	4 (8)*	R	16 (2)*	R
Isolado 03	8	R	<1 (>8)*	S	8	R
Isolado 04	64	R	32 (2)*	R	64	R
Isolado 05	32	R	16 (2)*	R	32	R
Isolado 06	64	R	16 (4)*	R	64	R
Induzida 07	32	R	4 (8)*	R	16 (2)*	R
Induzida 08	16	R	2 (8)*	S	8 (2)*	R
Induzida 09	8	R	4 (2)*	R	8	R
Induzida 10	8	R	2 (4)*	S	8	R

(*) CIM sem associação; (+) CIM com associação; (CIM_o) concentração inibitória mínima do óleo essencial da Tabela 05; (*) número de vezes de diminuição da CIM após associação. (S) cepa sensível; (R) cepa resistente.

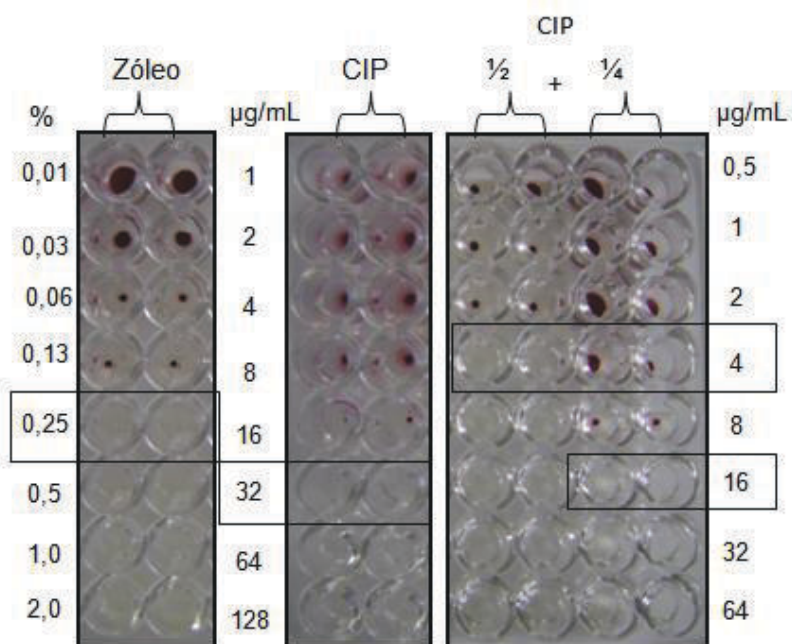


Figura 15 – Efeito da associação do óleo essencial de *Z. tingoassuiba* (Zóleo) e ciprofloxacina (CIP) na atividade antibacteriana. CIM de 0,25% para o ZTO; CIM de 32µg/mL para CIP; CIM de 4µg/mL e 16µg/mL para CIP+ ½ e ¼ da CIM do óleo, respectivamente. *S. aureus* induzido 07.

A associação do óleo com a norfloxacin (Tabela 08), de maneira semelhante da associação com a ciprofloxacina, foi mais eficiente quando $\frac{1}{2}$ da CIM do óleo foi testada em comparação com $\frac{1}{4}$ da CIM sendo capaz de apenas diminuir o valor da CIM na razão de duas vezes em nove cepas e apenas uma cepa não mostrou efeito na associação (Figura 16). A associação com $\frac{1}{2}$ da CIM foi eficiente em todas as cepas testadas chegando a interferir na razão de diminuição de 32 vezes no isolado 03 que alterou seu perfil de resistente para sensível, juntamente com o isolado 01 e as cepas induzidas 08 e 10.

Tabela 08: Efeito da associação do óleo essencial de *Z. tingoassuiba* a norfloxacin na atividade antibacteriana, em (mg/mL).

<i>S. aureus</i>	*	perfil	+ $\frac{1}{2}$ CIM _o	perfil	+ $\frac{1}{4}$ CIM _o	perfil
Isolado 01	64	R	8 (8)*	S	32 (2)*	R
Isolado 02	128	R	16 (8)*	R	64(2)*	R
Isolado 03	32	R	<1(>32)*	S	16 (2)*	R
Isolado 04	128	R	64 (2)*	R	>64	R
Isolado 05	64	R	16 (4)*	R	32 (2)*	R
Isolado 06	128	R	32 (4)*	R	64 (2)*	R
Induzida 07	64	R	16 (4)*	R	32 (2)*	R
Induzida 08	64	R	8 (8)*	S	32 (2)*	R
Induzida 09	64	R	16 (4)*	R	32 (2)*	R
Induzida 10	32	R	8 (4)*	S	16 (2)*	R

(*) CIM sem associação; (+) CIM com associação; (CIM_o) concentração inibitória mínima do óleo essencial apresentada na Tabela 05; (*) número de vezes de diminuição da CIM após associação. (S) cepa sensível; (R) cepa resistente

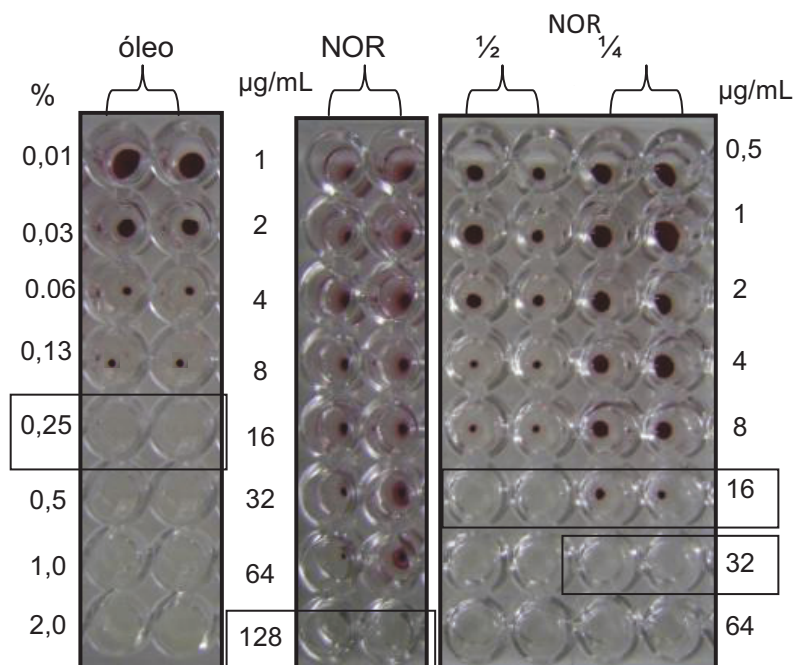


Figura 16 – Efeito da associação do óleo essencial de *Z. tingoassuiba* (Zóleo) e norfloxacina (NOR) na atividade antibacteriana, CIM de 0,25% para o ZTO; CIM de 128µg/mL para NOR; CIM de 16µg/mL e 32µg/mL para CIP+ ½ e ¼ da CIM do óleo, respectivamente. *S. aureus* induzido 07.

4.2.3.2 Dos extratos de *Z. tingoassuiba* e *D.vandellianum*

Os valores de desvio padrão que mede a variabilidade dos dados, mostraram significância estatística já que apresentaram valores próximos de zero, o que significa que os valores são iguais ou variam muito pouco.

Nas Tabelas 09 e 10 são apresentados resultados da associação dos metabólitos naturais que não apresentam atividade antibacteriana, através de técnica de difusão de disco, com os discos de fluoroquinilonas; enquanto na Tabela 11 os resultados são com um extrato que produziu atividade antibacteriana na difusão.

A associação da ciprofloxacina com os metabólitos que não apresentaram atividade antibacteriana foi pequena, porém foi possível observar aumento em alguns halos de inibição de crescimento bacteriano (Tabela 09). Todas as cepas induzidas apresentaram aumento de halo de inibição de crescimento com todos os metabólitos testados, enquanto que somente o extrato hexânico de caule de *Z. tingoassuiba* interferiu na resposta de cinco isolados clínicos dos seis testados, o extrato hexânico de folhas de *Z. tingoassuiba* na resposta de dois isolados e o

extrato de diclorometano de *D. vandellianum* apenas em um. Considerando os valores adotados pelo CLSI que preconiza para a ciprofloxacina indivíduos resistentes apresentando halo de inibição de crescimento menor ou igual a 15 mm, com resistência intermediária entre 16 e 20 mm e sensíveis maior ou igual a 21 mm, a Tabela 09 mostra que, mesmo apresentando aumento nos halos de inibição de crescimento bacteriano, a associação não foi suficiente para alterar o perfil de resistência das cepas. Apenas algumas passaram a ter sensibilidade intermediária, como o isolado 01 após associação com o extrato hexânico do caule de *Z. tingoassuiba*, isolado 03 com o extrato diclorometânico das folhas de *D. vandellianum*, a cepa induzida 07 com os extratos metanólico das folhas e hexânico do caule de *Z. tingoassuiba*, cepa induzida 08 com os extratos metanólico e hexânico das folhas e com o hexânico do caule de *Z. tingoassuiba* e a cepa induzida 10 com extrato metanólico das folhas de *Z. tingoassuiba*.

Quando os metabólitos de atividade antibacteriana negativa foram associados à norfloxacina os resultados (Tabela 10) foram semelhantes aos resultados da associação com a ciprofloxacina. Todas as cepas induzidas apresentaram aumento de halo de inibição de crescimento com todos os metabólitos testados, enquanto que somente o extrato hexânico de caule de *Z. tingoassuiba* interferiu na resposta de dois isolados clínicos (1 e 3) dos seis testados e o extrato hexânico de folhas de *Z. tingoassuiba* na resposta do isolado 3. Considerando os valores adotados pelo CLSI que preconiza para a norfloxacina indivíduos resistentes apresentando halo de inibição de crescimento menor ou igual a 12 mm, com resistência intermediária halo entre 13 e 16 mm e sensíveis indivíduos com halo maior ou igual a 17 mm, a Tabela 10 mostra que, mesmo apresentando aumento nos halos de inibição de crescimento bacteriano, a associação apresentada não foi suficiente para alterar o perfil de resistência das cepas. Apenas algumas passaram a ter sensibilidade intermediária, como a cepa induzida 07 após associação com os extratos hexânicos das folhas e do caule de *Z. tingoassuiba*, cepa induzida 08 com o extrato diclorometânico das folhas de *D. vandellianum*, cepa induzida 09 com o extrato metanólico das folhas de *Z. tingoassuiba* e a cepa induzida 10 com os extratos metanólicos e hexânicos das folhas de *Z. tingoassuiba*.

Quando a associação foi com o extrato metanólico da casca de *Z. tingoassuiba* (Tabela 11) a interferência do extrato nos halos de inibição foi notada com aumento de no mínimo 10mm em quatro dos seis, para norfloxacina, e em

todos os isolados clínicos, para a ciprofloxacina. Porém, somente dois isolados tiveram o perfil de resistência alterado para sensibilidade intermediária à norfloxacina (3 e 6) e um para a ciprofloxacina (3). Com relação às cepas induzidas, todas as cepas apresentaram aumento de halo para o teste com a ciprofloxacina com três cepas alterando o perfil de resistência para sensibilidade intermediária e apenas uma cepa com a norfloxacina sem alteração de perfil.

Os demais metabólitos extraídos das espécies em estudo também foram testados em associação com os antibióticos, porém não apresentaram interferência nos halos de inibição dos antimicrobianos.

Tabela 09: Efeito da associação de metabólitos de Rutaceae ao disco de Ciprofloxacina na atividade antibacteriana.

<i>S. aureus</i>	*		+ Metanólico das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>			+ Metanólico das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>			+ Hexânico da folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>			+ Hexânico do caule de <i>Z. tingoassuiba</i>			+ Diclorometânico das folhas de <i>D. vandellianum</i>		
	x	perfil	X	σ	Perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil	-	σ	perfil
Isolado 01	13	R	-	0	R	12,0	0	R	-	0	R	18,5	0,7	I	-	0	R
Isolado 02	-	R	-	0	R	-	0	R	11,0	0	R	10,0	0	R	-	0	R
Isolado 03	19	I	14,5	0,7	R	15,5	0,7	R	18,0	0	I	18,0	0	I	17,0	0	I
Isolado 04	-	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R
Isolado 05	-	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	12,0	0	R	-	0	R
Isolado 06	-	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	10,0	0	R	-	0	R
Induzida 07	-	R	14,5	0,7	R	17,0	0	I	15	0	R	17,5	0,7	I	10,0	0	R
Induzida 08	15	R	20,0	0	I	15,5	0,7	R	20,5	0,7	I	16,5	0,7	I	17,0	0	I
Induzida 09	-	R	10,5	0,7	R	16,0	0	R	13,5	0,7	R	14,5	0,7	R	13,0	0	R
Induzida 10	13	R	12,5	0,7	R	18,0	0	I	18,5	0,7	I	17,5	0,7	I	16,0	0	I

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos em mm de diâmetro ;(-) sem atividade antibacteriana; (+) com associação a; (*) sem associação; (R) cepa resistente; (I) cepa com sensibilidade intermediária hexânico da folhas (D5) diclorometânico das folhaa

Tabela 10: Efeito da associação de metabólitos de Rutaceae ao disco de Norfloxacin na atividade antibacteriana.

<i>S. aureus</i>	*		+ Metanólico das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>			+ Metanólico das folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>			+ Hexânico da folhas de <i>Z. tingoassuiba</i>			+ Hexânico do caule de <i>Z. tingoassuiba</i>			+Diclorometânico das folhas de <i>D. vandellianum</i>		
	x	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil
Isolado 01	-	R	-	0	R	-	0	R	12,5	0,7	R	-	0	R	-	0	R
Isolado 02	-	R	-	0	R	-	0	R	8,0	0	R	10,0	0	R	-	0	R
Isolado 03	12	R	-	0	R	-	0	R	10,0	0	R	12,0	0	R	11,0	0	R
Isolado 04	-	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R
Isolado 05	-	R	-	0	R	-	0	R	8,0	0	R	-	0	R	-	0	R
Isolado 06	-	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R	-	0	R
Induzida 07	-	R	11,5	0,7	R	12,0	0	R	14,5	0,7	I	12,0	0	R	10,5	0,7	R
Induzida 08	-	R	11,5	0,7	R	9,5	0,7	R	9,5	0,7	R	14,5	0,7	I	11,0	0	R
Induzida 09	-	R	16,0	0	I	11,5	0,7	R	9,5	0,7	R	10,0	0	R	-	0	R
Induzida 10	-	R	16,5	0,7	I	13,0	0	I	10,0	0	R	15,5	0,7	I	12,5	0,7	R

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos em mm de diâmetro ;(-) sem atividade antibacteriana; (+) com associação a; (*) sem associação; (R) cepa resistente; (I) cepa com sensibilidade intermediária

Tabela 11: Efeito da associação do extrato metanólico do caule de *Z. tingoassuiba* a fluoroquinolonas, na atividade antibacteriana.

<i>S. aureus</i>	Extrato		Norfloxacin						Ciprofloxacina					
			*			+ Extrato			*			+ Extrato		
	X	σ	x	perfil	x	σ	perfil	x	perfil	x	σ	perfil		
Isolado 01	-	0	-	R	11,5	0,71	R	13	R	15,0	0	R		
Isolado 02	-	0	-	R	-	0	R	-	R	10,5	0,71	R		
Isolado 03	-	0	12	R	15,5	0,71	I	19	I	19,5	0,71	I		
Isolado 04	9,3	0,58	-	R	-	0	R	-	R	13,0	0	R		
Isolado 05	-	0	-	R	10,5	0,71	R	-	R	10,0	0	R		
Isolado 06	10,7	0,58	-	R	13,0	0	I	-	R	13,5	0,71	R		
Induzida 07	13,3	0,58	-	R	11,5	0,71	R	-	R	16,5	0,71	I		
Induzida 08	15,7	1,15	-	R	9,5	0,71	R	15	R	16,5	0,71	I		
Induzida 09	-	0	-	R	-	0	R	-	R	12,5	0,71	R		
Induzida 10	-	0	-	R	10,5	0,71	R	13	R	16,5	0,71	I		

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos em mm de diâmetro; (-) sem atividade antibacteriana; (+) com associação a; (*) sem associação; (R) cepa resistente; (I) cepa com sensibilidade intermediária

2.4 Atividade antifúngica dos extratos e frações de *D. vandellianum*.

Os extratos metanólicos das folhas e inflorescência da *D. vandellianum* e suas respectivas frações não apresentaram atividade antifúngica já que os valores dos halos de inibição obtidos fora iguais a zero.

4.2.5 Interferência de metabólitos naturais na atividade do fluconazol frente aos isolados de *Candida* spp e *Cryptococcus* spp.

O controle positivo do experimento realizado com a cepa padrão *C.parapsilosis* ATCC 22019 frente ao fluconazol apresentou halos de inibição de crescimento, sempre que testado, dentro da zona preconizada pelo CLSI que é de 22 a 33 mm de diâmetro.

Os valores de desvio padrão mostraram significância estatística já que apresentaram valores próximos de zero o que significa que os valores variam pouco ou são iguais à média.

4.2.5.1 Extratos de *D. vandellianum*

A associação dos extratos metanólicos da inflorescência e das folhas de *D.vandellianum* com o fluconazol potencializou a ação do antifúngico frente a leveduras do gênero *Candida*, com um aumento de até 30 mm de diâmetros (Tabela 12). Considerando os valores adotados pelo CLSI, que preconiza para o fluconazol a levedura do gênero *Candida* resistente apresentando halo de inibição de crescimento menor ou igual a 14 mm, com resistência intermediária halo entre 15 e 18 mm e sensíveis os indivíduos com halo maior ou igual a 19 mm, a Tabela 12 mostra que três isolados (5, 8 e 9) resistentes ao fluconazol, bem como três com sensibilidade intermediária (1, 6 e 7), alteraram seu perfil de resistência para sensíveis após a associação com o extrato metanólico das folhas, enquanto os três (2, 3 e 4) que não alteraram o perfil tiveram seus halos de inibição de crescimento aumentados em 6, 10 e 13 mm. Para a associação com extrato metanólico da inflorescência, dos seis isolados não sensíveis ao fluconazol somente o 5 não alterou seu perfil após associação, porém apresentou um halo de 11mm, e dos três sensíveis que mantiveram seu perfil, dois (2 e 4) tiveram seus halos aumentados em

2,7 e 4,7 mm e um (3) teve seu halo diminuído em 2mm. O extrato metanólico das folhas de *D. vandellianum*, apresentou halos maiores que os observados para o extrato metanólico das inflorescências, menos para o isolado 09 de *C.tropicalis* e o crescimento residual observado freqüentemente quando utilizado o disco de fluconazol foi totalmente inibido na associação (Figura 17).

Tabela 12: Efeito da associação do extratos metanólicos de *D. vandellianum* ao fluconazol na atividade antifúngica, em milímetros de diâmetro.

Isolados	Espécies de <i>Candida</i>	*		+ Das folhas			+ Das inflorescências		
		mm	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil
1	<i>parapsilosis</i>	16	I	29,3	0,58	S	21,7	1,15	S
2		23	S	33,3	0,58	S	25,7	0,58	S
3		27	S	33,0	0	S	25,0	0	S
4	<i>albicans</i>	20	S	32,3	0,58	S	24,7	0,58	S
5		-	R	30,0	0	S	11,7	0,58	R
6		18	I	31,3	0,58	S	27,0	0	S
7	<i>tropicalis</i>	18	I	26,7	1,15	S	20,7	0,58	S
8		-	R	26,0	0	S	23,0	0	S
9		-	R	26,0	0	S	28,0	0	S

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos; (+) com associação a; (-) sem atividade antifúngica; (*) sem associação; (R) cepa resistente; (S) cepa sensível; (I) cepa com sensibilidade intermediária

A associação do extrato metanólico das folhas de *D.vandellianum* com o fluconazol não interferiu ou diminuiu os halos de inibição do antifúngico frente ao *Cryptococcus* sp. A Tabela 13 mostra que seis isolados (3 a 8) não mudaram seu perfil de susceptibilidade e dois (1 e 2) com sensibilidade intermediária passaram a ser resistentes ao fluconazol. Por não apresentar resultados positivos de sinergismo com o extrato metanólico das folhas de *D. vandellianum*, o extrato da inflorescência e as frações não foram testadas frente aos isolados de *Cryptococcus* sp.

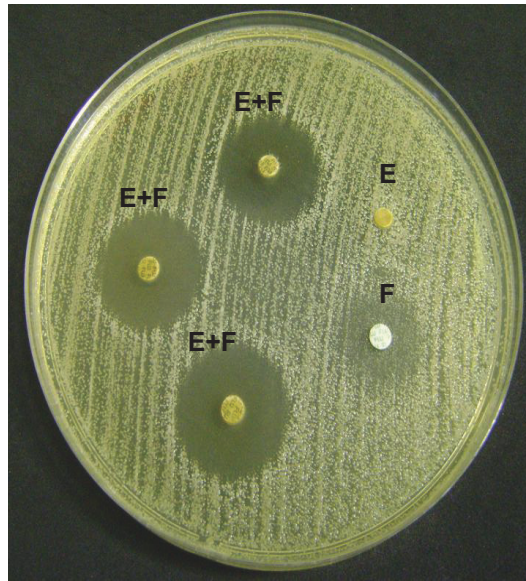


Figura 17 - Efeito da associação do extrato metanólico das folhas de *D. vandellianum* e fluconazol na atividade antifúngica. Ausência de halo de inibição de crescimento fúngico para o extrato (E); presença de crescimento residual e halo de inibição de crescimento fúngico com 16mm, para o fluconazol (F) e presença de halo de inibição de crescimento fúngico para o Fluconazol associado ao extrato (E+F), com 29 mm e ausência de crescimento residual.

Tabela 13: Efeito da associação do extratos metanólicos das folhas de *D. vandellianum* ao fluconazol na atividade antifúngica, em milímetros de diâmetro.

isolados	<i>Cryptococcus</i>	*		+ Extrato		
		mm	perfil	x	σ	perfil
1	<i>gattii</i>	17	I	11,3	0,58	R
2		15	I	0	0	R
3		0	R	0	0	R
4		14	R	11,3	0,58	R
5		0	R	0	0	R
6	<i>neoformans</i>	21	S	21,3	0,58	S
7		13	R	0	0	R
8		0	R	0	0	R

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos; (+) com associação a; (-) sem atividade antifúngica; (*) sem associação; (R) cepa resistente; (S) cepa sensível; (I) cepa com sensibilidade intermediária

4.2.1.1 Frações dos extratos metanólicos das folhas e inflorescências de *D. vandellianum*

Os quatro isolados de *Candida* sp. que apresentaram maior resistência ao fluconazol (isolado 01, 05, 08 e 09) foram selecionados para que testes de associação com frações dos extratos citados acima fossem realizados.

Todas as frações do extrato metanólico das folhas potencializaram a ação do fluconazol, aumentando os halos de inibição de crescimento fúngico e alterando o perfil de resistência (Tabela 14). Somente o isolado 08 não apresentou aumento de halo e alteração de perfil em associação com a fração diclorometânica.

Das frações do extrato metanólico da inflorescência a fração de acetato de etila foi a fração que proporcionou melhor associação com o fluconazol aumentando os halos de inibição de crescimento fúngico em todos os isolados e alterando o perfil de resistência. A fração clorofórmica também mostrou esse comportamento para três (5, 8 e 9) dos quatros isolados testados; enquanto a fração butanólica apenas para o isolado 9 (Tabela 15).

Tabela 14: Efeito da associação das frações do extrato metanólico das folhas de *D. vandellianum* ao fluconazol na atividade antifúngica, em milímetros de diâmetro.

Isolados	Fluconazol													
	*		+ Diclorometânica			+ Acetona			+ Cloroformio: metanol 95:5			+ Metanólica		
	mm	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil
1	16	I	20,0	0	S	31,0	0	S	26,0	0	S	26,0	1,15	S
5	-	R	27,3	0,58	S	25,7	0,58	S	30,0	0	S	14,0	0	I
8	-	R	-	0	R	26,7	0,58	S	17,3	0,58	I	26,7	0,58	S
9	-	R	19,3	0,58	S	27,0	0	S	16,0	0	i	25,7	0,58	S

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos; (+) com associação a; (-) sem atividade antifúngica; (*) sem associação

Tabela 15: Efeito da associação das frações do extrato metanólico das inflorescência de *D. vandellianum* ao fluconazol na atividade antifúngica, em milímetros de diâmetro.

Isolados	Fluconazol										
	*		+ Acetato de etila			+ Clorofôrmica			+ Butanólica		
	mm	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil	x	σ	perfil
1	16	I	21,7	0,58	S	14,0	I	1,15	20,0	0	S
5	-	R	24,7	0,58	S	30,0	S	0	0	0	R
8	-	R	29,7	0,58	S	29,0	S	0	0	0	R
9	-	R	28,7	0,58	S	20,3	S	1,15	12,7	0,58	R

(σ) desvio padrão; (x) média aritmética dos halos; (+) com associação a; (-) sem atividade antifúngica; (*) sem associação

5.0 Discussão

A descoberta de agentes antimicrobianos revolucionou o tratamento das infecções reduzindo o número de mortes causadas pelas doenças microbianas e melhorando a qualidade de vida de pessoas infectadas, uma vez que o tempo de hospitalização e tratamento foram reduzidos. Entretanto, os micro-organismos desenvolveram adaptação a estas substâncias; os chamados mecanismos de resistência antimicrobiana (DE SOUZA, 2007).

A resistência antimicrobiana é uma consequência natural resultante da adaptação do agente infeccioso ao antimicrobiano utilizado. Esses agentes exercem a chamada "pressão seletiva" eliminando cepas sensíveis e selecionando as resistentes. Com a diminuição da eficácia dos agentes antimicrobianos as infecções tornam-se, cada vez mais, de difícil tratamento e isso contribui para o aumento nos índices de morbidade e mortalidade das doenças infecciosas (BYARUGABA, 2004).

A busca por novos agentes antimicrobianos ou moléculas protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos mais potentes e com espectros de ação mais amplos foi motivada, principalmente, pelo aparecimento de resistência antimicrobiana e a necessidade de tratar infecções que antes eram fáceis de serem debeladas (ZAMPINI et al, 2005).

Neste contexto se insere as plantas, em especial as superiores, matérias primas utilizadas desde a antiguidade para tratar enfermidades. Os diferentes grupos vegetais, em todas as culturas, foram e são fontes de compostos biologicamente ativos (GIBBONS, 2005). Acredita-se que os vegetais possuem metabólitos com potencial antimicrobiano pelo fato de produzirem compostos que os protegem contra pragas do seu habitat natural (DE SOUZA, 2007). Recentemente, além de procurar nas plantas substâncias com potencial antimicrobiano, outra estratégia começou a ser estudada, cuja finalidade é encontrar ação sinérgica entre produtos naturais e agentes antimicrobianos em uso na clínica (HEMAISWARYA et al, 2008; WAGNER e ULRICH-MERZENICH, 2009). A compreensão molecular dos mecanismos de sinergia e a confirmação do sinergismo entre produtos naturais e antimicrobianos possibilitariam a criação de uma nova estratégia para o tratamento de doenças infecciosas (HEMAISWARYA et al, 2008).

Entre tantas plantas nativas do semiárido baiano este trabalho focou no estudo do potencial antimicrobiano e sinérgico de metabólitos de duas espécies da

família Rutaceae: *Zanthoxylum tingoassuiba* e *Dictyoloma vandellianum* com o objetivo de identificar metabólitos, ou misturas com potencial para o desenvolvimento de novas drogas, associações ou esquemas terapêuticos e contribuir para a elucidação do potencial antimicrobiano e sinérgico da flora regional.

Para que os objetivos deste trabalho fossem alcançados, inicialmente os metabólitos foram extraídos das espécies em estudo. As técnicas de hidrodestilação e maceração são constantemente adotadas visando à obtenção de óleos essenciais e extratos brutos respectivamente (COSTA, V. et al, 2008; MAHBOUBI; BIDGOLI, 2009; DURAI PANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2009).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana de metabólitos extraídos das espécies em estudo, a literatura relata apenas a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Z. tingoassuiba*, frente às bactérias Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Micrococcus luteus*, e fungos dermatófitos como *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum* (DETONI et al, 2009). Os resultados encontrados neste estudo corroboram com os achados desses autores já que observa-se atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Z. tingoassuiba* frente à cepa padrão ATCC e isolados multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.

Hohlemwenger (2010) demonstrou que o óleo essencial de *Z. tigoassuiba* é constituído por uma mistura de fenilpropanóides, monoterpenos e sequiterpenos. Sendo os componentes majoritários o antranilato de metila, alfa-bisabolol além de β -eudesmol, oxi- α bisabolol e elemol. Esses resultados sugerem que a atividade antibacteriana do óleo seja devido ao antranilato de metila e alfa-bisabolol, já que é descrito a atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral de óleos essenciais que possuem em sua composição estas substâncias (COWAN, 1999; GUERREIRO et al, 2005; RAHMAN et al, 2008).

A atividade antibacteriana de metabólitos extraídos de outras espécies do gênero *Zanthoxylum* tem sido descrita na literatura. Costa J. e colaboradores (2008) mostraram a atividade antibacteriana do óleo extraído dos frutos de *Zanthoxylum rhoifolium* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Shigella flexneri*. Também já foi relatada a atividade do óleo dos frutos de *Zanthoxylum xanthoxyloides* (NGASSOUM et al, 2003). Rodrigues e colaboradores (2010) demonstraram a atividade antibacteriana de compostos voláteis do óleo essencial de *Zanthoxylum articulatum*, frente a patógenos bacterianos de infecções

respiratórias. Patinõ e Cuca (2011) demonstraram a atividade de alcalóides benzofenentridínicos isolados da espécie *Zanthoxylum monophyllum* frente a isolados de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Salmonella tiphymurium*. Alcalóide da mesma classe isolados da *Zanthoxylum clava-herculis* mostrou atividade frente à *Staphylococcus aureus* MRSA's possuidoras de sistema de efluxo de multidrogas (Gibbons et al, 2003a).

A atividade antibacteriana principalmente anti *Staphylococcus aureus* de três extratos (metanólico, clorofórmio e éter de petróleo) provenientes das folhas da espécie *Z. budrunga* é descrita por Islam e colaboradores (2000). Neste estudo, o único extrato produzido a partir das folhas de *Z. tingoassuiba* que apresentou atividade, com valores de CIM relevantes, foi o de acetato de etila, não sendo observada a atividade para os extratos metanólicos, hexânicos e aquoso.

Comparando nossos resultados de atividade antibacteriana do extrato metanólico da raiz de *Z. tingoassuiba* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* com os resultados do extrato metanólico da raiz de *Zanthoxylum stelligerum* obtidos no estudo de Da Silva e colaboradores (2010), que demonstram a atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*, foi possível observar que neste trabalho os halos de inibição de crescimento bacteriano com tamanhos maiores, de 11 a 23 mm, que os obtidos no estudo em questão, de 10 a 14 mm. Fato que pode inferir uma maior atividade dos extratos produzidos pela espécie *Z. tingoassuiba*.

Bhattacharya e colaboradores (2009) testaram a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos e aquosos da raiz e casca do caule de *Z. nitidum* e demonstraram, em concentrações iguais ou inferiores a 1,25 mg/mL, que esses extratos são capazes de inibir o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus*. Já os resultados aqui apresentados mostram que metabólitos do caule de *Z. tingoassuiba* ou não apresentaram atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* ou possuem CIM superior a 4mg/mL, porém os metabólitos da casca de raiz mostraram maior atividade com valores de CIM iguais ou menores que 0,5mg/mL, quando comparados aos achados de Bhattacharya e colaboradores (2009).

Não existem publicações que demonstrem a atividade antibacteriana de metabólitos extraídos do gênero *Dictyoloma*. Dados não publicados e obtidos em estudos anteriores no LPMC, mostram que o extrato metanólico das folhas da espécie *D. vandellianum* apresenta atividade antibacteriana frente a cepas de bactérias

Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Micrococcus luteus* e Gram negativas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella cholera-suis*. Os resultados deste estudo corroboram com os resultados anteriores obtidos pelo grupo, pois mostram atividade anti estafilocócica de metabólitos extraídos das folhas. Os resultados ainda demonstram a atividade anti estafilocócica de extratos do caule e inflorescência da espécie *D. vandellianum*. A única atividade biológica publicada na literatura para o gênero *Dictyoloma* é a ação frente à *Leishmania amazonensis* (LAVAUD et al, 1995), portanto os dados obtidos nesse estudo são inéditos sobre o potencial antimicrobiano desta planta do semiárido. Outras publicações que mostram a atividade antibacteriana de metabólitos de plantas da família Rutaceae são apresentadas no Quadro 06.

PLANTA	MICRO-ORGANISMO	FONTE
<i>Esenbeckia grandiflora</i> e <i>Galipea simplicifolia</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> .	COSTA et al, 2010 NOVAIS et al, 2003
<i>Boenninghausenia albiflora</i>	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> .	KHULBE e SATI, 2009
<i>Toddalia asiatica</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,.	DURAI PANDIYAN e IGNACIMUTHU, 2009
<i>Triphasia trifolia</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella choleraeasuis</i> .	DOS SANTOS et al, 2008
<i>Sarcomelicope megistophylla</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>K. pneumoniae</i> ,	FOKIALAKIS et al, 2002

Quadro 06- Atividade antibacteriana de algumas plantas da família de Rutaceae

Duas classificações que determinam o potencial de atividade antimicrobiana de extratos provenientes de plantas são propostas na literatura, de acordo com a

faixa de concentração das CIM obtidas. Holetz e colaboradores (2002) estabeleceram que um extrato com forte atividade deve apresentar CIM com concentração menor que 0,1 mg/mL; com atividade moderada CIM de 0,1 a 0,5 mg/mL; com atividade fraca de 0,5 a 1,0 mg/mL e o extrato é considerado inativo com CIM superior a 1,0 mg/ML. Já Aligiannis e colaboradores (2001) classificam extratos vegetais como forte inibidores quando a CIM é menor que 0,5 mg/mL, inibidores moderados quando a CIM apresenta valores entre 0,6 a 1,5 mg/mL e fracos inibidores quando os valores de CIM estão acima de 1,6 mg/mL.

Utilizando a classificação sugerida por Aligiannis e colaboradores (2001), os extratos metanólico e diclorometânico provenientes da casca da raiz da espécie *Z. tingoassuiba* podem ser considerados forte inibidores, enquanto que o de acetato de etila das folhas um inibidor moderado; já os extratos metanólicos do caule, folha e inflorescência da *D. vandellianum* podem ser considerados como fracos inibidores. Considerando a de Holetz e colaboradores (2002) apenas o extrato diclorometânico da casca de raiz de *Z. tingoassuiba* pode ser classificado como produtor de forte atividade, porém para alguns isolados, o extrato metanólico da casca de raiz e o acetato de etila das folhas como produtores de atividade moderada e fraca, respectivamente. Os demais extratos metanólicos da inflorescência, do caule e das folhas de *D. vandellianum* são inativos. É importante considerar que os extratos são compostos por uma mistura de substâncias e que a substância ativa pode estar em quantidades pequenas. Portanto, a ausência de atividade antimicrobiana em extratos brutos não deve ser considerada como um resultado negativo absoluto.

A avaliação do efeito sinérgico dos extratos das duas espécies em estudo foi realizada utilizando *Staphylococcus aureus*, patógeno frequentemente isolado em infecções comunitárias e nosocomiais. É um micro-organismo conhecido por sua capacidade de adquirir resistência a diversos antibióticos utilizados na clínica (STAVRI et al, 2007). As opções terapêuticas para infecções causadas por este organismo podem ser bastante limitadas, especialmente quando as cepas são resistentes à meticilina (MRSA).

Ainda não se conhece o mecanismo de resistência dos isolados clínicos de *S.aureus* utilizados nesse estudo, porém a literatura descreve três mecanismos para aquisição de resistência as fluoroquinolonas em *S. aureus*. O primeiro consiste em mutação na subunidade A da DNA girase bacteriana, uma proteína tetramérica que possui duas subunidades A e B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*,

respectivamente. Fluoroquinolonas interagem com essa enzima através da subunidade A e mutações nessa região reduz a afinidade da droga pela enzima e consequentemente diminui a inibição da ação da DNA girase (BLONDEAU, 1999); o segundo mecanismo envolve o efluxo de fluoroquinolonas da célula bacteriana. Este tipo de resistência é mediada pela proteína NorA e não confere resistência apenas às fluoroquinolonas, mas também a vários outros tipos de substâncias estruturalmente diferentes como brometo de etídio; já o terceiro mecanismo envolve um locus do fragmento cromossômico chamado *flqA*. Este locus confere menor nível de resistência comparado com mutações *gyrA* (KAATZ; SEO, 1995; BEYER et al, 2000).

A indução de resistência a fluoroquinolona foi realizada, como descrita por Kaartz e Seo (1995), nos isolados que apresentavam sensibilidade a essa classe de droga visando obter *Staphylococcus aureus* que possuíssem bomba de efluxo como mecanismo de resistência a esses antibióticos. Encontrar metabólitos que tivessem ação antimicrobiana e sinérgica com fluoroquinolonas, frente a esses micro-organismos, possibilitaria estender essa atividade a outros micro-organismos como os fungos, bactérias Gam negativas e até células cancerígenas que utilizam desse mecanismo pra resistir à ação das drogas.

Testes de sinergismo entre produtos naturais e antibióticos sintético são frequentemente relatados com bactérias da espécie *S.aureus* resistente a metilicina (MRSA) ou as que possuem mecanismo de resistência conhecido como bomba de efluxo (COSTA, V. et al, 2008, MAHBOUBI e BIDGOLI, 2009). Gibbons e colaboradores (2003b) mostram que diterpenos isolados da *Lycopus europaeus* (Lamiaceae), reduzem os valores de CIM da tetraciclina e eritromicina em cepas resistentes a esses antibióticos. Inibidores da bomba de efluxo isolados da *Geranium caespitosum* potencializam a ação de fluoroquinolonas como norfloxacin e ciprofloxacina em isolados de *Staphylococcus aureus* diminuindo os valores de CIM desses antibióticos em até quatro vezes (STERMITZ et al, 2003). Mahboubi e Bidgoli (2009) mostram a ação sinérgica do óleo essencial de *Zataria multiflora* com a vancomicina frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

Não existem trabalhos de associação de metabólitos da espécie *Z. tingoassuiba* com antibióticos, esse é o primeiro que mostra que o óleo essencial extraído das folhas da espécie em associação com fluoroquinolonas potencializam a ação desses diminuindo significativamente os valores de concentração inibitória

mínima dos antibióticos. Ainda foi possível observar a ação sinérgica dos extratos metanólico das folhas e hexânico das folhas e caule de *Z. tingoassuiba* quando esses foram associados à discos de ciprofloxacina e norfloxacina. Esses extratos não apresentavam atividade antibacteriana e aumentaram os halos de inibição de crescimento dos antibióticos quando avaliados, principalmente frente às cepas nas quais a resistência foi induzida.

Kusuda e colaboradores (2006) associaram constituintes do fruto de *Z. piperitum* com alguns antibióticos utilizados clinicamente no tratamento de cepas MRSA. Em associação com a norfloxacina os metabólitos extraídos não interferiram na ação da droga. Os resultados deste estudo mostram que metabólitos de *Z. tingoassuiba* possuem essa característica, diminuindo a CIM das fluoroquinolonas, ciprofloxacina e norfloxacina.

Com o uso indiscriminado de antifúngicos há um aumento no número e variedade de cepas resistentes. As dificuldades apresentadas pelo tratamento, como a toxicidade dos agentes antifúngicos, também é um fato preocupante e limitador. Novos agentes terapêuticos são necessários para suprir as limitações do uso dos antifúngicos. Isto pode ser alcançado através da utilização de combinações de agentes existentes ou o desenvolvimento de novas entidades químicas mais seguras e eficazes.

Apesar da atividade antifúngica já relatada para várias plantas da família Rutaceae revisadas por COWAN (1999) e NEWTON e colaboradores (2002), não detectamos esta atividade nos metabólitos extraídos das folhas e das inflorescências da espécie *D. vandellianum*. Steenkamp e colaboradores (2007) mostraram que os extratos metanólico e aquoso da *Zanthoxylum davyi* possuem forte atividade antifúngica frente à cepa padrão ATCC 10231 de *C. albicans*; extratos de *Zanthoxylum chalybeum*, apresentam atividade anti- *Candida* (RUNYORO et al, 2006), Mishra e colaboradores (2010) testaram a atividade antifúngica de metabólitos extraídos da *Aegle marmelos* e comprovaram sua atividade frente a espécies de *Aspergillus* e *Candida albicans*. Shai e colaboradores (2008) mostraram que metabólitos extraídos da espécie *Vepris reflexa* inibem o crescimento de fungos como *C. albicans* e *C. neoformans*.

A literatura relata ação sinérgica de produtos extraídos de plantas quando associados à antifúngicos. Amber e colaboradores (2010) apresentam a ação sinérgica do óleo essencial de *Ocimum sanctum* associado ao fluconazol e

cetoconazol frente a isolados de *Candida* sp. A forte atividade sinérgica do óleo de *Allium sativum* em associação com o cetoconazol frente a isolados das espécies *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton erinacei* e *Trichophyton soudanense* foi demonstrada por Pyun e Shin (2005). Shin e Lim (2004) demonstram a atividade sinérgica com o cetoconazol de metabólitos naturais frente a cepas de *Trichophyton* spp. A ação potencializadora de metabólitos extraídos da *Euphorbia characias* com leveduras da espécie *Candida albicans* é mostrada por Giordani e colaboradores (2001).

Até o presente momento não existem trabalhos relatando atividade sinérgica de metabólitos extraídos da espécie *D. vandellianum* com antifúngicos. Os resultados obtidos no presente estudo são inéditos no relato de associações entre os extratos e frações dessa planta com fluconazol. Demonstrando que os metabólitos sem atividade são capazes de aumentar significativamente a atividade antifúngica do fluconazol frente a isolados clínicos multirresistentes de *Candida* spp, porém sem atividade para *Cryptococcus*.

6.0 Conclusões

1. Os extratos acetato de etila e aquoso das folhas; metanólico do caule e diclorometânico e metanólico da casca de raiz; além do óleo essencial de *Z. tingoassuiba* e os extratos metanólico das folhas, inflorescência e caule de *D. vandellianum* apresentaram atividade antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus*;
2. O óleo essencial de *Z. tingoassuiba* mostrou grande atividade sinérgica com as fluoroquinolonas, norfloxacin e ciprofloxacina, frente ao *Staphylococcus aureus*;
3. Não foi observada atividade antifúngica dos extratos e frações das folhas e inflorescências de *D. vandellianum* testados frente a isolados do gênero *Candida* e *Cryptococcus*;
4. Extratos e frações das folhas e inflorescências de *D. vandellianum* apresentaram grande atividade sinérgica com o fluconazol frente a isolados clínicos de *Candida* spp.
5. Extratos e frações das folhas e inflorescências de *D. vandellianum* não apresentaram atividade sinérgica com o fluconazol frente a isolados clínicos de *Cryptococcus* spp.

7.0 Perspectivas

As micromoléculas presentes nas partes aéreas e subterrâneas das espécies *Z. tingoassuiba* e *D. vandellianum* apresentaram expressiva atividade antibacteriana e potencializaram a ação de fluoroquinolonas frente a *S. aureus* e também foram capazes de potencializar a ação do fluconazol frente à *Candida* spp. Estes resultados nos leva a concluir que essas plantas possuem potencial antibacteriano e sinérgico, que merece ser investigado com mais profundidade. Nesse sentido, sugere-se as seguintes perspectivas para a continuidade deste estudo:

1. Ampliar os estudos de atividade antimicrobiana dos metabólitos para fungos filamentosos e outras gêneros bacterianos;
2. Fracionar, purificar e identificar os principais constituintes químicos dos metabólitos cujas atividades antimicrobiana e sinérgica foram demonstradas;
3. Testar a atividade antimicrobiana das substâncias puras e em misturas visando identificar o papel do grau de pureza destas substâncias na atividade observada;
4. Investigar o mecanismo de resistência das cepas induzidas de *Staphylococcus aureus* obtidas nesse estudo através de técnicas moleculares;
5. Determinar a atividade moduladora de resistência dos metabólitos frente à *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina.

Referências

- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOI, I. B. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. **Journal Agric Food Chem**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- AMBER, K.; AIJAZ, A.; IMMACULATA, X.; LUQMAN, K. A.; NIKHAT, M. Anticandidal effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 17, p. 921–925, 2010.
- ANDRADE M. A. **Tipagem molecular e investigação dos genes toxigênicos em *Staphylococcus aureus* isolados de amostras clínicas**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 2008.
- ARAUJO, C. D. **Atividade antibacteriana *in vitro* e *in sito* de *Allium tuberosum* – Rottler ex Spengl (alho “nirá”, alho “japonês”, “jiucaí”, alho “chinês”) – Liliaceae –sobre agentes de toxinfecções alimentares**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.
- 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.
- BALL, A. R.; CASADEI, G.; SAMOSORN, S.; BREMNER, J.; AUSUBEL, F. M.; MOY, T. I.; LEWIS, K. Conjugating Berberine to a Multidrug Resistance Pump Inhibitor Creates an Effective Antimicrobial. **ACS Chemical Biology**, v.01, n. 09, p. 594–600, 2006.
- BHATTACHARYA, S.; ZAMAN, M. K.; HALDAR, P. K. Antibacterial activity of stem bark and root of indian *Zanthoxylum nitidum*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 02, n. 01, p. 30- 34, 2009.
- BEYER, R.; PESTOVA, E.; MILLICHAP, JOHN, J.; STOSOR, V.; NOSKIN, G. A.; PETERSON, L. R. A Convenient Assay for Estimating the Possible Involvement of Efflux of Fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: Evidence for Diminished Moxifloxacin, Sparfloxacin, and Trovafloxacin Efflux. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 798–801, 2000.
- BLONDEAU, J. M. Expanded Activity and Utility of the New Fluoroquinolones: A Review. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 01, 1999.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 546p. Home page: www.anvisa.gov.br
- BYARUGABA, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 105–110, 2004.

CABAÑES, F. J. Micosis y zoonosis: *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, p.S1-S3, 2008.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSLI). Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard- 7th edition. CLSI document M02-A10, Wayne, PA 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline- Second Edition. CLSI document M44-A2, Wayne, PA 2009.

COSTA, V. C. O.; TAVARES J.F.; AGRA M.F.; FALCÃO-SILVA V.F.; FACANALI R.; VIEIRA M.A.R. MARQUES M.O.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR J.P.; DA SILVA M.S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 02, p. 245-248, 2008.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; SILVA, M. R.; CAMPOS, A. R.; LEMOS, T. L. G.; LIMA, S. G. Chemical Composition, Antibacterial and Larvicidal Activities of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam Fruits Essential Oil. **Jeobp**, v. 11, n. 06, p. 571 – 576, 2008.

COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; SÃO PEDRO, A.; DAVID, J. P.L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; DOS SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 04, p. 502-505, 2010.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA JUNIOR, J. P.; LIMA, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 670-675, 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. 09, p. 24-27, 2009.

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

CRUZ, M.C.S.; SANTOS, P.O.; BARBOSA, A.M.; DE M'ELO, D.L.F.M.; ALVIANO, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; ALVIANO, D.S.; TRINDADE, R.C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.409–412, 2007.

DA SILVA, L. L., PAOLI, A. A. S. Morfologia e anatomia da semente de *Dictyoloma vandellianum* Adr.Juss. (RUTACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 03, p.116-120, 2006.

DA SILVA, C. V.; DETONI, C. B.; VELOZO, E. S.; GUEDES, M. L. S. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil. **Química Nova**, v. 31, n. 08, p. 2052-2055, 2008.

DA SILVA, 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 Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 355-360, 2010.

DETONI, C. B.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E. C.; HOHLEMWEGER, S. V.; SAMPAIO, C.; BARROS, T. F.; VELOZO, E. S. Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuiba* loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 08, p.684-691, 2009.

DE ABREU, G. W.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Med**, v. 69, n. 08, p.773-775, 2003.

DE QUEIROZ, J. P. A. F.; SOUSA, F. D. N.; LAGE, R. A.; IZABEL, M. A.; DOS SANTOS, A. G. Criptococose - uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.02, n.02, p.32-38, 2008.

DE SOUZA, Tatiana Maria. **Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* o. berg. (myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (mart.) coville (leguminosae-mimosoidae).** Dissertação (Mestrado) - Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, São Paulo, 2007.

DIEGUEZ-HURTADO, R.; GARRIDO-GARRIDO, G.; PRIETO-GONZALEZ, S.; IZNAGA, Y.; GONZALEZ, L.; MOLINA-TORRES, J.; CURINI, M.; EPIFANO, F.; MARCOTULLIO, M. C. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. **Fitoterapia**, v.74, n. 04, p. 384-386, 2003.

DOS SANTOS, R.; TREVISAN, M. T. S, SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Composição química e atividade biológica das folhas e frutos de *Triphasia trifoli*. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 53-58, 2008.

DURAIKANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial and antifungal activity of Flindersine isolated from the traditional medicinal plant, *Toddalia asiatica* (L.) Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p. 494-498, 2009.

FERREIRA, M. E.; ROJAS DE AIRAS, A.; TORRES DE ORTIZ, S.; INCHAUSTI, A.; NAKAYAMA, H.; THOUVENEL, C.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Journal Ethnopharmacol**, v. 80, p. 199-202, 2002.

- FOKIALAKIS, N.; MAGIATIS, P.; CHINOU, I.; MITAKU, S.; TILLEQUIN, F. Megistoquinones I and II, Two Quinoline Alkaloids with Antibacterial Activity from the Bark of *Sarcomelicope megistophylla*. **Chem. Pharm. Bul**, v. 50, n. 03, p. 413- 414, 2002.
- FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, freqüência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 01, p. 23-28, 2008.
- GIBBONS, S.; UDO, E. E. The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant. **Phytother Res**, v. 14, p.139–140, 2000.
- GIBBONS, S.; LEIMKUGEL, J.; OLUWATUYI, M.; HEINRICH, M. Activity of *Zanthoxylum clava-herculis* extracts against multi-drug resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mdr-MRSA). **Phytother Research**, v. 17, n. 03, p. 274-275, 2003a.
- GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; VEITCH, N. C.; GRAY, A. I. Bacterial Resistance Modifying Agents from *Lycopus europaeus*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 83-87, 2003b.
- GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21, p.263-277, 2004.
- GIBBONS, S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 04, p. 63–78, 2005.
- GIORDANI, R.; TREBAUX, J.; MASI, M.; REGLI, P. Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 78, p. 1–5. 2001.
- GOLD, H. S.; MOELLERING, R. C. Jr. Antimicrobial-drug resistance. **New Engl. Journal Med.**, v. 335, p. 1445–1453, 1996.
- GONZAGA, W.A.; WEBER, A.D.; GIACOMELLI, S.R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I.I.; DESSOY, E.C.M.; MOREL, A.F. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Med.**, v. 08, p. 773-775, 2003.
- GUERREIRO, G.; DE LIMA, J. E. S.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; MAGALHÃES, C. M. I.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J. A.; PIRANI, J. R. Sesquiterpenos do caule de *Pilocarpus riedelianus* e atividades sobre microorganismos. **Quimica Nova**, v.28, n. 06, p. 986-990, 2005.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v.15, p. 639–652, 2008.

HINRICHSEN, S. L.; FALCÃO, É.; VILELLA, T. A. S.; COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; MOURA, L.; RÊGO, L.; LIRA, C.; ALMEIDA, L. Candidemia em hospital terciário do nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 04, p. 394-398, 2008.

HOHLEMWERGER, S. V. A. **Metabólitos e atividade biológica de espécies de *Zanthoxylum* da Bahia**. Tese (Programa de Pesquisa e Pós Graduação em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 07, p.1027-1031, 2002.

ISLAM, A.; SAYEED, A.; BHUIYAN, M. S. A.; MOSADDIK, M. A.; ISLAM, M. A. U.; KHAN, G. R. M. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum budrunga*. **Fitoterapia**, v. 72, p.428- 430, 2001.

JAIN, S.R., KAR, A. The antibacterial activity of some essential oils and their combinations. **Planta Med**, v. 20, p.118-123, 1971.

JO, Y. S.; HUONG, D. T.; BAE, K.; LEE, M. K.; KIM, Y. H. Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*. **Planta Med**, v.68, n. 1, p. 84-85, 2002.

KAATZ, G. W.; SEO, S. M. Inducible NorA-Mediated Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.12, p. 2650-2655, 1995.

KASUDA, M.; INADA, K.; OGAWA, T.; YOSHIDA, T.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; HATANO, T. Polyphenolic constituent structures of *Zanthoxylum piperitum* Fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 70, n. 06, p. 1423-1431, 2006.

KHULBE, K.; SATI, S. C. Antibacterial activity of *Boenninghausenia albiflora* Reichb. (Rutaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 08, n. 22, p. 6346- 6348, 2009.

KUETE, V.; KAMGA, J.; SANDJO, L. P.; NGAMENI, B.; POUMALE, H. M. P.; AMBASSA, P.; NGADJUI, B. T. Antimicrobial activities of the methanol extract, fractions and compounds from *Ficus polita* Vahl.(Moraceae).**BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n.06, p. 01-06, 2011.

KWON-CHUNG, K. J.; VARMA, A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? **Federation of European Microbiological Societies**, v. 06, p.574–587, 2006.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; VACCARI, E.M.H.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; VASQUEZ, C.; MORETII, C.; SAUVAIN, M.; ALDERRAMA, L. 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 317–320, 1995

LEITE, Fernanda S. **Perfil fenotípico e de expressão de proteínas de *Cryptococcus neoformans* após tratamento com substâncias obtidas da planta *Pterogyne nitens***. Dissertação (Pós Graduação em Biociência e Biotecnologia Aplicada a Farmácia) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 2010.

LESTER, S. J.; MALIK, R.; BARTLETT, K. H.; DUNCAN, C. G. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v.40, p. 04-17, 2011.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 02, p.197-201, 2006.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 35, n. 02, p. 371-376, 2005.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* The **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 09, 2003.

MAHBOUBI, M.; BIDGOLI, F. G. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. **Phytomedicine**, n. 11, p. 04-06, 2009.

MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA T. S., COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical screening and modulation of antibiotic activity by *Ocimum gratissimum* L.. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 09, p. 13-16, 2010.

MISHRA, B. B.; KISHORE, N.; TIWARI, V. K.; SINGH, D. D.; TRIPATHI, V. A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos Correa* (family Rutaceae). **Fitoterapia**, v. 81, p. 104–107, 2010.

NEWTON, S. M.; LAU, C.; GURCHA, S. S.; BESRA, G. S.; WRIGHT, C. W.;. The evaluation of forty-three plant species for in vitro antimycobacterial activities; isolation of active constituents from *Psoralea corylifolia* and *Sanguinaria Canadensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 57–67, 2002.

NGASSOUM, M.B., ESSIA-NGANG, J.J., TATSADJIEU, L.N., JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., ADJOUJDI, O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. **Fitoterapia**, v.74, n.03, p. 284- 287, 2003.

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

NUNES, Maína O. **Epidemiologia de candidemias e perfil de susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* em hospital universitário de Mato Grosso do Sul**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

OLILA, D.; OLWA-ODYEK; OPUDA-ASIBO, J. Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Zanthoxylum chalybeum* and *Warburgia ugandensis*, Ugandan medicinal plants. **Afr Health Sci**, v. 01, n. 02, p. 66-72, 2001.

PATINÕ, O. J., CUCA, O. J. Monophyllidin, a new alkaloid L-proline derivative from *Zanthoxylum monophyllum*. **Phytochemistry Lettrs**, v. 04, p.22-25, 2011.

PAVITHRA, P.S.; SREEVIDYA, N.; VERMA, R. S. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Pamburus missioni*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.124, p.151–153, 2009.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, p. 278–283, 2010.

PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; COSTA DE OLIVEIRA, S.; RICARDO, E.; MARDH, P. A. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 678–685, 2005.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PYUN, M. S.; SHIN, S. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 13, p.394–400, 2005.

RAHMAN, M. T.; ALIMUZZAMAN, M.; AHMAD, S.; CHOWDHURY, A. A. Antinociceptive and antidiarrhoeal activity of *Zanthoxylum rhetsa*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 04, p. 340-342, 2002.

RAHMAN, M. M.; GARVEY, M.; PIDDOCK, L. J. V.; GIBBONS, S. Antibacterial terpenes from the oleo-resin of *Commiphora molmol* (Engl.) **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 1356–1360, 2008.

REMONATTO, G.; CARDOSO, C. M.; MARQUES, C. G.; SILVA, A. E. B.; GELATTI, L. C.; LEITE, C. F. M. CA-MRSA: um patógeno emergente. **News Lab**, v. 80, p.92-96, 2007.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Enhancement of the antibiotic activity of gentamicin by volatile compounds of *Zanthoxylum articulatum*. **Indian Journal Med Res**, v. 131, p. 833-835, 2010.

RUNYORO, D. K. B.; MATEE, M. I. N.; NGASSAPA, O. D.; JOSEPH, C. C.; MBWAMBO, Z. H. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 06, n. 11, 2006.

SANGWAN, P. L.; KOUL, J. L.; KOUL, S.; REDDY, M. V.; THOTA, N.; KHAN, I. A.; KUMAR, A.; KALIA, N. P.; QAZI, G. N. Piperine analogs as potent *Staphylococcus aureus* NorA efflux pump inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9847-9857, 2008.

SARTOR, C. F. P.; da SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, J. P. C.; FO, E. R.; CORTEZ, D. A. G. Alkaloids from *Dictyoloma vandellianum*: their chemosystematic significance. **Phytochemistry**, v. 63, p.185–192, 2003.

SEVERINO, V. G. P.; DA SILVA, M. F. G. F.; LUCARINI, R.; MONTANARI, L. B.; CUNHA, W. R.; VINHOLIS, A. H. C.; MARTINS, C. H. G. Determination of the antibacterial activity of crude extracts and compounds isolated from *Hortia oreadica* (Rutaceae) against oral pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 535-540, 2009.

SHAI, L. J.; MCGAW, L. J.; MASOKO, P.; ELOFF, J.N. Antifungal and antibacterial activity of seven traditionally used South African plant species active against *Candida albicans*. **South African Journal of Botany**, v. 74, p. 677–684, 2008b.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 1289–1296, 2004.

SILVA, L. V. S. **Epidemiologia clínica e molecular de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina carreadores de cassete cromossômico estafilocócico mec tipo IV de pacientes atendidos em Hospital Universitário de Porto Alegre.** Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

SOUSA, M. A.; CONCEIÇÃO, T.; SIMAS, C.; LENCASTRE, H. Comparison of Genetic Backgrounds of Methicilin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Portuguese Hospitals and the Community. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.10, p. 5150-5157, 2005.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J. V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 1247–1260, 2007.

STEENKAMP, V.; FERNANDES, A. C.; VAN RENSBURG, C. E. J. Screening of *Venda* medicinal plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **South African Journal of Botany**, v. 73, p. 256–258, 2007.

STERMITZ, F. R.; CASHMAN, K. K.; HALLIGAN, K. M.; MOREL, C.; TEGOS, G. P.; LEWIS, K. Polyacylated Neohesperidosides From *Geranium caespitosum*: Bacterial Multidrug Resistance Pump Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, p. 1915–1918, 2003.

TANG, Y. W.; STRATTON, C. W. *Staphylococcus aureus*: An Old Pathogen with New Weapons. **Clin Lab Med**, v.30, p.179–208, 2010.

TATSADJIEULN, ESSIA, N. J. J.; NGASSOUM, M. B.; ETOA, F. X. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopi aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, n. 05, p.469-472, 2003.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, n. 03, p. 281-301, 2000.

THOUVENEL, C.; GANTIER, J. C.; DURET, P.; FOURNEAU, C.; HOCQUEMILLE, R.; FERREIRA, M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; FOURNET, A. Antifungal compounds from *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Phytother Res**, v. 17, n. 06, p.678-680, 2003.

TRABULSI L. R.; ALTERTHUM F. *Staphylococcus aureus*. In: TEIXEIRA L. M.; SANTOS K. R. N.; BUERIS V.; TRABULSI L. R. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.175-182

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, p. 97-100, 2009.

YAM, T. S.; HAMILTON- MILLER, J. M. T.; SHAH, S. The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and β - lactamase production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 211-216, 1998.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**,v. 24, n. 01, p.147-152, 2001.

ZAMPINI, I. C.; VATTUONE, M. A.; ISLA, M. I. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 450–45, 2005.

ZETOLA, N.; FRANCIS, J. S.; NUERMBERGER, E. L.; BISHAI, W. R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emergent threat. **Lancet Infectious Diseases**, v. 05, p. 275-286, 2005.