



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE CAXIAS – CESC
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIODIVERSIDADE,
AMBIENTE E SAÚDE – PPGBAS**

GIZELIA ARAÚJO CUNHA

**EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS EM BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO**

CAXIAS – MA
2016

GIZELIA ARAÚJO CUNHA

**EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS EM BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Laurindo da Silva.

CAXIAS – MA
2016

C972e Cunha, Gizelia Araújo

Efeitos de extratos vegetais em bactérias produtoras de beta lactamase de espectro estendido / Gizelia Araújo Cunha. __Caxias-MA: CESC/UEMA, 2016.

79f.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Laurindo da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Estudos Superiores de Caxias, Curso Mestrado em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

GIZELIA ARAÚJO CUNHA

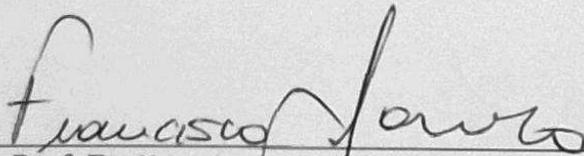
**EFEITOS DE EXTRATOS VEGETAIS EM BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA
LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde – PPGBAS/CESC/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade, Ambiente e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Laurindo da Silva

Aprovada em 27 / 07 / 2016

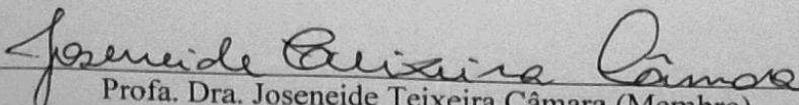
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Laurindo da Silva (Orientador)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA



Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes (Membro)
Universidade Federal do Piauí – UFPI



Profa. Dra. Joseneide Teixeira Câmara (Membro)
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

“Ainda que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam, Deus é a minha força. Ele é tudo o que eu sempre preciso. Salmo. 73:26”.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por me permitir que eu persista na realização dos meus objetivos;
A Universidade Estadual do Maranhão/CESEC, pela minha formação profissional e pelos anos de pesquisas que participei desde a época da graduação como bolsista de vários programas e hoje estar concluindo mais esta pesquisa referente ao mestrado;

À FAPEMA pela concessão da minha bolsa, pois sem a mesma não teria como arcar com as despesas da minha pesquisa.

Ao meu orientador pela paciência, compreensão, gentileza, e acima de tudo por me proporcionar uma nova visão sobre o estudo da Microbiologia e me deixar a cada dia mais vislumbrada com esse ramo da Biologia;

À minha família meu porto seguro Maria Izeuda (mãe), Getúlio (pai), Renata (irmã), José Gabriel, Ana Gabriela (sobrinhos), Junior (cunhado), pois mesmo eles estando longe ou perto sempre me deram apoio, e entenderam a minha ausência em muitos momentos importantes da nossa família;

Ao meu filho Luís Alberto minha fonte de inspiração e ao meu esposo João Alberto por me amar e ajudar nas horas mais difíceis, por ser esse grande companheiro e amigo de todas as horas;

As amigas de laboratório Francilene (Lene) e Gleiciane por me ajudarem nas minhas exaustivas horas de laboratório, e me auxiliarem na realização da minha pesquisa; elas foram de extrema gentileza todas as vezes que necessitei e solicitei do seu apoio;

À técnica do Laboratório de Química da FACID, Esmeralda por confeccionar os extratos vegetais;

Aos amigos Domingos Lukas e Werton por terem me ajudado nas coletas do material vegetal;

À minha amiga Juliana Bezerra Trindade, por sua amizade e ajuda na tabulação dos dados;

Aos quatorze grandes amigos que adquise na turma do PPBGAS e em especial, as minhas amigas Walna Micaelle e Caroline Kely grandes parceiras nos trabalhos, assim como no dia a dia das aulas, e na cantina da Gil kkkk. Uma amizade fortalecida não somente pelos laços do mestrado mas pela convivência umas com as outras. Desejo muito sucesso a todos da minha turma;

As zeladoras Fran e dona Antônia, e vigilante seu Bernardo, que sempre me trataram com respeito e admiração;

Ao professor Dr^o Gonçalo Mendes da Conceição, pela identificação do material botânico;

Aos professores que conheci nesses árduos dois anos de pós graduação, por me permitirem aprimorar meu senso crítico e assimilação de novos conhecimentos;

As minhas amigas Francisca (Zinha), Juciane, Joelma, Tarliane, Tatiane, Jairina pelos momentos de desabafos, incentivos e alegrias compartilhados;

As meus avós Antônia e Adalgiza (*In memoria*) mulheres fortes, guerreiras, batalhadora que se vive estivessem estariam sentindo muito orgulho ao ver sua neta prosperando, sei que aonde estiverem, estão contentes com tamanha realização;

Aos meus avôs paternos Luís Bezerra e avô materno Antônio homens simples da roça, mas muito trabalhadores.

RESUMO

Alguns vegetais constituem produtos de importância econômica, que podem ser utilizados como alimentos, cosméticos até medicamentos. É de conhecimento notório o uso de extratos vegetais com finalidades terapêuticas há milênios. Este trabalho teve como objetivo principal analisar a ação de extratos de vegetais em bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido. Trata-se de um estudo do tipo experimental. Os espécimes vegetais, *Piper aduncum* L. (Pimenta de macaco), *Turnera subulata* Sm. (Chanana), *Phyllanthus niruri* L. (Quebra pedra) e *Stryphnodendron adstringens* (Mart. Coville) (Barbatimão) foram coletados na Área de Proteção Ambiental do Inhamum. Os extratos brutos dos vegetais foram obtidos no Laboratório de Química da FACID/PI. As cepas bacterianas foram mantidas em repiques sucessivos em meio de cultura ágar eosina azul de metileno até utilização nos experimentos. Os testes de suscetibilidade foram realizados utilizando-se as cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, seguindo a técnica de difusão em ágar. O fracionamento químico dos extratos brutos foi realizado com a utilização dos solventes Hexano, Butanol e Acetato de Etila. Os extratos também foram utilizados em diluições seriadas, 1/10, 1/100 e 1/1000. Na análise dos resultados, evidenciou-se que o extrato de Quebra pedra e Chanana apresentaram atividade antimicrobiana para as quatro cepas. O extrato de Chanana foi o que apresentou maior atividade contra *P. aeruginosa* e *E. coli*, enquanto da Pimenta de macaco, para *K. pneumoniae*, *E. coli* e *A. baumannii* e não contra *P. aeruginosa*. O extrato bruto de Barbatimão não foi efetivo contra *A. baumannii*. Esse extrato, após seu fracionamento com Hexano, obteve-se os melhores halos de inibição contra *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*. Com relação à utilização dos extratos diluídos, a de 1/10 do Barbatimão e Chanana foi a que melhor inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*. Portanto, como base nos resultados obtidos, evidenciou-se que os extratos de Chanana, Quebra pedra e Barbatimão, apresentaram potencial antibacteriano sobre *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *A. baumannii*. Após fracionamento químico dos extratos brutos, o que apresentou melhor rendimento foi o Barbatimão, fracionado com hexano, aparentemente isolou compostos com atividade antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, entretanto, não teve ação sobre *A. baumannii*. A diluição seriada 1/10 do Barbatimão foi o que apresentou melhor espectro de ação sobre os micro-organismos testados, principalmente sobre *P. aeruginosa*.

Palavras-chaves: Extratos vegetais, micro-organismos, teste de suscetibilidade.

ABSTRACT

Some vegetables constitute products of economic importance that can be used with aliments, cosmetics and medicines. It's of notorious knowledge the use of vegetable extracts with therapeutics purpose for millennia. This work had how main goal analyze the vegetable extracts action in producing bacteria of β -lactamases of extended spectrum. The vegetables specimens, *Piper aduncum* L. (Pimenta de macaco), *Turnera subulata* Sm. (Chanana), *Phyllanthus niruri* L. (Quebra pedra) and *Stryphnodendron adstringens* (Mart. Coville) (Barbatimão) were collected in the environmental protection area Inhamum. The brute extracts of the vegetables were obtained at the Chemistry laboratory of FACID/PI. The bacterial strains were maintained in successive shimes with eosin methylene blue agar culture until used in experiments. The susceptibility tests were realized using the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii*, following the diffusion techniques in agar. The chemical fragmentation of brute extracts was realized with the utilization of the solvents Hexane, Butanol and ethyl acetate. The extracts also were used in serial dilutions, 1/10, 1/100 and 1/1000. In the analysis of results it was evidenced that the extract of Quebra pedra and Chanana showed antimicrobial activity to the four strains. The Chanana extract showed higher activity against *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli*, while the Pimenta de macaco to *K. pneumoniae*, *E. coli* and *A. baumannii* and don't against *P. aeruginosa*. The Barbatimão brute extract wasn't efetive against *A. baumannii*. This extract, after its cracking with Hexane, there was obtained the best zone of inhibition against *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli* with relation to the use of diluted extracts, the 1/10 of Barbatimão and Chanana was the best inhibition of the *P. aeruginosa* growth. Therefore, with base in the obtained results, it was evidenced that the Chanana extracts, Quebra pedra and Barbatimão, showed antibacteriano potencial of *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *A. baumannii*. And the Pimenta de macaco and Barbatimão didn't show inhibitory activity against *P. aeruginosa* and *A. baumannii* respectively. In relation to the quimical cracking of brute extracts, Barbatimão showed the best yeld, when cracked with hexane, that apparently isolated compounds with antibacteriana activity against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, however, didn't have action of *A. baumannii*. The serial dilution 1/10 of Barbatimão showed the best action spectrum of the tested microorganisms, mainly of *P. aeruginosa*.

Key words: Vegetables extracts, microorganisms, susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de hidrólise de antibiótico betalactâmico por ESBL.....	18
Figura 2 - Mecanismos básicos de resistência a antimicrobianos.....	20
Figura 3 - Procedimentos de repiques para novos crescimentos bacterianos em meio de cultura EMB.	38
Figura 4 - Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.	41
Figura 5 - Perfis dos halos de suscetibilidade de <i>K. pneumoniae</i> em relação aos extratos de vegetais testados: <i>Piper aduncum</i> L. (Pimenta de macaco) (A), <i>Phyllanthus niruri</i> L. (Quebra – pedra) (B) e <i>Turnera subulata</i> Sm. (Chanana) (C).....	50
Figura 6 - Perfis dos halos de suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i> em relação aos extratos de vegetais testados: <i>Piper aduncum</i> L. (Pimenta de macaco) (A), <i>Phyllanthus niruri</i> L. (Quebra – pedra) (B) e <i>Turnera subulata</i> Sm. (Chanana) (C).....	50
Figura 7 - Perfis dos halos de suscetibilidade de <i>E. coli</i> em relação aos extratos de vegetais testados: <i>Piper aduncum</i> L. (Pimenta de macaco) (A), <i>Phyllanthus niruri</i> L. (Quebra – pedra) (B) e <i>Turnera subulata</i> Sm. (Chanana) (C).	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies vegetais utilizadas na pesquisa definidos pelo nome científico, nome popular e órgão utilizado para realizar os testes.....	36
Tabela 2 - Demonstração da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais em relação aos micro-organismos utilizados na pesquisa.	45
Tabela 3 - Comparação entre as medianas da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais em relação aos micro-organismos utilizados na pesquisa de extratos.....	46
Tabela 4 - Comparação entre as medianas a posteriori da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais em relação aos micro-organismos utilizados na pesquisa de extratos.	47
Tabela 5 - Perfil de suscetibilidade dos micro-organismos em relação aos extratos dos vegetais fracionados quimicamente.....	52
Tabela 6 - Diluições seriadas dos extratos vegetais em relação aos micro-organismos utilizados.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO - Dimetil Sulfóxido

EMB - Agar Eosina - Azul de Metileno

MH - Muller Hinton

µg: Micrograma

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

FDA - Food and Drug Administration

ESBL - Beta-lactamase de Espectro Estendido

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

E. coli - *Escherichia coli*

A. baumannii - *Acinetobacter baumannii*

K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Alternativas terapêuticas à resistência bacteriana	12
1.2 Antibióticos β -lactâmicos	16
1.3 Resistência bacteriana	17
1.4 Bactérias produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado	21
2 PLANTAS MEDICINAIS E SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	24
2.1 Barbatimão (<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart. Coville)	24
2.1.1 A Família <i>Leguminosae-Fabaceae</i>	24
2.2 Quebra Pedra (<i>Phyllanthus niruri</i> L.)	25
2.2.1 A Família <i>Phyllanthaceae</i>	25
2.3 Chanana (<i>Turnera subulata</i> Sm.)	26
2.3.1 A Família <i>Turneraceae</i>	26
2.4 Pimenta-de-macaco (<i>Piper aduncum</i> L.)	27
2.4.1 A Família <i>Piperaceae</i>	27
3 ESPÉCIES BACTERIANAS	29
3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
3.2 <i>Acinetobacter baumannii</i>	30
3.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
3.4 <i>Escherichia coli</i>	33
5 OBJETIVOS	35
5.1 Geral	35
5.2 Específicos	35
6 MATERIAL E MÉTODOS	36
6.1 Campo de estudo	36
6.2 Coleta dos espécimes vegetais	36
6.3 Preparo e identificação do vegetal	37
6.4 Obtenção dos extratos	37
6.5 Amostras Microbianas	37
6.5.1 Manutenção das cepas bacterianas	37
6.6 Preparo dos meios de cultura para os testes de suscetibilidade	38
6.7 Preparo do inóculo bacteriano	39
6.8 Preparo das placas para a realização dos testes de suscetibilidade	39

6.9 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais pelo método de difusão em ágar	39
6.10 Fracionamento químico dos extratos vegetais.....	40
6.11 Determinação da atividade antimicrobiana em função da concentração dos extratos em diluições seriadas	42
6.12 Análises Estatísticas	42
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
8 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alternativas terapêuticas à resistência bacteriana

A utilização de plantas na terapêutica é muito antigo, e está intimamente relacionado com a própria evolução do homem. Para serem utilizados como medicamentos, os homens antigos usavam de suas próprias experiências e da observação do uso destas pelos animais (OLIVEIRA, 2006). Partes da planta como raiz, caule, folha podem fornecer substâncias ativas que serão empregadas na obtenção de um medicamento (ROSA et al., 2012).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) classifica como sendo fitoterápicos, os medicamentos obtidos a partir de vegetais. A fitoterapia sobreviveu no Brasil devido às raízes profundas na consciência popular que reconheceu sua eficácia e legitimidade. A utilização de produtos oriundos dos vegetais como forma terapêutica é regulamentada pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 17, de 24 de fevereiro de 2000 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos (MARANHÃO, 2011).

O Ministério do Meio Ambiente, diz que o Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade, abrigando cerca de 22% da flora mundial (BRASIL, 2013), portando de uma infinidade de substâncias biologicamente ativas que podem ser obtidas dos vegetais, assim, despertando um vasto interesse da indústria farmacêutica, a setores da agricultura, horticultura, cosméticos, alimentos e bebidas (FERRARI, 2013).

Segundo Arnous et al. (2005) a procura pelos medicamentos fitoterápicos vem aumentando, pois a população acredita nos benefícios do tratamento natural. Por serem de baixo custo e de fácil acesso, ao contrário do que ocorre com outros medicamentos, as pessoas veem na fitoterapia um método de cura e prevenção mais acessível. Apesar dessa grande procura por esses produtos, são necessários estudos que comprovem a eficácia dos fitoterápicos, assim, evitando que danos à saúde das pessoas possam acontecer (REZENDE; COCCO, 2002).

As plantas podem contribuir na descoberta de novos antibióticos, pois é possível que produtos naturais antimicrobianos possam ser biossintetizados para prevenir ou combater o ataque de micro-organismos patogênicos às plantas. Produtos naturais vegetais também têm sido apontados como inibidores de bombas de efluxo, conhecidas como “bombas de resistência a múltiplos fármacos”, um novo alvo na busca de antibióticos (GUIMARÃES, et al., 2010).

Mesmo a indústria farmacêutica produzindo uma variedade de antibióticos nos últimos tempos; tem sido observado um aumento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado, propiciando a busca por novas fontes de substâncias, com atividades antimicrobianas (RIBEIRO, 2008).

A indústria farmacêutica está produzindo novos antibióticos e modificando alguns já existentes, devido à crescente resistência adquirida pelos micro-organismos patogênicos. A presença da resistência bacteriana, principalmente entre patógenos potencialmente perigosos, tem levado a um aumento na necessidade de novos fármacos e novas classes de antibióticos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade (BRITO; CORDEIRO, 2012). De acordo com Padilha et al. (2010) devido à essa resistência aos antimicrobianos é de fundamental importância a pesquisa por novos agentes antimicrobianos; nesse contexto, tem ocorrido um crescente interesse em avaliar a atividade antimicrobiana de plantas.

Diversas razões justificam a necessidade urgente pela descoberta por novos agentes antibióticos: doenças infecciosas como causa principal de mortalidade do mundo; altas taxas de resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*); a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso (PAYNE, et al. 2011; LUZHETSKYY, A. et al, 2007).

As vantagens quanto ao uso de antimicrobianos fitoterápicos, são diversificadas, como redução dos efeitos colaterais, menos rejeição pelo paciente, baixo custo, uso popular e de fácil acesso por estar disponível na natureza (GUR et al., 2006; PAREKH e CHANDA, 2007). Enquanto que as drogas antimicrobianas sintetizadas apresentam muitas desvantagens (CHANDA, RAKHOLIYA 2011; HABBAL et al. 2011). Vários trabalhos têm comprovado que os extratos de plantas *in vitro* possuem atividade antimicrobiana (DUARTE, 2006). Com uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de microrganismos, os antibióticos vegetais podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura das membranas (PINHO et al., 2011).

Acredita-se que o uso de produtos naturais não apresente riscos à saúde, porém ao contrário do que se pensa os produtos naturais podem apresentar vários agravos à saúde incluindo reações alérgicas, tóxicas, interações medicamentosas e efeitos mutagênicos. Diversos grupos de plantas possuem substâncias bioativas de interesse farmacológico. No Brasil, e em outros países, vários estudos têm sido realizados com o intuito de estabelecer a

atividade, esclarecer mecanismos de ação, ou mesmo, identificar componentes ativos e investigar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes espécies vegetais (BELCAVELLO, 2012).

Considerando o elevado tempo e custos empregados para o desenvolvimento de novos produtos, técnicas corretas que direcionam a seleção das plantas em potencial para a reprodução dos efeitos desejados, são imprescindíveis. Existem quatro tipos de estratégias para a escolha das espécies a serem estudadas, sendo elas: randômica, etológica, quimiotaxonômica e etnobotânica (SANT'ANA, 2002; ALBUQUERQUE, HANAZAKI, 2006).

A estratégia randômica compreende a pesquisa por plantas que contenham princípios ativos de interesse através de buscas ao acaso, sem critérios específicos. A estratégia etológica é baseada em estudos de comportamento animal, tendo como objetivo, analisar a utilização de metabólitos especializados vegetais, por animais, com a finalidade de combater doenças ou controlá-las. A estratégia quimiotaxonômica baseia-se na seleção de espécies de uma família ou gênero que já se tenha um conhecimento sobre o perfil fitoquímico de pelo menos uma espécie do grupo. E por último, a estratégia etnobotânica, que se baseia na seleção de espécies de acordo com os conhecimentos populares de uma comunidade local a respeito dos seus efeitos terapêuticos e toxicológicos (FERRARI, 2013).

Antibióticos naturais geralmente apresentam estruturas químicas complexas importantes para as interações específicas e reconhecimento por alvos macromoleculares em bactérias patogênicas. Neste contexto, nos últimos 10 anos os pesquisadores têm voltado atenção para fontes naturais ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos de novos ecossistemas podem ser possuidores de novas diversidades químicas que poderão ser utilizadas na neutralização de micro-organismos. Uma ampla diversidade de organismos tem sido explorada nos mais diversos habitats, especialmente em locais de condições ambientais extremas (WALSH, 2003; GONÇALVES, 2010).

Grande parte da composição química das espécies vegetais de uso medicinal ainda é desconhecida pela ciência, dados afirmam que cerca de 99% das plantas medicinais endêmicas do Brasil ainda não têm seus princípios ativos identificados, o que representa um grande potencial farmacológico e econômico a ser explorado, tornando-se imprescindível a avaliação destas para determinar suas potencialidades químicas. Ressaltando em especial os espécimes da região amazônica, onde a grande maioria não foram estudadas do ponto de vista químico e outras ainda nem foram catalogadas pela ciência (FÃO, et al, 2012).

Novas estratégias de pesquisa em produtos naturais têm sido realizadas, envolvendo a busca de substâncias oriundas de micro-organismos, a utilização de ferramentas genômicas,

aliada aos novos ensaios biológicos adotados nas triagens, pode acelerar o processo de descoberta de novos antibióticos, extremamente importantes num cenário de rápido desenvolvimento de resistência pelas bactérias aos agentes terapêuticos disponíveis (GUIMARÃES et al., 2010).

Conforme Leão (2007), as plantas sintetizam uma enorme variedade de metabólitos que são geralmente classificados em dois grupos de acordo com as suas funções. Os metabólitos primários que são essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta e os metabólitos secundários, extremamente diversos e variáveis, que desempenham o papel de garantir a sobrevivência da planta em seu habitat natural. Elas também produzem metabólitos secundários que dão origem a compostos como alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos cardiotônicos, terpenos que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (SIMÕES et al., 2004).

A investigação sobre produtos naturais com atividade antimicrobiana tem aumentado significativamente nos últimos anos no nosso país, devido a sua megadiversidade. Apesar dessa biodiversidade de biomas contendo as mais diversas plantas que podem ser utilizadas como fitoterápicos, somente estão disponíveis dados sobre 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, incluindo espécies nativas e exóticas. O baixo número de registros pode ser consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, geralmente apresentados em eventos científicos locais ou regionais. Além disso, a maioria dos estudos são testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseados em informações etnofarmacológicas, diferentemente de pesquisas que abrangem a flora de uma região definida, onde várias famílias botânicas são estudadas (DUARTE, 2006).

A biodiversidade brasileira contém muitas plantas com propriedades antibióticas. Porém, essas espécies sofrem exploração irracional, visto que em sua maioria, para a produção de fitoterápicos, é utilizado o caule e a raiz das plantas, o que pode ser uma séria ameaça às populações (MELO et al., 2008). A exploração sustentável de plantas medicinais incluiria medidas como a exploração de partes naturalmente renováveis como folhas e partes de frutos, que deveriam ser mais amplamente estudados (PINHO et al., 2012).

1.2 Antibióticos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são agentes antibacterianos que inibem irreversivelmente a enzima transpetidase, que catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicano da parede celular bacteriana. Essa enzima leva à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura peptidoglicano, que conferem à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio. Este grupo de antibióticos constitui a primeira classe de derivados do metabolismo fúngico e utilizados no tratamento terapêutico de infecções causadas por bactérias (SUARÉZ, GUDIOL, 2009; WALSH, 2003).

Os antibióticos podem ser naturais ou sintéticos apresentando a capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos responsáveis por promoverem a inibição do crescimento microbiano (WALSH, 2003).

O principal mecanismo de resistência apresentado pelos micro-organismos em relação aos antimicrobianos β -lactâmicos é a produção de enzimas que apresentam grupos nucleofílicos (geralmente, resíduos de serina) capazes de promover a abertura do anel β -lactâmico. Neste caso foi realizada uma modificação molecular nos β -lactâmicos, mediante a introdução de grupamentos volumosos no carbono α ao carbono carbonílico da cadeia lateral em penicilinas semissintéticas (metecilina, oxacilinas), que impedem o acesso da enzima ao princípio ativo do antibiótico (SUARÉZ, GUDIOL, 2009).

Pensando nesta problemática a indústria farmacêutica produz antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos compreendendo estes a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos que abrangem as penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapenina, monobactâmicas, e peptídicos cíclicos representados pelos glicopeptídeos e lipodepsipeptídeos, estreptograminas, entre outros, tais como as lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas dentre outros produtos (GUIMARÃES et al., 2010).

Para cada nova classe de antimicrobiano utilizada, novas β -lactamases emergem, sugerindo que as novas drogas têm selecionado novas variantes de β -lactamases, chegando a cerca de 890 tipos de β -lactamases descritas até o ano de 2010 (MARTINS, 2014).

As bactérias Gram negativas apresentam uma característica marcante, sua complexa parede celular, que determina maior resistência à ação de antibióticos, não permitindo haver cruzamento efetivo nesta barreira lipídica. Para ter acesso à célula bacteriana, os antibióticos β -lactâmicos passam através da parede celular por canais proteicos, as porinas, internalizadas na

estrutura lipídica. Assim, antibióticos com maior atividade frente a bactérias Gram negativas são aqueles que apresentam grupos ionizáveis em suas estruturas químicas (GUIMARÃES et al., 2010).

1.3 Resistência bacteriana

A invasão de bactérias através das barreiras cutânea ou mucosa, alcançando os tecidos corporais, caracteriza uma infecção bacteriana. Embora isso possa ocorrer no organismo, ele é capaz de remover as células invasoras por intermédio do sistema imune, sem manifestar sinais de doença (LULLMANN et al., 2008).

A resistência a drogas por patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica, portanto, assim caracterizando um sério problema, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (DUARTE, 2006).

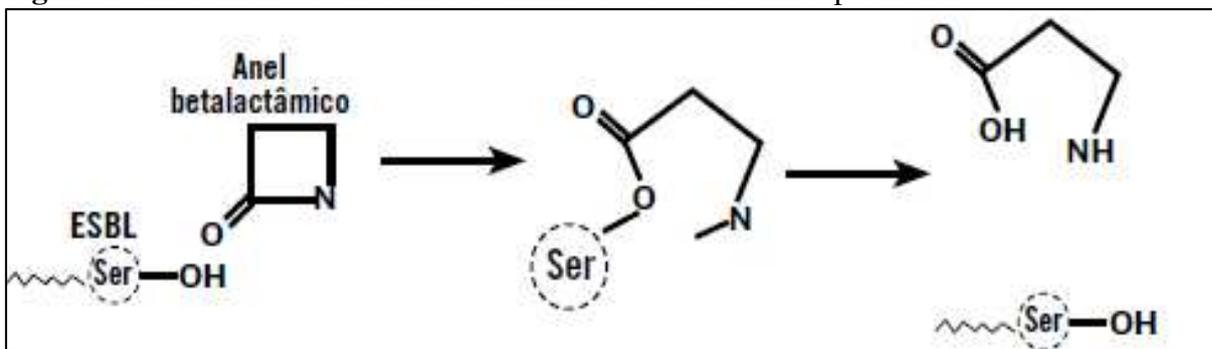
Nascimento (2003) mostra o grande potencial de variabilidade da maioria dos agentes infecciosos e o aparecimento de linhagens de bactérias patogênicas resistentes à ação dos antibióticos. De acordo com Lullmann et al. (2008), certos patógenos desenvolveram estratégias que aumentaram sua capacidade de infectar o organismo humano.

Rang, Dale e Ritter (2001) demonstraram que a resistência a antibióticos é um fenômeno existente desde que o homem fez uso de antibióticos e destacam que paralelamente ao desenvolvimento dos medicamentos, as bactérias desenvolveram defesas contra essas substâncias, com o conseqüente aparecimento de resistência à ação destes agentes.

Quando se fala de resistência bacteriana esta pode ser entendida como mecanismos pelos quais as bactérias se adaptaram contra os efeitos danosos ou mortais aos quais estão sendo expostas (LIVERMORE, 1995). A produção de β -lactamases é considerada um dos primeiros e mais efetivos mecanismos de resistência bacteriana conhecidos, consistindo em enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, inativando o antimicrobiano e impedindo, que ele tenha atividade contra as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular (BUSH, 1988; LIVERMORE, 1995; ROSSOLINI, 2005) (Figura 1). A classe de β -lactâmicos mais utilizada na clínica médica é composta por: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (MURRAY et al., 2004). Antibióticos como as penicilinas e cefalosporinas possuem um anel β -lactâmico em sua estrutura química e as bactérias resistentes a esses antibióticos, em geral, produzem enzimas específicas, as β -lactamases, que são capazes de degradar hidroliticamente esse anel, tornando o fármaco inativo (FISHER, 2005). Finalmente, a modificação dos alvos é provavelmente um dos mecanismos mais específicos de resistência,

ocorrendo assim a modificação bioquímica do alvo de ligação do antibiótico (CAUMO, et al., 2010).

Figura 1 - Mecanismo de hidrólise de antibiótico betalactâmico por ESBL.



Fonte: Adaptado por Livermore (1995).

Em decorrência de tal fato, segundo Wannmacher (2004), a resistência bacteriana é preocupação mundial, sendo objeto das mais recentes publicações sobre antimicrobianos, pois segundo esta, esses fármacos afetam não apenas o usuário do medicamento, mas todo o ecossistema onde ele está inserido, com repercussões potenciais importantes. Hass et al. (2006) menciona que as taxas de morbidade e mortalidade desenvolvidas por infecções causadas por patógenos resistentes são altas e aumentam substancialmente os custos da assistência à saúde, especialmente entre a população mais jovem, idosos e indivíduos imunocomprometidos.

A resistência bacteriana é considerada uma emergência, sendo esta resistência um fenômeno natural e que decorre do contato dos micro-organismos com os antibióticos, onde pode ser verificada que a rápida evolução dessa resistência acontece na proporção da utilização dos medicamentos. Charles Darwin já previu um século antes do aparecimento dos antibióticos, que os organismos adaptam-se para sobreviver e os mais fortes prevalecem. A utilização intensiva exerceu uma pressão seletiva crescente no meio, acelerando o desenvolvimento pelas bactérias de formas de adaptação e resistência aos principais antibióticos, que são transmitidas vertical e horizontalmente (DIAS; MONTEIRO, 2010).

O uso dos antibióticos na clínica médica é um problema complexo e desde há muito tempo é alvo de estratégias, visando o seu emprego adequado e o controle da evolução de estirpes resistentes. A otimização dos padrões de prescrição e a redução da má utilização dos antibióticos são incontornáveis, mas a diversidade dos fatores profissionais, culturais, sociais e econômicos implicados dificulta a implantação dessas medidas, cabendo, no entanto, realizar estudos de base populacional para avaliação dos fatores determinantes e facilitadores da utilização e não utilização dos antibióticos (MARTINS, 2014).

Nascimento (2003) destaca que a resistência aos antibióticos oferece risco de toxicidade ao organismo humano, pelo fato de serem necessárias à administração de altas doses ao indivíduo com a finalidade de neutralizar o agente infeccioso. Outra classe de risco citada pelo autor refere-se às reações de hipersensibilidade atribuídas à idiosincrasia ou à sensibilização do indivíduo ao antibiótico. Segundo Mota et al. (2005), os prejuízos que os antibióticos podem causar à saúde humana incluem efeitos tóxicos diretos, indução de alergias e desenvolvimento de resistência.

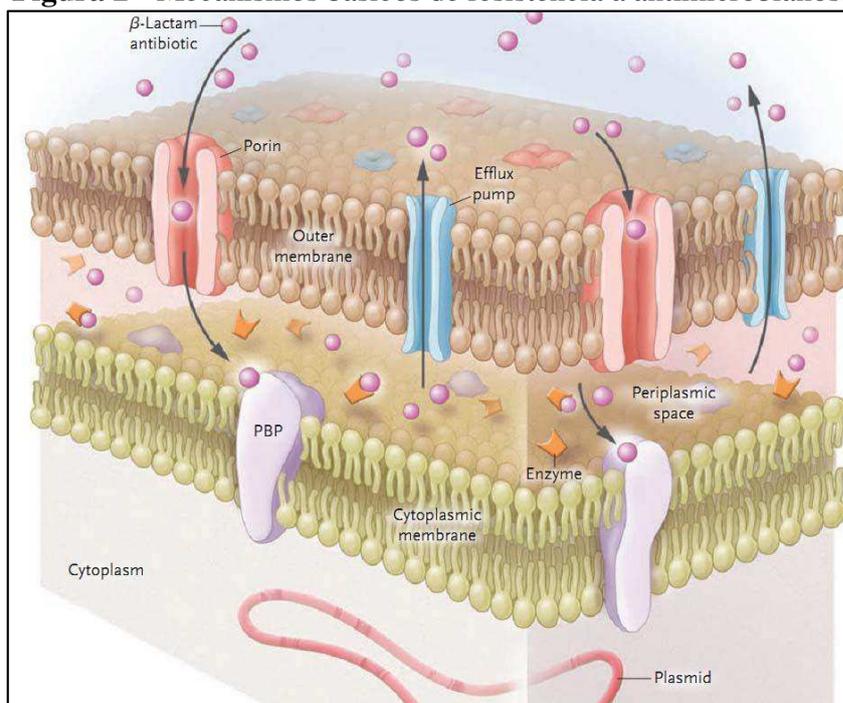
Como consequência desse uso indiscriminado dos antibióticos, a descoberta de novos fármacos com propriedades antibacterianas torna-se cada vez mais relevante, tendo em vista o rápido e devastador aparecimento da resistência aos antibióticos, resultando na falha terapêutica e, conseqüentemente, as limitações nas opções de tratamento. O ambiente hospitalar apresenta alta resistência bacteriana com aparecimento de surtos de micro-organismos multirresistentes, onde são isoladas inúmeras amostras clínicas resistentes às mais diversas classes de antibióticos. Vários estudos têm demonstrado que o próprio ambiente hospitalar funciona como um grande reservatório de genes de resistência (DANTAS, 2008).

É notável que o perfil da resistência bacteriana aos antibióticos é variável entre as diversas regiões do globo. Por todo o mundo, existem redes de vigilância epidemiológica, que reúnem dados referentes a padrões de susceptibilidade microbiana, sua variação regional e temporal, de forma a orientar as recomendações terapêuticas e a decisão na prática clínica (DIAS; MONTEIRO, 2010).

Existem vários mecanismos pelos quais as bactérias desenvolvem resistência aos antibióticos, dentre os quais podemos citar as bombas de efluxo, a inativação enzimática e a perda de porinas na membrana plasmática (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Uma rede integrada de elementos de resistência nas bactérias promove proteção contra agentes químicos. Em bactérias gram-negativas existe um envelope celular, que está incluída uma membrana celular externa à parede celular, que é composta por uma bicamada de lipopolissacarídeo-fosfolipídica assimétrica e promove uma barreira física efetiva para a entrada de moléculas no interior da célula bacteriana. Em bactérias Gram-positivas, a ausência da membrana externa resulta num acréscimo da sensibilidade a muitos antibióticos (CAUMO et al., 2010).

Os mecanismos enzimáticos (β - lactamases), ocasionados pela ação de enzimas tais como as cefalosporinases, representam alguns dos mecanismos de resistência a diferentes antimicrobianos, como mostra abaixo descrito (Figura 2) (LIVERMORE, WOODFORD 2000; RODRIGUES-MARTINEZ et al., 2010).

Figura 2 - Mecanismos básicos de resistência a antimicrobianos.



Fonte: (Adaptado de Munoz-Price & Weinstein, N Engl J Med 2008).

Associado a essa resistência bacteriana está o seu genoma, ao ser feito o sequenciamento deste, foi revelado que um grande número de genes de resistência se encontra em quase todas as bactérias. Por exemplo, genes que codificam proteínas de efluxo são comuns a todos os genomas bacterianos. Patógenos oportunistas, como a *Pseudomonas aeruginosa*, normalmente encontrada em vários locais apresenta uma coleção de bombas de efluxo (PIDDOCK, 2006), essas bombas provavelmente são as responsáveis por permitirem ao micro-organismo uma maior flexibilidade para explorar diversos ambientes e promover sua patogenicidade, além de modular sua diferenciação celular, como a formação de biofilmes. Biofilmes constituem-se em um modo de vida de micro-organismos que se aderem a uma superfície tais como cateteres e próteses, e produzem uma matriz que os mantém aderidos, dificultando imensamente a erradicação desses micro-organismos com a antibioticoterapia usual (CAUMO et al., 2010).

Caumo et al. (2010) demonstraram que de fato genes (resistoma) encontrados em algumas cepas bacterianas são responsáveis pela resistência que elas apresentam em relação aos antimicrobianos. Uma vez que as bactérias apresentam habilidades em mobilizar genes e a pressão seletiva por causa dos antibióticos facilita a distribuição desses genes de resistência através das populações microbianas. Como resultado, ocorre a expansão do resistoma mesmo na ausência de seleção contínua das espécies mais resistentes. Sendo assim, o cuidado

permanente com o meio ambiente é passo fundamental no processo de seleção de clones multirresistentes que podem chegar mais facilmente ao ambiente hospitalar. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos em terapias empíricas contribui drasticamente para o aumento da resistência devendo ser evitado pela população.

1.4 Bactérias produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado

No ano de 1940 foi descrita a primeira β -lactamase por Abraham e Chain antes mesmo do uso da penicilina para o tratamento de infecções bacterianas (BUSH, 1989). Desde então, inúmeras β -lactamases foram identificadas e vários esquemas de classificação foram propostos para agrupar estas enzimas de acordo com suas características bioquímicas e pela análise de suas estruturas moleculares (BUSH, 1989, 2001; LIVERMORE, 1995). As β -lactamases foram divididas de acordo com suas estruturas primárias em quatro classes (A a D), segundo Ambler (1990). De acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, estas classes ainda podem ser denominadas dentro de dois grupos: serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B) (AMBLER, 1990; BUSH, 1995; ROSSOLINI, 2005). No ano de 1983, uma nova classe de enzimas foi denominada de Beta-lactamase de Espectro Estendido (ESBL) sendo detectada inicialmente em cepas de *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* na Alemanha (KNOTHE et al., 1983), mas somente em 1985-87 ocorreu na França a primeira grande eclosão entre os primeiros isolamentos de enterobactérias produtoras de ESBL (LIVERMORE, 1995; SIROT et al., 1987; PETIT et al., 1990).

As betalactamases hidrolisam o anel betalactâmico de antimicrobianos, assim, constituindo-se um dos mecanismos de resistência mais importante. Os dois grupos mais preocupantes são o grupo das betalactamases de espectro ampliado e os da carbapenemases, que além de hidrolizar os carbapenêmicos, hidrolizam todas as outras classes de betalactâmicos. A ação hidrolítica destas enzimas é bloqueada pelos inibidores de betalactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (SOUSA JÚNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

Um dos principais problemas causados por estas enzimas é decorrente do fato de sua produção ser induzida durante a terapêutica antimicrobiana. Dessa maneira, quando a amostra bacteriana é detectada pelo laboratório de microbiologia, ela é aparentemente sensível às cefalosporinas de terceira geração e penicilinas de amplo espectro, porém, durante o tratamento pode ocorrer indução da produção de grandes quantidades de enzimas e o paciente começar a evoluir mal, ocorrendo recidiva da infecção. Uma nova amostra da bactéria é isolada e esta poderá se mostrar resistente a um antimicrobiano utilizado para o tratamento para o qual a

bactéria era inicialmente sensível, podendo até ser interpretado como erro laboratorial quando da avaliação da primeira amostra (SILVA; SALVINO, 2000).

É de suma importância avaliar a frequência de bactérias produtoras de ESBL para que se possa estabelecer como rotina no laboratório de microbiologia clínica a inclusão dos antibióticos nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos que auxiliam em tal identificação como ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, cefpodoxima, aztreonam, tobramicina, ciprofloxacina e os discos que possuem os inibidores associados como amoxicilina/ácido clavulânico, sulbactam/ampicilina ou ticarcilina/ ácido clavulânico (SOUSA JÚNIOR; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2004).

A ocorrência de carbapenemases é mais frequentemente em bactérias Gram negativas fermentadoras da glicose, conhecidas como enterobactérias, predominantes nos gêneros *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Morganella*. Podem ser encontradas também em bactérias Gram negativas não fermentadoras, como espécies de *Acinetobacter*, e de *Pseudomonas* (ALVES et al., 2013).

As ESBL representam um sério problema na clínica hospitalar. Elas são codificadas por plasmídeos, conferindo resistência e facilidade de transferência, por conjugação, entre diferentes espécies bacterianas. Entretanto, estes plasmídeos podem conter genes de resistência a outros tipos de antimicrobianos, diferentes dos β -lactâmicos (SILVA, 2000).

Com a introdução dos primeiros antimicrobianos, a resistência bacteriana vem aumentando amplamente nos últimos anos no Brasil e no mundo, gerando a necessidade crescente do conhecimento do perfil de suscetibilidade de bactérias que mais frequentemente causam infecções nos seres humanos e como elas disseminam essa resistência (TOSIN, 2001).

Segundo Murray et al. (1995) os betalactâmicos são os antimicrobianos mais usadas na clínica médica, contra as bactérias produtoras desta enzima, tendo como representantes as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.

As enzimas pertencentes ao grupo das ESBLs são mais frequentemente produzidas por cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli*, porém podem ser encontradas, com menor prevalência, nas espécies de Enterobactérias como *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Salmonella* spp. e *Serratia marcescens* (THOMSON, 1997; VERCAUTEREN et. al., 1997).

Para Sader e Jones (2005) é necessária de maneira imediata a busca por métodos alternativos para tentar amenizar o desenvolvimento da resistência bacteriana, o que se deve em grande parte à utilização de antimicrobianos de maneira inadequada.

Determinados tipos de bactérias são consideradas como as grandes causadoras de infecções hospitalares e acabaram ganhando grande importância para a Organização Mundial de Saúde, visto que o tratamento de patologias causadas por estes micro-organismos está cada vez mais difícil, devido ao aparecimento de resistência aos fármacos de última geração. As bactérias *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* sp., *Acinetobacter* sp. e *Enterococcus faecalis* são responsáveis por apresentarem alto grau de resistência aos grupos de antibióticos (PORFÍRIO et al., 2009).

Mendes et al. (2005) comenta que na década de 1980 foram relatados casos de falência terapêutica em pacientes que fizeram uso de cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) ou monobactâmicos (aztreonam) que eram portadores de infecções por enterobactérias (*E. coli* e/ou *K. pneumoniae*) sensíveis a esses betalactâmicos pelos critérios estabelecidos pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). Constatou-se a produção por essas bactérias de uma betalactamase, posteriormente denominada ESBL, conferindo resistência variada entre esses betalactâmicos, permitindo sua propagação entre os seres humanos.

As bactérias Gram negativas são consideradas em sua maioria causadoras das infecções nosocomiais, no entanto as que produzem betalactamase conferem a estas o seu principal mecanismo de combate aos antimicrobianos betalactâmicos (NOGUEIRA, 2006).

Pesquisas relevam que as bactérias Gram-negativas mais relacionadas às infecções hospitalares são: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Enterobacter* spp (GALES et al., 2012; GIRÃO et al., 2008; KIFFER et al., 2005; LINCOPAN et al., 2005; 2006; PAVEZ et al., 2009; ROSSI, 2011; SADER et al., 2001; THEURETZBACHER, 2012).

Nos quadros sépticos por bactérias Gram negativas de origem intra-hospitalar, que são de difícil tratamento e terapêutica limitada, observam-se, muitas vezes, hemoculturas positivas para cepas multirresistentes associadas à produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) (BLOMBERG et al., 2005).

No final da década de 1980, houve um aumento na incidência das bactérias Gram negativas produtoras de ESBL nas unidades de cuidados intensivos neonatal, especialmente em países em desenvolvimento (BRADFORD, 2001), possivelmente relacionado à maior utilização das cefalosporinas de terceira e quarta gerações, à necessidade frequente de procedimentos invasivos e à não adoção de medidas específicas de controle de infecção hospitalar (BLOMBERG, 2005).

2 PLANTAS MEDICINAIS E SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

2.1 Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart. Coville)

2.1.1 A Família *Leguminosae-Fabaceae*

Pertencente à ordem Fabales, sendo representada por árvores, arbustos e ervas, é uma das maiores e mais importantes famílias botânicas, podendo ser usado como produtos alimentares, medicinais, ornamentais, madeireiros, dentre outros. A família Leguminosae/Fabaceae Lindl. Benth, Sub-Família Mimosoideae Benth, compreende cerca de 80 gêneros com aproximadamente 3300 espécies, muitas delas de grande importância medicinal, distribuídos por regiões temperadas e tropicais (SCALON, 2007; MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2009).

Essa espécie é descrita por Lorenzi (1992) como uma árvore de dois a seis metros de altura de tronco, uma planta decídua, pioneira e seletiva, xerófita e endêmica do Cerrado. É uma espécie perenifólia, com pico de floração, produção de folhas novas e queda de folhas entre julho e outubro. Floresce em meados de setembro, prolongando-se até final de novembro. Seus frutos requerem um longo período de maturação, cerca de um ano, alcançando a maturidade na época seca do ano seguinte à produção da flor, entre julho e setembro.

O nome *Stryphnodendron* vem do grego e significa madeira dura (stryphnos = duro e dendron = madeira). As denominações do barbatimão, ybátimo ou uabatimão, etimologicamente tem origem indígena e significam adstringentes (MELO, 1998).

A decocção das cascas de *Stryphnodendron adstringens* é amplamente usada na maioria das regiões do Brasil contra leucorreia, hemorragias, diarreia, hemorroidas, na limpeza de ferimentos e em gotas no tratamento da conjuntivite (NUNES et al., 2003; MACEDO; FERREIRA et al., 2004). A presença de taninos na casca desta planta faz com ela apresente estas atividades (LORENZI, 2000; LORENZI; MATOS, 2002; SANTOS et al., 2006). De acordo com Toledo (2002) o extrato que é obtido das cascas de *S. adstringens* demonstra atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Na casca do barbatimão contém 20% de taninos, segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), além desta, existem outras substâncias químicas como alcaloides, flavonoides, terpenos, estilbenos, esteroides e inibidores de tripsina e de proteases (VASCONCELOS, et al. 2004).

Taninos são os componentes majoritários do barbatimão, sendo que estes compostos têm sido associados com efeitos antimicrobianos. Os taninos vegetais são classificados em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis dividem-se em galotaninos e elagitaninos, que produzem, respectivamente, ácido gálico e ácido elágico após hidrólise (SOARES et al., 2008).

O extrato da casca de barbatimão possui grande potencial antimicrobiano frente a infecções intra abdominais, infecções de faringe, úlceras de decúbito, infecções intestinais e conjuntivites. Em cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de secreções de feridas crônicas de pacientes ambulatoriais, o extrato de barbatimão apresentou efeito bactericida inibindo o crescimento deste micro-organismo. O poder do extrato de barbatimão em combater micro-organismos patogênicos já vem sendo estudado e comprovado por diversas pesquisas (JESUS, 2015).

2.2 Quebra Pedra (*Phyllanthus niruri L.*)

2.2.1 A Família *Phyllanthaceae*

A *Phyllanthus niruri L.* pertencente à família *Phyllanthaceae* popularmente conhecido por quebra-pedra, entretanto, dependendo da região, pode ter denominações diferentes como: arranca-pedras; arrebenta-pedras; erva-pomba; erva-pombinha; fura-parede; quebra-pedra-branco; quebra-panela; saúde-da-mulher; saudade-da-mulher e saxífraga. (TESKE, 2001).

O *P. niruri L.*, vulgarmente denominado por quebra-pedra é uma planta de pequeno porte, medindo em média 15 a 59 cm de altura. Caracterizada como erva monoica, com caule cilíndrico liso, possui ramos muito finos, decíduos e avermelhados. Ao invés de folhas, possuem catafilos espiralados no eixo caulinar com 2-3 mm de comprimentos, finos e densos. Nos ramos, as folhas são simples, alternadas e pecioladas, encontrando-se em lados opostos (LORENZI, MATOS, 2002).

Estão presentes nas regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo em quase todo o território nacional podendo ser facilmente encontrada em frestas e rachaduras de muros e calçadas, esse fácil acesso permite que essa planta seja bem consumida pela população (GARCIA, 2004).

A *P. niruri L.* tem sido amplamente utilizada na medicina popular, principalmente sob a forma de extrato aquoso (chá), que pode ser obtido utilizando-se as partes aéreas ou toda a

planta, incluindo as raízes, com fins de tratamento de cálculos renais, infecções intestinais e urinárias, diabetes e hepatite (LIONÇO et al., 2001).

Cruces et.al (2013), citando Murugaiyah e Chan (2009), investigaram o efeito antihiperuricêmico da *P. niruri* L.; sobre a inibição da xantina, observando que o extrato metanólico desta planta inibiu moderadamente a xantina oxidase, apresentando concentração inibitória (39,39 µg/mL). Em decorrência destes e outros estudos clínicos fica comprovada a atividade terapêutica da *P. niruri* L. em afecções do aparelho geniturinário e também se ressalta que foram comprovadas suas ações antivirais na Hepatite B.

Em estudo realizado por Nascimento et al. (2008) com três espécies de *Phyllanthus* (*P. niruri*, *P. amarus* e *P. tenellus*), foi encontrado a presença de antraquinonas, flavonoides, taninos e terpenoides, e ausência de antocianinas e cumarinas nas três espécies. Já foram isolados compostos fenólicos das raízes como ácido gálico, (-) -epicatequina, (+) - galocatequina, (-)-epigalocatequina, (-)-epicatequina-3-*O*-galate e (-)-epigalocatequina- 3-*O*-galate. Das folhas e caule taninos hidrolisáveis como geranina, corilagina e galoilglicose. Ainda a presença de princípios amargos, ácido ricinoléico e os extratos aquosos mostraram efeito hipoglicemiante (AITA et al., 2009).

2.3 Chanana (*Turnera subulata* Sm.)

2.3.1 A Família *Turneraceae*

A família Turneraceae possui 10 gêneros e cerca de 190 espécies com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo como principal centro de diversidade a América Tropical (ARBO, 2004). Stevens (2005), afirma que Turneraceae juntamente com Meleshebiaceae estão fortemente associadas à Passifloraceae, famílias com a qual compartilham vários caracteres, dentre os quais se destacam: presença de glândulas foliares, coleteres, arilo e endosperma persistente, formando assim um grupo parafilético em Malpighiales.

Espécies de *Turnera* L. são reconhecidas pelo hábito herbáceo a arbustivo, folhas simples, com ou sem estípulas, margem serreada e raro inteira, frequentemente providas de glândulas nectaríferas e tricomas (ARBO, 2000, 2005; GONZÁLEZ; ARBO, 2005).

Engloba doze gêneros e cerca de 220 espécies, distribuídas nas Américas e África, em Madagascar e Ilhas Mascarenhas (ARBO 2007, 2009; THULIN et al., 2012).

Algumas espécies de *Turnera* têm revelado várias atividades biológicas, dentre as quais se destacam as atividades: antimutagênica (WALL et al., 1988), antihiperlipidêmica (ALARCON-AGUILERA et al., 1998), afrodisíaca (ARLETTI et al., 1999), antiulcerativa (GRACIOSO et al., 2000), hipotensiva (VIEIRA et al., 1968), e anti-inflamatória (ANTONIO; 1998). A *T. subulata* Sm. é utilizada na forma de chá, contra amenorreia (AGRA et al., 2007; MORAIS et al., 2005).

Os constituintes químicos presentes na raiz da Chanana são saponinas, flavonoides, taninos, polifenóis, carboidratos, esteroides e terpenoides, gomas e mucilagens e possui característica adstringente, ácido tânico, cafeína, damianina, óleo essencial, pepsina, princípios amargos e resinas (SILVA et al., 2015).

A prospecção fitoquímica feita em *Turnera ulmifolia* realizada por adição de reagentes específicos revelou algumas classes de metabólitos secundários como: taninos pirogálicos, flavonoides e catequinas. Para a atividade antioxidante (RODRIGUES et al., 2014).

Este gênero é caracterizado pela sua composição abranger terpenóides, como mono e sesquiterpenos, flavonoides, esteroides, benzenóides, alcalóides e lipídios (BARBOSA et al., 2007).

2.4 Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.)

2.4.1 A Família *Piperaceae*

Piperaceae possui cerca de 2515 espécies, distribuídas em oito gêneros (MACHADO, 2007). Compreende ervas, arbustos e arvoretas, frequentemente epífitas ou lianas. O caule é nodoso, as folhas são alternas, simples, com margem inteira, pecioladas, com ou sem estípulas (GUIMARÃES, VALENTE 2001; SOUZA, LORENZI 2005). Espécies dessa família encontram-se distribuídas por toda a América. No Brasil ocorrem cinco gêneros e cerca de 500 espécies, encontradas principalmente na Mata Atlântica (SOUZA, LORENZI, 2005).

Essa espécie é um arbusto medindo aproximadamente de 2 a 2,5 m de altura, com folhas de bainha alada; pecíolo de 0,5 a 1 cm de comprimento (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004). Segundo Guimarães e Giordano (2004), essa planta está distribuída pelo Continente Americano e Antilhas. No Brasil, ocorre naturalmente nos estados do Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso.

Extratos orgânicos das folhas de *P. aduncum* apresentam atividades moluscicida, citotóxica e antibacteriana, para as quais se associou a presença de dihidrochalconas e derivados prenilados do ácido benzoico (ORJALA et al., 1993, 1994).

O pó das folhas frescas é aplicado diretamente em feridas. No Peru, a decocção das folhas é usada para o tratamento de diarreias (FERREIRA, 2011).

A fitoquímica do gênero *Piper* lista 600 constituintes químicos, pertencentes a diferentes classes de componentes bioativos, como alcaloides, amidas e propenilfenóis, dentre outros (FAZOLIN et al., 2006).

3 ESPÉCIES BACTERIANAS

3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Este micro-organismo pertence à família *Pseudomonadaceae* (PALLERONI et al., 1973), caracteriza-se como bastonete Gram negativo reto ou ligeiramente curvo, aeróbio estrito, podendo ser observado como células isoladas, aos pares, ou em cadeias curtas, revelando mobilidade através de flagelo polar monotríqueo (FERREIRA, 2005).

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo aeróbio, isolado de solo, água, plantas e animais, incluindo o homem (KONEMAN et al., 2001). É uma das espécies bacterianas não fermentadora de lactose, mais prevalente em espécimes clínicas de pacientes hospitalizados (TSAKRIS et al 2000; KARLOWSKY et al 2005), sendo a principal causadora de pneumonia nosocomial em hospitais brasileiros (SADER et al., 2001; TORRES et al., 2004).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria altamente oportunista, invasiva, toxigênica, capaz de causar infecções em pacientes com defesas orgânicas comprometidas e apresenta fatores de virulência capazes de inativar o sistema imune e a ação de muitos antibióticos (KONEMAN, 2001). Infecções causadas por *P. aeruginosa* são particularmente problemáticas devido à resistência intrínseca que elas desenvolvem para múltiplas classes de antibióticos e sua habilidade em adquirir resistência adaptável durante um curso terapêutico (KOLLEF, 2005). O surgimento de *P. aeruginosa* multirresistente à drogas tem sido considerado um problema em ascensão em hospitais em todo o mundo (BRATU et al., 2005; GALLES et al., 2001).

A *P. aeruginosa* produz biofilme, este é uma associação de bactérias em uma matriz polímera de polissacarídeos, DNA extracelular e proteínas. Seu biofilme permite o estabelecimento de comunicação entre bactérias para a coordenação de atividade metabólicas, produção de fatores de virulência, protege contra o sistema de defesa do hospedeiro, dificulta a difusão de antibióticos, além de permitir a troca de material genético (LINCOPAN, TRABULSI, 2015).

Para Hauser e Ozer (2011) as principais doenças clínicas relacionadas à *P. aeruginosa* são: infecções oculares, otológicas, respiratórias, do trato urinário, sanguíneas e de pele e tecidos moles (incluindo as feridas de pacientes com queimaduras).

O tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, é dificultado por sua resistência intrínseca a muito antibióticos e, tem-se especulado que parte desta resistência seja devido à estrutura da sua parede celular, juntamente com a formação de biofilme, que oferece proteção

contra o sistema imune e, a falta de eliminação da secreção espessa por pacientes com fibrose cística (TURANO, 2012).

3.2 *Acinetobacter baumannii*

O gênero *Acinetobacter* é um bacilo Gram negativo, estritamente aeróbio, ubiqüitário, não fermentador, imóvel, catalase positiva e oxidase negativa. Ao longo dos últimos 30 anos o *Acinetobacter* spp. sofreu modificação taxonômica significativa. Atualmente, o gênero *Acinetobacter* é membro da família Moraxellaceae e da ordem Pseudomonadales. Apesar de estarem identificadas cerca de 31 espécies genômicas, apenas a 17 foi atribuído nome, devido à difícil diferenciação (GODOY, 2012).

A complexa identificação das várias espécies do gênero *Acinetobacter*, se deve ao fato das características serem semelhantes. A distinção entre espécies é realizada, através de métodos de suscetibilidade aos antibióticos padrões, fenotipagem e biotipagem, cuja complexidade e morosidade de alguns, os torna impraticável por rotina, nos laboratórios de microbiologia clínica (COELHO, 2012).

O habitat do *A. baumannii* não é típico das outras espécies do *Acinetobacter*, havendo pouca evidência, que este seja residente no solo, segundo referência de Torres, Vázquez, Yagüe, e Gómez (2010). Com escassa presença no ambiente e prevalência sazonal, seu habitat natural ainda está por ser definido (PEREZ, et al., 2007; PELEG, SEIFERT e PATERSON, 2008) contudo, identificado como frequente colonizador humano em doentes hospitalizados e ambientes de prestação de cuidados de saúde (BREIJ, 2012).

A capacidade que o *A. baumannii* apresenta de causar doença, recai em três fatores de virulência: tipo de interação estabelecida com o doente, persistência no ambiente de saúde e a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência face aos antibióticos existentes (PEREZ, et al., 2007).

As espécies de *Acinetobacter* desempenham um importante papel na colonização e infecção de pacientes hospitalizados. Pode ocasionar pneumonia, bacteremia, endocardite, infecções do trato urinário, meningite, peritonite em pacientes com diálise peritoneal, infecções de pele e ferida, celulite, e casos esporádicos de conjuntivite, otite média, osteomielite e sinovite. Em pacientes com queimaduras ou imunodeficientes, age como patógeno oportunista, produzindo sepse (COELHO, 2012).

A. Baumannii é frequentemente isolado de pacientes de UTI, especialmente daqueles em unidades de queimados e dos pacientes com fatores predisponentes como diabetes mellitus, administração de esteroides adrenal, diálise peritoneal, câncer, alcoolismo e longos períodos de internação (SILVA et al., 2006).

Os carbapenêmicos são os fármacos de escolha para o tratamento das infecções por *A. baumannii*, pois têm excelente atividade bactericida e susceptibilidade ainda superior a 90% em muitas regiões do mundo (PEREZ et al., 2007). As infecções por *A. baumannii* estão associadas à alta letalidade.

As opções terapêuticas disponíveis incluem tigeciclina, polimixinas, ampicilina/sulbactam, aminoglicosídeos e mesmo a rifampicina, com propostas de associações heterogêneas, porém, com poucos estudos comparativos ou bem controlados (GODOY, 2012).

3.3 *Klebsiella pneumoniae*

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grupo grande e heterogêneo de bactérias Gram negativas. Os principais gêneros desta família são *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Hafnia* (ROLLINS, JOSEPH, 2000).

O gênero *Klebsiella* foi assim designado por Trevisan em 1885, em homenagem a Edwin Klebs, microbiologista alemão. Trevisan também foi responsável pela descrição da espécie *Klebsiella pneumoniae* (UMED, 2002; MARTINEZ, et al, 2004). Historicamente a classificação das espécies de *Klebsiella* foi baseada em suas características patogênicas ou quanto à sua origem.

K. pneumoniae é um bastonete Gram negativo aeróbio facultativo, mas com melhor crescimento em condições aeróbias, não esporulado e cujo tamanho varia de 0,3 a 1µ de diâmetro e 0,6 a 6µ de comprimento, é imóvel, produz colônias grandes e gomosas quando cultivadas em placas com nutrientes. No ágar MacConkey, produz colônias róseas, brilhantes, com aspecto elevado e de consistência mucoide (SANTOS, 2006).

Dentre os micro-organismos produtores de ESBL, *Klebsiella* é o gênero que produz a maior variedade destas enzimas, o que poderia ser explicado pelo fato destes micro-organismos serem bons vetores para plasmídeos ou por permitirem a evolução de genes que codificam ESBL mais rapidamente que outras *Enterobacteriaceae*. Muitos genes de ESBL são localizados em plasmídeos grandes com poucos números de cópias (LIVERMORE, 1995).

K. pneumoniae é um patógeno oportunista, que causa infecções nosocomiais, especialmente, pneumonia e infecções do trato urinário. Esse micro-organismo é um importante patógeno do trato respiratório, também fora dos hospitais. É uma das espécies mais frequentes envolvidas nas infecções humanas. Normalmente encontrado no intestino grosso, estando também presente no solo e na água. A *K. pneumoniae* tem uma cápsula muito grande, conferindo às colônias uma aparência mucóide brilhante (LEVINSO; JAWETZ, 1998). Além de infecções urinárias e pneumonia estes micro-organismos causam bacteremia e a disseminação para outras áreas, como as meninges (COSTA, 2009).

Esse micro-organismo quando apresenta gene para a ESBL, pode expressar resistência a até 95% dos antimicrobianos existentes em âmbito hospitalar, sendo a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) por esta bactéria, uma das principais causas de falha terapêutica. Existem outras formas de resistência emergentes, de grande importância, como a produção de beta-lactamases tipo adenosina monofosfato cíclico (AmpC), que hidrolisam cefoxitina; as carbapenemases, como as metalo-beta-lactamases (MBL) e carbapenemases tipo KPC (MOREIRA et. al., 2014).

Isolados de *K. pneumoniae* também podem produzir sideróforos onde, entre as enterobactérias, três sistemas são mais prevalentes: aerobactina, enterobactina e yersiniabactina (LAWLOR et al., 2007). Enquanto a contribuição da aerobactina e yersiniabactina para a virulência de *K. pneumoniae* tem sido demonstrada, o papel do sideróforo enterobactina ainda é incerto (MELO, 2013).

As infecções causadas por *Klebsiella* spp. tendem a ocorrer em pessoas com sistema imunitário deprimido sendo responsável por alta taxa de mortalidade. Dentre as síndromes clínicas mais frequentes citam-se: pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, rinite crônica atrofica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse (MADSON et al. 1994; INGHAM, 2000; UMED, 2002).

Uma boa opção para o tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL são as fluoroquinolonas, que são drogas potentes e com boa atividade tanto contra micro-organismos gram-negativos quanto contra gram-positivos (SANTOS, 2007).

3.4 *Escherichia coli*

Theodor Von Escherich foi o primeiro a descrever este agente em 1885. Na época foi denominado *Bacterium coli commune* e, em 1958, recebeu a denominação atual, *E.coli* em sua homenagem (BERCHIERI JUNIOR et al., 2009). Pertencente à família Enterobacteriaceae, o gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanii*, *Escherichia vulneris*. No entanto, a principal espécie de importância é *E. coli* (CAMPOS, TRABULSI, 2002).

Escherichia coli é um bastonete curto, gram negativo, não esporulado, medindo entre 1,1 a 1,5µm por 2 a 6µm, a maioria é móvel, devido à existência de flagelos peritríqueos. A temperatura ótima de crescimento é por volta dos 37°C (BARNES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004; QUINN et al., 2005). Caracteriza-se por apresentar metabolismo anaeróbio facultativo, pois possui metabolismo respiratório e fermentativo. Sendo capaz de fermentar, com produção de ácido e gás, a lactose, glicose, maltose, manose, manitol, xilose, glicerol, ramanose, sorbitol e arabinose. A fermentação do adonitol, sacarose, salicina, rafinose, ornitina, dulcitol e arginina é variável (QUINN et al., 2005; ANDREATTI FILHO, 2007).

Com base nos fatores de virulência, manifestação clínica e epidemiologia, as linhagens de *E.coli* consideradas patogênicas no trato intestinal, estão agrupadas em cinco classes, a saber: *E. coli* enteropagênica clássica (EPEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *E. coli* enteroagregativa (UPEC). (FRANCO; LANDGRAF, 2004; TRABULSI; ORDONEZ; MARTINEZ, 2004; MURRAY, 2006).

A *E. coli*, como uma bactéria gram negativa, pode liberar complexos lipopolissacarídeos de suas paredes celulares durante a análise. Estas endotoxinas podem causar febre e morte, caso a *E. coli* migre do intestino para a corrente sanguínea (RUSSELL et al. 2000). A presença de sideróforos, cápsula, adesinas, fatores necrosantes citotóxicos, hemolisinas alfa e beta dentre outros fatores podem estar presentes em cepas patogênicas do micro-organismo (MOREIRA, 2007).

Em humanos e animais, cepas de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) causam diarreia aquosa contendo muco acompanhada de vômitos e febre, coloniza as micro vilosidades de todo o intestino, principalmente o intestino delgado. Produzem uma lesão característica de ligação ou desaparecimento nas bordas do micro vilosidade, causando uma diarreia crônica, que leva a sequelas como má absorção, má nutrição, perda de peso e retardo no crescimento (MINAGAWA, 2007).

JUSTIFICATIVA

Mesmo existindo uma grande diversidade de mecanismos desenvolvidos pelas bactérias que as tornam resistentes aos antimicrobianos, especialmente aos betalactâmicos, a produção de betalactamases é o mais bem conhecido. Essas enzimas são capazes de hidrolisar o anel betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas e outros antimicrobianos. As bactérias gram - negativas são as principais responsáveis pela produção dessas enzimas e algumas delas são classificadas no grupo das ESBLs (FRANCISCO; JEA, 2009).

Gonçalves et al. (2005), relata que a grande maioria das plantas, empregadas com fins terapêuticos pelas comunidades, ainda não tiveram estudos definitivos que comprovam suas propriedades farmacológicas. Para Silveira et al. (2009), muitas pesquisas com propósitos de obtenção de novos fármacos ou aprimoramento dos já existentes, a partir de plantas medicinais, estão ganhando destaque nos últimos anos.

Cada vez é mais evidente a necessidade da descoberta de novas opções terapêuticas que possam ser utilizadas como formas alternativas para auxiliar na neutralização de micro-organismos patogênicos associados a vários processos infecciosos em humanos, especialmente contra *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* e *E. coli*, bactérias que atualmente são de importância clínica, em função dos inúmeros mecanismos de resistência aos antimicrobianos que elas apresentam. A descoberta de novos fármacos, a partir de plantas pode ser uma opção ao tratamento de pacientes acometidos por infecção bacteriana. Portanto, almeja-se com a realização desse trabalho, subsidiar informações concisas e eficazes sobre a utilização de novos extratos vegetais como ferramenta auxiliar no tratamento de pessoas com infecção por micro-organismos patogênicos, especialmente para aqueles produtores de β -lactamases de espectro estendido.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

➤ Analisar a ação de extratos de vegetais em bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido.

5.2 Específicos

➤ Determinar ação antibacteriana de extratos de vegetais sobre *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*;

➤ Verificar a suscetibilidade das cepas bacterianas versus concentrações distintas dos extratos com atividade antibacteriana;

➤ Estabelecer a suscetibilidade das cepas bacterianas em relação aos extratos vegetais fracionados quimicamente;

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Campo de estudo

A Área de Proteção Ambiental do Inhamum (APA) é considerada Patrimônio Municipal de Caxias, foi criado pela lei 1.46/2001 no dia 04 de julho de 2001. Está localizada entre as coordenadas 04° 53' 30" de latitude S e 43 24' 53" de longitude W, à margem esquerda da BR 136. Pertence à região Leste Maranhense e é integrante da bacia hidrográfica do Rio Itapecuru, com chuvas bem definidas. O clima é do tipo subúmido seco, com temperatura anual em torno de 27° C. A fitofisionomia é a Floresta Estacional Semidecidual com predominância de babaquais. (BARROS, 2012).

6.2 Coleta dos espécimes vegetais

Os espécimes foram coletados na APA, entre os meses de junho a outubro de 2015, em períodos diferentes variando conforme a época de desenvolvimento das espécies deste estudo. Para o Barbatimão sua época de florescimento vai de setembro a novembro (LORENZI, 2000). Enquanto para as espécies de Chanana os picos de floração vão de julho a setembro e de outubro a dezembro (VIDAL et al., 2008). Quebra pedra e Pimenta de macaco foram coletados no mês de julho. Os horários das coletas foram de 8:00 às 11:00. Todos os vegetais foram retirados do campo em quantidade de aproximadamente 1 kg, valor estimado como o suficiente para transformação do material bruto em material refinado, ou seja, obtenção dos extratos metanólicos, para serem utilizados nos testes contra as cepas bacterianas.

A tabela 1 apresenta as quatro espécies vegetais com seus nomes científicos, populares e órgão utilizado na obtenção do extrato.

Tabela 1 - Espécies vegetais utilizadas na pesquisa definidos pelo nome científico, nome popular e órgão utilizado para realizar os testes.

Nome científico	Nome popular	Órgão testado
<i>Turnera subulata</i> Sm.	Chanana	Flor
<i>Piper aduncum</i> L.	Pimenta de Macaco	Fruto
<i>Stryphnodendron adstringens</i> {Mart. Coville}	Barbatimão	Casca do Tronco
<i>Phyllanthus niruri</i> L.	Quebra- Pedra	Raiz

Segundo a Farmacopeia Brasileira (2010), a seleção das espécies vegetais que devem fazer parte do estudo de caracterização com finalidade microbiológica ou outra são aquelas que apresentem alguma atividade farmacológica, utilizadas na medicina popular.

6.3 Preparo e identificação do vegetal

As quatro espécies vegetais citadas anteriormente foram coletadas, prensadas, feito exsiccatas, identificadas e depositadas no Herbário Aluizio Bittencourt pertencente ao Laboratório de Botânica da Universidade Estadual do Maranhão LABIVE/UEMA/CESC). O material foi identificado pelo botânico Prof. Dr. Gonçalo Mendes da Conceição, membro do corpo docente do CESC/UEMA.

6.4 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos no Laboratório de Química da Faculdade Integral Diferencial (FACID), seguindo as orientações recomendadas pela Farmacopeia Brasileira (2010). Após coleta dos espécimes vegetais, Chanana, Barbatimão, Quebra pedra e Pimenta de macaco foram postos para secagem à sombra, sendo expostas ao ambiente por 4 horas diárias. A trituração dos vegetais foi realizada em moinho de facas até a condição de pó. Ao pó foi adicionado solvente metanol que ficou em repouso por 21 dias com agitação diária por 30 minutos. Após esse período, o material foi filtrado e posto em evaporador rotativo a 40°C para retirada de todo o solvente.

6.5 Amostras Microbianas

6.5.1 Manutenção das cepas bacterianas

As cepas bacterianas foram mantidas em repiques sucessivos em meio de cultura ágar eosina azul de metileno (EMB) até utilização nos testes de suscetibilidade (Figura 4).

Figura 3 - Procedimentos de repiques para novos crescimentos bacterianos em meio de cultura EMB.

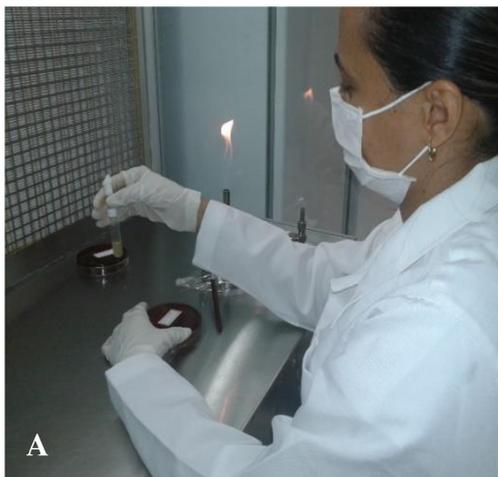


Foto: VIEIRA, F.



Foto: VIEIRA, F.

A Sociedade Brasileira de Microbiologia recomenda o uso de cepas da *American Type Culture Collection (ATCC)* para o controle de qualidade dos trabalhos com bactérias. Nesse trabalho foram utilizadas cepas de *K. pneumoniae ATCC 1705*, *E. coli ATCC 25922* e *P. aeruginosa ATCC 27853* adquiridas comercialmente. Essas cepas estavam liofilizadas e antes dos testes foram hidratadas em soro fisiológico e mantidas em repouso por 1 h. Após esse tempo, elas foram semeadas em placas de Petri com ágar eosina azul de metileno. As placas foram incubadas em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 48 h.

A cepa de *A. baumannii* foi obtida de material biológico de paciente com infecção acometida por esse micro-organismo. A manutenção dessa cepa antes da realização dos testes de suscetibilidade foi também realizada em meio de cultura eosina azul de metileno, como descrito para as outras bactérias.

6.6 Preparo dos meios de cultura para os testes de suscetibilidade

As placas para os testes de suscetibilidade foram formadas de duas camadas. Para a formação da primeira, composta de ágar-ágar foram utilizados 10,6 gramas do ágar diluídos em 300 ml de água destilada, conforme recomendação do fabricante, essa mistura foi agitada suavemente e levada ao bico de Bunsen até dissolução total do meio de cultura. Alíquotas de 15 ml desse meio foram postas em tubos de ensaio e esterilizadas na autoclave à temperatura de 120°C por 15 minutos. Após esterilização as alíquotas foram entornadas em placas de Petri, com tamanho de 90 x 15 mm descartáveis esterilizadas (Pleion ®), as quais foram postas em repouso até solidificação do meio de cultura.

A segunda camada fora composta de ágar Muller-Hinton, para tanto, 3,6g de soluto foram diluídas em 300 ml de água destilada. Alíquotas de 13 ml desse meio foram postas em tubos de ensaio e esterilizadas na autoclave à temperatura de 120°C por 15 minutos.

6.7 Preparo do inóculo bacteriano

Por meio de uma alça de platina esterilizada foi realizada a inoculação dos microorganismos recentemente repicados, em tubos de ensaio com 1 ml de soro fisiológico a 0,9% e após essa inoculação foi obtido a turbidez com base na escala 0,5 de Mac Farland (MF).

6.8 Preparo das placas para a realização dos testes de suscetibilidade

Para esse teste, 1 ml da suspensão bacteriana fora adicionada aos 13 ml de ágar Muller-Hinton, mantido à temperatura de 45°C no banho - maria. A segunda parte foi entornada sobre a primeira e poços foram confeccionados na segunda camada, mediante a utilização de ponteiros plásticas esterilizadas de 4,0 mm de diâmetros.

6.9 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos vegetais pelo método de difusão em ágar

Todos os ensaios foram realizados em triplicata utilizando-se cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC): *E. coli* (25922) e *K. pneumoniae* (1705) e *P. aeruginosa* (27853). A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica da difusão em ágar em poços, segundo Groove e Randall (1955). Como controle positivo utilizou-se um antibiótico de referência o Cloranfenicol na concentração de 30µg previamente testado no trabalho de GONÇALVES et al., (2000) e testes padrão do CLSI (2014).

Nos poços formados na segunda camada foram adicionados 40 µL dos extratos testados, seguindo metodologia semelhante à de ALVES et al., (2008). As placas foram incubadas a temperatura de 36°C em estufa BOD por um período de 48h. Após período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, que consistiu em medir o diâmetro dos halos de inibição que foram formados. Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos em milímetros, com auxílio de uma régua milimetrada. Segundo a CLSI 2014 os halos de inibição podem variar de acordo com a metodologia utilizada assim como as concentrações, porém ele faz uma correlação entre o tipo de bactéria em estudo e os antimicrobianos sintéticos,

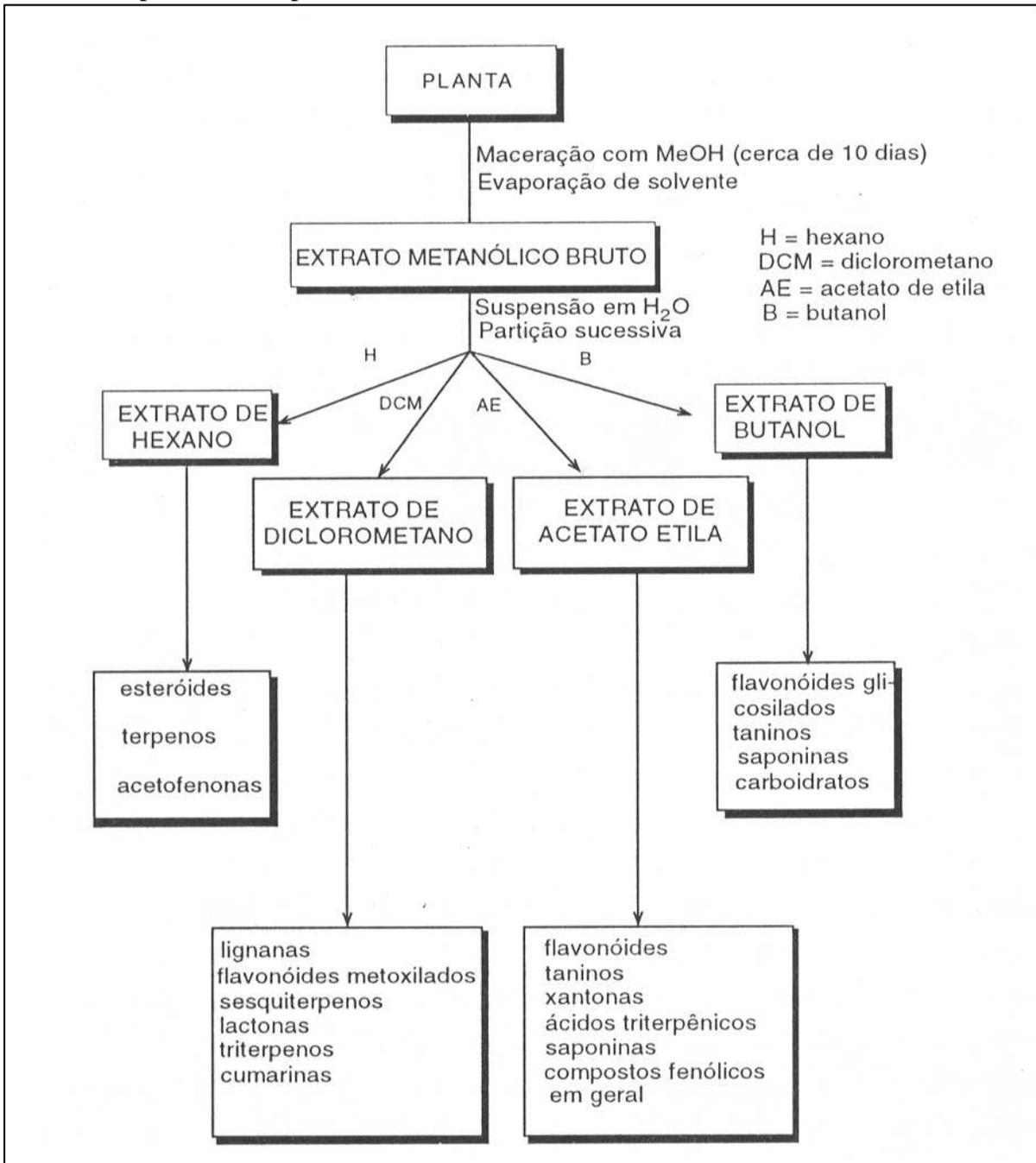
para que assim possamos fazer uma mensuração dos valores encontrados e determinar se houve ou não inibição de crescimento. Foi considerado, como resultado final de cada extrato, a média das três medidas e, como suscetível a formação de halo com diâmetro igual ou superior a 8 mm (PAREKH & CHANDA, 2007; SANTOS et al., 2007).

6.10 Fracionamento químico dos extratos vegetais

Após comprovada atividade antimicrobiana dos extratos, posteriormente, esses extratos foram submetidos a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, butanol e acetato de etila, visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades (FILHO, 1998). Segundo demonstração através de fluxograma abaixo na figura 4.

Aos extratos metanólicos de *Turnera subulata* Sm (Chanana), *Stryphnodendron adstringens* {Mart. Coville} (Barbatimão), *Phyllanthus niruri* L. (Quebra pedra) e *Piper aduncum* L. (Pimenta de macaco), foram adicionados 1,5 ml dos solventes hexano, butanol e acetato de etila e deixados em repouso até total evaporação dos solventes. Após evaporação aos extratos residuais foi adicionado 1 ml de DMSO para a ressuspensão desses extratos (SANTOS et al., 2007; GADÉA, 2008). Os extratos, após fracionamento químico foram utilizados em testes de suscetibilidade, seguindo metodologia descrita no teste de difusão em ágar.

Figura 4 - Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.



Fonte: Filho, V.C.

6.11 Determinação da atividade antimicrobiana em função da concentração dos extratos em diluições seriadas

A determinação da atividade antimicrobiana de extratos em diluição seriada foi realizada segundo a metodologia modificada conforme recomendada pelo CLSI, 2014 com as mesmas bactérias utilizadas nos testes de difusão em ágar. Um grama dos extratos vegetais brutos foi suspenso em Dimetilsufóxido (DMSO) e diluições seriadas foram realizadas nas concentrações de 1/10, 1/100 e 1/1000. As placas testes foram confeccionadas seguindo metodologia previamente determinada. Em cada orifício da placa teste foram micropipetados 40 µL de cada extrato em diluição seriada. As placas foram incubadas a 36 ° C por 48 h sem agitação (ALVES et al, 2008). Após período de incubação foi realizada a leitura dos resultados, que consistiu em medir o diâmetro dos halos de inibição que foram formados. Os halos de inibição do crescimento bacteriano foram medidos em milímetros, com auxílio de uma régua milimetrada.

6.12 Análises Estatísticas

O banco de dados deste estudo foi elaborado utilizando-se o software Microsoft Excel 2007 e as análises de dados foram realizadas por meio do pacote estatístico *Bioestat*. Versão 5.0 (AYRES et al., 2007).

Os dados referentes aos halos de inibição (em mm) correspondentes à atividade antimicrobiana dos extratos vegetais Barbatimão, Chanana, Quebra pedra e Pimenta de macaco em relação aos micro-organismos utilizados na pesquisa *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, foram avaliados quanto à distribuição normal e quanto à homocedasticidade, por meio do teste de *Liliefors*. Como estes não se ajustaram à distribuição normal e nem à igualdade de variâncias, análises não-paramétricas correspondentes foram utilizadas. Para examinar se houve diferença nas medianas dos grupos de extratos comparados foi utilizada a análise de *Kruskal-Wallis* (H). Quando constatada a diferença, utilizou-se o teste de Dunn, a posteriori (AYRES et al., 2007).

De acordo com Siqueira; Tibúrcio (2011) o valor de H calculado para cada análise foi comparado ao valor de H definido na tabela de *quantis* para a estatística de teste de *Kruskal-Wallis*. Sempre que o valor calculado era maior do que o apresentado na tabela a um determinado grau de liberdade, considerando a quantidade de grupos comparados, e o valor de

p era menor que 0,05, rejeitou-se a hipótese de medianas iguais, e prosseguiu-se com o teste de Dunn.

Os valores de p, significativos ao nível citado (5%), foram destacados nas tabelas com asterisco (*). Para $p < 0,05$ adotou-se um asterisco (*), para $p < 0,01$ utilizou-se dois asteriscos (**) e para $p < 0,0001$ foram adotados três asteriscos (***) (SIQUEIRA; TIBÚRCIO, 2011).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os micro-organismos utilizados neste trabalho foram a *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. A escolha desses agentes foi devido alguns serem amostras ATCC, produtores de β -lactamases de espectro estendido e por atualmente estarem associados á vários quadros de infecções, principalmente as hospitalares (OPLUSTIL et al., 2010; ANVISA, 2015).

Quanto à escolha dos vegetais foi baseada em dados etnobotânicos sobre o uso tradicional dessas plantas no tratamento de doenças, assim como recomendado pela Farmacopeia Brasileira (2010) e BUSSMANN et al. (2010).

Com base nos resultados obtidos na tabela 2, pôde-se observar que todas os extratos apresentaram atividade antibacteriana. O extrato de *Phyllanthus niruri* L. (Quebra- pedra) apresentou atividade antimicrobiana para as cepas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* com halos de inibição de 18, 22, 12 e 13mm de diâmetro respectivamente.

Quanto à *Piper aduncum* L (Pimenta de macaco), o padrão de atividade antimicrobiano em relação aos quatro micro-organismos utilizados nesta pesquisa foi bastante significativo, com halo de 20mm para a *K. pneumoniae*, 30mm para a *E.coli*. Entretanto, esse extrato não apresentou atividade contra a cepa de *P. aeruginosa*.

Quanto ao teste de suscetibilidade, mediante o uso do extrato de *Turnera subullata* Sm. (Chanana), este apresentou atividade inibitória de crescimento sobre as cepas bacterianas, sendo mais significativa nos testes realizados contra *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Com relação à suscetibilidade de *Acinetobacter baumannii* aos extratos metanólicos de *P. aduncum* L. (Pimenta de Macaco), *Turnera subullata* Sm. (Chanana), *Phyllanthus niruri* L. (Quebra pedra), a cepa apresentou sensibilidade com a formação de halo de 20mm, 10mm, e 13mm, respectivamente. Esse micro-organismo não apresentou suscetibilidade ao Barbatimão (Tabela 2). Nas tabelas 3 e 4 são apresentados os mesmos dados da tabela anterior, acrescido dos valores encontrados para H e p, e aplicação *a posteriori* do Teste de Dunn, respectivamente.

Tabela 2 – Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais em relação aos micro-organismos utilizados na pesquisa realizada em Caxias – MA, Brasil, 2015.

Micro-organismos	Extratos	Halo de inibição	Grupo controle	Halo de inibição
Cepa ATCC 27853 <i>P. aeruginosa</i>	Barbatimão	10 mm	Cloranfenicol	30mm
	Chanana	20 mm		30mm
	Quebra Pedra	18 mm		30mm
	Pimenta de Macaco	0,0 mm		28mm
Cepa ATCC 1705 <i>K. pneumoniae</i>	Barbatimão	28 mm	Cloranfenicol	28mm
	Chanana	12 mm		30mm
	Quebra Pedra	22 mm		30mm
	Pimenta de Macaco	20 mm		30mm
Cepa ATCC 25922 <i>E. coli</i>	Barbatimão	10mm	Cloranfenicol	30mm
	Chanana	20 mm		30 mm
	Quebra Pedra	12 mm		30 mm
	Pimenta de Macaco	30 mm		30mm
Cepa <i>A.baumannii</i>	Barbatimão	0,0 mm	Cloranfenicol	28mm
	Chanana	10 mm		28mm
	Quebra Pedra	13 mm		30mm
	Pimenta de Macaco	20 mm		30mm

mm = tamanho dos halos em milímetro.

Fonte: Cunha G.A.

Tabela 3 - Comparação entre as medianas da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais em relação aos micro-organismos utilizados na pesquisa de extratos, realizados em Caxias- MA, Brasil, 2015.

Micro-organismos	Extratos (Halo de inibição em mm)				Medianas	
	Barbatimão	Chanana	Quebra Pedra	Pimenta de Macaco	H	P
<i>Cepa ATCC P. aeruginosa</i>	10	20	20	0	14,1694	0,0027**
	10	20	20	0		
	10	20	13	0		
<i>Cepa ATCC K. pneumoniae</i>	12	23	12	20	10,4500	0,0151*
	12	20	12	20		
	12	23	12	20		
<i>Cepa ATCC E. coli</i>	10	20	12	0	10,8791	0,0124*
	10	20	12	0		
	10	20	12	0		
<i>Cepa ATCC A. baumannii</i>	0	20	20	20	8,4652	0,0373*
	0	10	20	20		
	0	0	20	20		

H = valor de Kruskal-Wallis, p = valor de p, *significativo em nível de 5%, **significativo em nível de 1%. Valores de H e p = correspondem as medianas.

Fonte: Cunha G.A.

Tabela 4 - Comparação entre as medianas entre os extratos, a posteriori da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais em relação aos micro-organismos utilizados na pesquisa de extratos.

Micro-organismos	Comparação de medianas	Valor de p (Teste de Dunn)
<i>Cepa ATCC P. aeruginosa</i>	Extrato de Barbatimão e Extrato de Chanana	ns
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Quebra Pedra	ns
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Pimenta de Macaco	ns
	Extrato de Chanana e Extrato de Quebra Pedra	ns
	Extrato de Chanana ⁺ e Extrato de Pimenta de Macaco	< 0,05*
<i>Cepa ATCC K. pneumoniae</i>	Extrato de Quebra Pedra ⁺ e Extrato de Pimenta de Macaco	< 0,05*
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Chanana ⁺	< 0,05*
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Quebra Pedra	ns
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Pimenta de Macaco	ns
	Extrato de Chanana ⁺ e Extrato de Quebra Pedra	< 0,05*
<i>Cepa ATCC E. coli</i>	Extrato de Chanana e Extrato de Pimenta de Macaco	ns
	Extrato de Quebra Pedra e Extrato de Pimenta de Macaco	ns
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Chanana	ns
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Quebra Pedra	ns
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Pimenta de Macaco ⁺	< 0,05*
<i>Cepa ATCC A. baumannii</i>	Extrato de Chanana e Extrato de Quebra Pedra	ns
	Extrato de Chanana e Extrato de Pimenta de Macaco	ns
	Extrato de Quebra Pedra e Extrato de Pimenta de Macaco	ns
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Chanana	ns
	Extrato de Barbatimão e Extrato de Quebra Pedra ⁺	< 0,05*

⁺grupo de extrato com mediana significativamente maior na comparação de Dunn, ns = não significativo, *significativo em nível de 5%.

Fonte: Cunha G.A.

É notória a utilização de plantas medicinais na medicina popular, como anti-inflamatório, cicatrizante, calmante ou com outras finalidades. O uso de vegetais, como propriedades fitoterápicas pode ser uma alternativa no tratamento de infecções bacterianas. Com base nos resultados obtidos nessa pesquisa, pôde-se inferir que alguns extratos apresentaram atividade antibacteriana sobre as cepas usadas nos experimentos. Pelo fato de ainda não se ter um consenso sobre o tamanho do halo que mostre condição de inibição, suscetibilidade ou ação intermediária e seguindo parâmetros estabelecidos por outros autores, os testes realizados com extratos brutos, demonstraram halos de suscetibilidade bem significativos.

Duarte (2006) discorre sobre a não existência de um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados com antibióticos padrões, tanto que alguns autores consideram somente resultados similares aos de antibióticos, enquanto outros consideram com bom potencial somente aqueles com níveis de inibição superiores aos dos antibióticos.

No ensaio bioautográfico realizado contra *S. aureus*, foram encontradas zonas de inibição nos extratos de *Piper* sp, *P. amplum*, *P. aduncum* e *P. cernuum*, demonstrando níveis significativos de atividade antimicrobiana (MULLER, 2011). O extrato das espécies do gênero *Piper* tem atividade significativa sobre bactérias Gram-positivas sendo elas *Streptococcus pyogenes*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *Bacillus subtilis* (COSTA, 2013).

No trabalho de Pinho et al., (2012) ao realizar o teste de difusão em ágar do extrato hidroalcoólico de Barbatimão não foi possível observar atividade antimicrobiana contra a cepa de *E. coli*, o que pode estar relacionado à menor susceptibilidade das bactérias Gram-negativas a extratos vegetais. De modo geral, quando o extrato vegetal é produzido partir das folhas, elas têm menor concentração de agentes antimicrobianos, comparados aos cascas das plantas (VASCONCELOS et al., 2004). Nesta pesquisa foi utilizado a casca do Barbatimão para confecção do extrato a ser testado, apresentando resultado eficiente contra essa mesma cepa.

No estudo de extratos vegetais, Thomazi, Bertolin e Pinto (2010) testaram a casca de *S. adstringens* apresentando ação contra: *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter* sp., *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Citrobacter* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* (FERREIRA et al., 2013). Corroborando os dados desta pesquisa para as cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e o gênero *Klebsiella*.

Silva (2010), verificou eficiência no extrato de Barbatimão (casca) para a linhagem de *E. coli* que apresentou halo de inibição de 7,0 mm. E para *P. aeruginosa*, teve halo de 8,6 mm. Valores esses que corroboram com os achados no presente trabalho, sendo que esse extrato para essas mesmas bactérias formou halos de inibição de 10mm respectivamente.

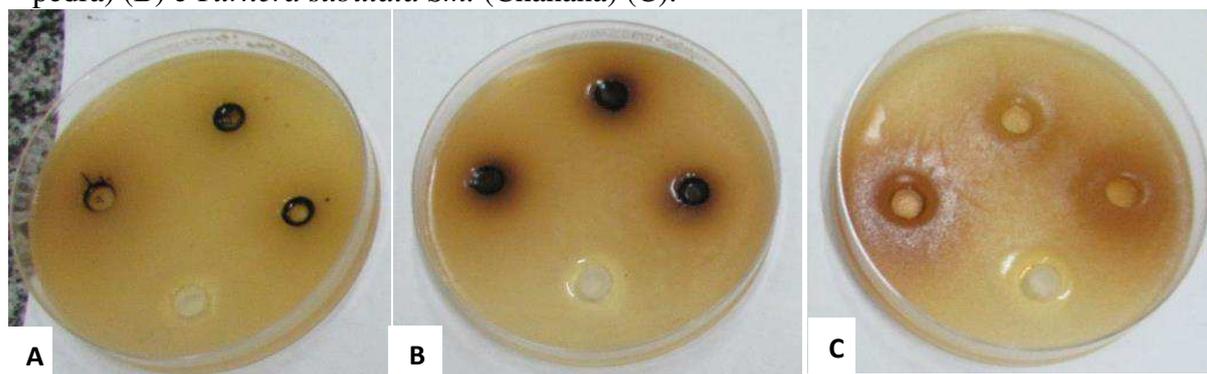
Na pesquisa de Jesus (2015) ao realizar testes com o extrato etanólico e aquoso da casca do tronco de Barbatimão, ambos foram capazes de inibir o crescimento de diversas bactérias, obtendo os seguintes halos de inibição: *E. coli* (9-12 mm), *B. cereus* e *P. aeruginosa* (13-18 mm) e *S. aureus* (>18 mm); e com o extrato aquoso: *P. aeruginosa* (9-12 mm), *E. coli* (13-18 mm), *S. aureus* e *B. cereus* (>18 mm).

Bardal (2011) relata que o extrato aquoso de *Stryphnodendron adstringens* não apresentou quaisquer efeitos antibacterianos, frente à espécie *E. coli*. Porém com a concentração de 50mg/ml desse extrato foi microbicida para *P. aeruginosa*.

O potencial uso da combinação de compostos vegetais e antibióticos comerciais contra *Acinetobacter baumannii* foi documentada por várias publicações, dentre elas o estudo dos componentes de gengibre (*Zingiber officinale*) em combinação com a tetraciclina, observando uma diminuição da resistência de estirpes clínicas de *A. baumannii* à tetraciclina (DUARTE, 2011).

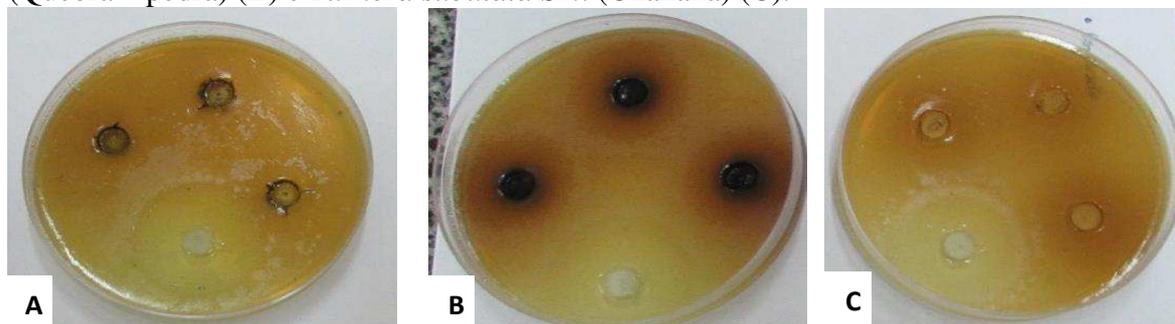
Nas figuras 5, 6 e 7 são apresentadas as placas com os halos de inibição que foram formados em função da suscetibilidade das cepas bacterianas em relação aos extratos vegetais utilizados. Nessas, estão os perfis de suscetibilidade da *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *E. coli* em relação aos extratos de *P. aduncum* L. (Pimenta de macaco), *Phyllanthus niruri* L. (Quebra pedra) e *Turnera subulata* Sm. (Chanana).

Figura 5 - Perfis dos halos de suscetibilidade de *K. pneumoniae* em relação aos extratos de vegetais testados: *Piper aduncum* L. (Pimenta de macaco) (A), *Phyllanthus niruri* L. (Quebra – pedra) (B) e *Turnera subulata* Sm. (Chanana) (C).



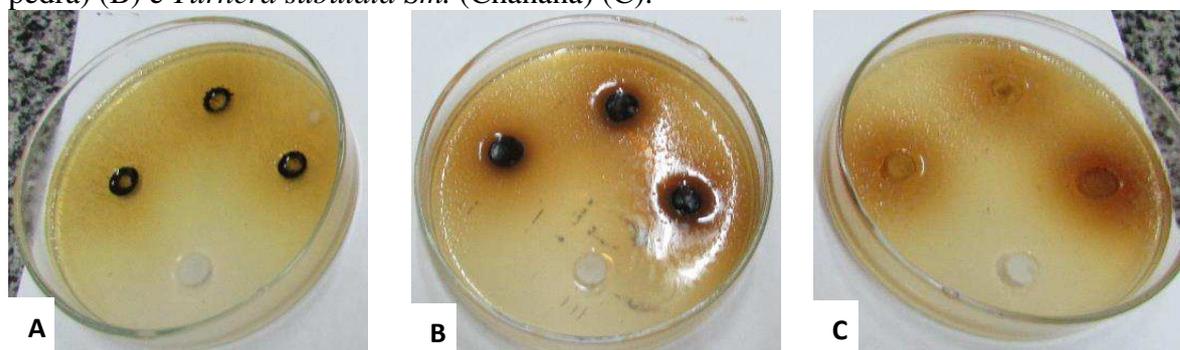
Fonte: CUNHA, G. A.

Figura 6 - Perfis dos halos de suscetibilidade de *P. aeruginosa* em relação aos extratos de vegetais testados: *Piper aduncum* L. (Pimenta de macaco) (A), *Phyllanthus niruri* L. (Quebra – pedra) (B) e *Turnera subulata* Sm. (Chanana) (C).



Fonte: CUNHA, G. A.

Figura 7 - Perfis dos halos de suscetibilidade de *E. coli* em relação aos extratos de vegetais testados: *Piper aduncum* L. (Pimenta de macaco) (A), *Phyllanthus niruri* L. (Quebra – pedra) (B) e *Turnera subulata* Sm. (Chanana) (C).



Fonte: CUNHA, G.A.

Percebeu-se com base nos resultados obtidos nas figuras 5, 6 e 7, que as cepas de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* não foram sensíveis ao extrato de Barbatimão, isso, devido não ter ocorrido a formação de halo de suscetibilidade em torno do local que foi inoculado o extrato.

Giviziez (2010), ao testar a atividade antimicrobiana de *P. aduncum* L. contra cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* observou que estas bactérias apresentaram ausência de inibição (NI),

ou seja, são resistentes a este vegetal. Os dados encontrados na presente pesquisa não corroboram em relação a *E. coli*, porém confirma a resistência observada para *P. aeruginosa*. Acredita-se que as discrepâncias de resultados variados, ou seja, mais ou menores valores encontrados nos halos de inibição, possa ser devido a metodologias diferenciadas ou esforço amostral reduzido.

Silva (2010) ao testar o óleo essencial da Pimenta de macaco observou que não teve grande efeito inibitório contra os micro-organismos *E. coli*, *S. aureus* e *S. enteritidis* (ALVES, 2010). No presente trabalho este extrato foi bastante significativo para a cepa de *E. coli* formando halo de 30mm.

Silva, Cantanho (2010) concluíram que a utilização do gel da *Turnera ulmifolia* L., permitiu a ocorrência do processo de reparação cutânea de feridas cirúrgicas em camundongos. É evidente que muitas destas plantas podem ser utilizadas com outras propriedades, tais como cicatrizante, embora o seu potencial antibactericida seja pouco investigado.

Com relação aos testes de suscetibilidade realizados mediante à utilização dos extratos vegetais fracionados quimicamente, observou-se que os resultados foram mais significativos no fracionamento do Barbatimão com hexano, apresentando halo de suscetibilidade que oscilou entre 11 a 20 mm, sendo o contrário em relação ao extrato da chanana, que apresentou baixa atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil de suscetibilidade dos micro-organismos testados em relação aos extratos dos vegetais após fracionados quimicamente.

Micro-organismos	Extratos (Halo de inibição em mm)								H	p	
	Solventes	Ext. met. Barbatimão	CLF	Ext. met. Chanana	CLF	Ext. met. Quebra pedra	CLF	Ext. met. Pimenta de macaco			CLF
<i>Cepa ATCC 1705</i> <i>P. aeruginosa</i>	Hexano	20	20	3	30	3	20	NR		5,635	0,0598
	Butanol	13	22	3	30	13	22	NR		4,781	0,0916
	Acetato de Etila	13	22	7	30	13	22	NR		1,207	0,5467
<i>Cepa ATCC 7853</i> <i>K. pneumoniae</i>	Hexano	10	10	-	-	13	10	-	-	9,056	0,0286
	Butanol	7	10	-	-	13	-	-	-	3,924	0,2697
	Acetato de Etila	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
<i>Cepa ATCC 25922</i> <i>E. coli</i>	Hexano	11	40	-	50	-	30	-	40	6,2526	0,0999
	Butanol	-	-	-	40	-	40	-	50	0	0
	Acetato de Etila	11	30	-	50	-	40	-	40	6,223	0,1009
<i>Cepa</i> <i>A. baumannii</i>	Hexano	NR		-	30	-	30	-	30	0	0
	Butanol	NR		-	40	-	30	-	30	0	0
	Acetato de Etila	NR		-	30	-	30	-	30	0	0

- = não apresentou efeito; **Ext. met.** = extrato metanólico; **NR** = Teste não realizado; **CLF** = Clorafenicol; **mm** = tamanho dos halos em milímetros, H = valor de Kruskal-Wallis, p = valor de p.

Fonte: Cunha G.A.

A utilização de solventes orgânicos com polaridades crescentes é de grande valia para a individualização de compostos presentes em extratos brutos de vegetais. O fracionamento de extratos vegetais mediante a utilização de hexano, isola terpenos, esteróides e acetofenonas, substâncias que tem atividade antimicrobiana, o que foi evidenciado no experimento ora realizado, sobre as cepas de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Nos testes realizados com o óleo essencial de *P. aduncum* no trabalho de Lobato et al., (2007), este apresenta em sua composição dilapiol que é um éter fenílico do qual vem sendo testado com êxito por possuir atividades como fungicida, moluscicida, acaricida, bactericida e larvicida, além de ser biodegradável. Extratos orgânicos das folhas de *P. aduncum* apresentaram atividades moluscicida, citotóxica e antibacteriana, para as quais se associou a presença de dihidrochalconas e derivados prenilados do ácido benzóico (ORJALA et al., 1993,1994).

Ensaio realizado no trabalho de Ferreira (2015) mostraram que o extrato alcoólico de *P. aduncum* apresentou propriedades antibacterianas frente a vários micro-organismos incluindo *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans*, *Intracellulare micobactérias*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entretanto, essa atividade parece estar relacionada aos ácidos p-hidroxibenzóico, derivados dihidrochalconas e cromenos, principais constituintes presentes no extrato alcoólico.

A atividade antimicrobiana pode estar presente em diferentes extratos vegetais. Como descrito por Djipa et al., (2000) estudando a atividade antimicrobiana de extratos de jambolão sobre vários micro-organismos, dentre eles *S. aureus*, verificaram que este extrato teve atividade antimicrobiana, devido à alta concentração de taninos (77 a 83%). SOARES et al., (2008), comenta em seu trabalho que diversos estudos realizados para determinar atividade antimicrobiana dos vegetais são preferencialmente feitos com a casca dos espécimes vegetais, dependendo da planta a ser testada, isso se explica por estar contido nesse órgão, alta concentração de taninos (20%) responsáveis pelas propriedades medicinais da planta.

Rosário e Almeida (2016), realizaram treze testes fitoquímicos, onde foram identificados no extrato do gênero *Phyllanthus niruri* L apenas cinco metabólitos secundários sendo eles: Esteroides e Triterpenoides, Alcaloides, Depsídeos e Depsidonas, Depsídeos e Depsidonas e Antraquinonas.

Para Oliveira et al. (2012), extratos de *Phyllanthus niruri* não obtiveram uma atividade significativa sobre *E. coli*, haja vista o resultado negativo para fase ciclohexano e um halo de pequeno alcance para a fase diclorometano, porém não se obtendo uma taxa de inatividade total.

Quanto à determinação dos perfis de suscetibilidade das cepas bacterianas aos extratos em diluição seriada, o Barbatimão e Chanana apresentaram atividade inibitória para a *P. aeruginosa* nas três diluições, com média dos halos de suscetibilidade que variou de 8 a 12 mm. Ainda com relação à Chanana e na diluição de 1/10, ela demonstrou eficácia no controle de crescimento das quatro cepas utilizadas no trabalho, com halo de sensibilidade que oscilou entre 10 a 12 mm (Tabela 6).

Tabela 6 - Diluições seriadas dos extratos vegetais em relação aos micro-organismos utilizados.

Micro-organismo	Extratos (Halo de inibição em mm)																			
	Ext. met. Barbatimão					Ext. met. Chanana					Ext. met. Quebra pedra				Ext. met. Pimenta de macaco					
	Diluição (µL)			H	p	Diluição (µL)			H	p	Diluição (µL)			H	P	Diluição (µL)			H	p
	1/10	1/100	1/1000			1/10	1/100	1/1000			1/10	1/100	1/1000			1/10	1/100	1/1000		
Cepa ATCC 1705 <i>P. aeruginosa</i>	8	12	10	1,954	0,5501	11	10	10	4,5714	0,1017	-	-	-	0	0	NR	NR	NR	0	0
Cepa ATCC 27853 <i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	0	0	12	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0
Cepa ATCC 25922 <i>E. coli</i>	-	-	-	0	0	10	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0
Cepa <i>A. baumannii</i>	NR	NR	NR	0	0	10	-	-	0	0	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0

- = não apresentou efeito; **Ext. met.**= extrato metanólico; **NR**= Teste não Realizado; **mm** = tamanho dos halos em milímetro, H = valor de Kruskal-Wallis, p = valor de p,

Fonte: Cunha G.A.

Como é notório na literatura, que os micro-organismos apresentam suscetibilidade distintos em relação às concentrações de diversos antimicrobianos, utilizados no tratamento de pacientes acometidos por infecção por bactérias. Essa condição também foi evidenciada nesse estudo, com experimentos de diluições seriadas, em que o Barbatimão agiu somente no controle de crescimento da *P. aeruginosa*, enquanto, a Chanana foi efetiva em inibir o crescimento das quatro cepas bacterianas. Isso se deve à possível presença de substâncias oriundas do metabólico secundário desse vegetal, com propriedades inibitórias contras estas cepas bacterianas.

Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de MIC, considerando como: forte inibição - MIC até 500 µg/mL; inibição moderada – MIC entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - MIC acima de 1600 µg/mL. Enquanto para Avellaneda et al. (2005), demonstraram que um micro-organismo apresenta considerável sensibilidade a um determinado extrato, quando a diluição deste for inferior a 12,5mg/mL. Partindo desta premissa os dados observados no presente trabalho encontram-se dentro dos parâmetros utilizados por este autor, devido os halos de 8 a 12 mm obtidos com o extrato de Barbatimão contra *P. aeruginosa* na diluição 1/10.

Orlando (2005) observou atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto da casca do Barbatimão para *Enterococcus faecalis*, *Kocuria rhizophila*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. No método de difusão em ágar, os halos de inibição do crescimento microbiano variaram de 8,3mm a 25,3mm. No método da diluição seriada, o extrato foi capaz de inibir o crescimento microbiano nas concentrações que variam de 70 a 200mg/mL e foi mais eficiente sobre as leveduras, *N. gonorrhoeae* e *P. aeruginosa*. Nessa pesquisa o halo de inibição formado por esse extrato contra a cepa de *K. pneumoniae* foi superior, medindo 28mm, porém não houve crescimento bacteriano nas três concentrações de diluições seriadas. Mas para a cepa de *P. aeruginosa*, esse extrato inibiu o desenvolvimento microbiano nas três diluições.

Miranda et. al (2013) testou a atividade antibacteriana de cinco extratos entre eles o gênero *Phyllanthus* frente à *S. aureus* e *E. coli*, à atividade relacionada à *E. coli* não apresentou atividade inibitória com nenhuma das plantas em estudo. No entanto apenas o algodão, quebra pedra e erva de bicho mostraram atividade frente à *S. aureus* nas concentrações de 200 mg/mL e de 500 mg/mL, porém não mostrou eficiência contra *E. coli*. No presente estudo para esse extrato a cepa de *E. coli* foi a de menor atividade com halo de (12mm).

Kalimuthu et al. (2014), evidenciaram na sua pesquisa que o extrato etanólico de *T. ulmifolia* apresentou inibição máxima contra *K. pneumonia* (18,3mm), *P. aeruginosa* (20mm) e *E. coli* (31,2 mm) nas concentrações de 20ug/ml.

Domingues et al. (2015), evidenciaram com o extrato hidroalcoólico de *Phyllanthus* sp., tem forte ação antimicrobiana para a enterobactéria, *E. coli*; com a diluição de 6,67 mg/mL, com valor do halo de 6mm. Resultado superior foi evidenciado na referida pesquisa com halo para esta cepa bacteriana de 12mm. Porém não houve inibição de crescimento bacteriano com as diluições seriadas.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciaram que os extratos de *Turnera Subulata Sm.* (Chanana), *Phyllanthus niruri L.* (Quebra pedra) e *Stryphnodendron adstringens {Mart. Coville}* (Barbatimão), apresentaram potencial antibacteriano sobre *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *A. baumannii*;

Os extratos *Piper aducum L.* (Pimenta de macaco) e *Stryphnodendron adstringens {Mart. Coville}* (Barbatimão), não apresentaram atividade inibitória contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii* respectivamente;

Quando considerado o tamanho dos halos de inibição formados nos testes de suscetibilidade, o *P. niruri L.* foi o que apresentou maior diâmetro;

Após fracionamento químico dos extratos brutos, o que apresentou melhor rendimento foi o realizado com hexano no Barbatimão, que aparentemente isolou compostos com atividade antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, entretanto, não teve ação sobre *A. baumannii*;

A diluição seriada realizada com o extrato de *Stryphnodendron adstringens {Mart. Coville}* (Barbatimão) na diluição de 1/10 µL foi o que apresentou melhor espectro de ação sobre os micro-organismos testados, principalmente sobre *P. aeruginosa*.

Embora os extratos utilizados na pesquisa tenham apresentado efeito satisfatório sobre as bactérias testadas, fica evidente que esses necessitam de estudos mais refinados sobre sua complexa estrutura química, afim de delimitar quais compostos são potencialmente responsáveis pela ação antibacteriana e no futuro serem utilizados em abordagens terapêutica;

As pesquisas realizadas com extratos vegetais são promissoras, devido à descoberta de novos agentes bacterianos apartir dos vegetais. Portanto, os resultados obtidos na execução desse trabalho de pesquisa podem ser utilizados como ferramentas no direcionamento de novas pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITA, A. M. et al. Espécies medicinais comercializadas como "quebra-pedras" em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. bras. farmacogn.*, v. 19, n. 2, p. 471-477, Jun. 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000300022. Acesso em: 09/03/2016

AGRA, M.F. et al. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17: 114- 140. 2007

ALBUQUERQUE, A. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidade e perspectivas. *Rev. bras. farmacogn.*, v.16, p.678-689, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000500015. Acesso em: 15/03/2016

ALARCON-AGUILARA, F.J. Et al. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. *J. Ethnopharmacol.*, v.61: 101-110. 1998. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198000208>. Acesso em: 01/04/2016

ALIGIANIS N.; KALPOUTZAKIS E.; MITAKU S.; CHINO I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, v.49, p. 4168-4170, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559104>. Acesso em: 03/04/2016

AMBLER, P. A standard numbering scheme for the class a beta-lactamases. *Journal Biochemical*, London, v. 276, n. 1990, p. 1990-1991, 1991.

ALVES, G.E. et al. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova*, v. 31, n. 5, p. 224-1229, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500052. Acesso em: 05/03/2016

ALVES, R. DA S. **Avaliação da atividade antimicrobiana entre óleos essenciais obtidos de folhas de manjeriço, pimenta de macaco e tomilho sobre patógenos veiculados por alimentos.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/handle/1/1607>. Acesso em: 08/05/2016

ALVES, A. P. et al. Nosocomial infections by KPC-producing enterobacteria in a tertiary hospital in Southern Brazil. *Revista da AMRIGS*, Porto Alegre, v.57, n.3, p. 213-218, jul.- set. 2013. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082014000300282. Acesso em: 20/05/2016

ARBO, M.M. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). II Series *Annulares, Capitatae, Microphyllae y Papiliferae*. **Bonplandia** 10: 1-82. 2000. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/41941221>. Acesso em: 16/03/2016

ARBO, M.M. Turneraceae (*Turnera* Family). In: *N. Smith et al. (Eds.) Flowering Plants of Neotropics*. The New York Botanical Garden. Princeton University Press. 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000300016. Acesso em: 16/03/2016

ARBO, M.M. **Estudios sistemáticos en *Turnera*** (Turneraceae). III Series *Anomalae y Turnera*. **Bonplandia** 14: 115-318, 2005. Disponível em: http://ibone.unne.edu.ar/objetos/uploads/documentos/bonplandia/public/14_3_4/115_318.pdf. Acesso em: 16/03/2016

ARBO, M.M. Turneraceae. IN: KUBITZKI, K.; RHOWER, J.B.; BITTRICH, V. **The families and genera of vascular plants**. v.9, p. 458-466, 2007.

ARBO, M.M. **Turneraceae**. IN: CAVALCANTI, T.B.BATISTA, M.F. Flora do Distrito Federal, Brasil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. v. 9, pp. 285-312, 2009. Disponível em: <http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00060930.pdf>. Acesso em: 20/03/2016

ARLETTI R, B. A.; CAVAZZUTI E, S. G.; BERTOLINI, A. Stimulating property of *Turnera diffusa* and *Pfaffia paniculata* extracts on the sexual behavior of male rats. **Psychopharmacology**, v.143, p.15-19, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10227074>. Acesso em: 11/04/2016

AVELLANEDA SAUCEDO, S.S. et al. Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose. **Rev Cuba Pantas Med**, La Habana, v. 10, n. 2, Mayo/Ago 2005. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000200004. Acesso em: 13/04/2016

ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca. v. 10, p. 112-117, 2007.

ANTONIO, M.A. et al. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **J. Ethnopharmacol.** v.61, p. 215-228, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9705013>. Acesso em: 10/04/2015

AYRES, M. et al. **BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas versão 5.0**. Belém: Ong Mamiraua, 2007. Software.

BARROS, M. C. Biodiversidade na área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum. São Luís: UEMA, 2012

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Projeto Hospitais sentinela. Brasil. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/sentinela/>. Acesso em: 08/01/2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)**. 2013.

Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0533_28_03_2012.html
Acesso em: dez. 2015.

Brasil. FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 5ª edição. v. 2, 546p, 2010.

BARDAL, D. **Atividade antimicrobiana de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville em agentes causadores da mastite**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2011. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/NCAP-8SDNVD>. Acesso em: 12/02/2016

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis In: SAIF W. M. Diseases of poultry. (11ª ed.). Iowa, p. 138-144, 2003.

BELCAVELLO, L. et al. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zornia diphylla*, uma planta medicinal. **Natureza online**, v.10, n.3, p. 140-145, 2012. Disponível em: http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/08_BelcavelloLetal_140145.pdf. Acesso em: 10/06/2015

BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: FACTA, p.455-469, 2009.

BERTUCCI, R.A. et al. Initial antimicrobial activity studies of plants of the riverside forests of the southern Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19 n.1, p.20-25, jan./mar. 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000100005. Acesso em: 15/06/2015

BRATU, S. et al. Multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa in Brooklyn, New York: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B. **European J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis.** v. 24, n. 3, p. 196-201, 2005. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772821. Acesso em: 15/06/2015

BREIJ, A. **Towards an explanation for the success of *Acinetobacter baumannii* in the human host.** [pdf]. Department of Infectious Diseases: Leiden University Medical Center, 2012. Disponível em: <https://openaccess.leidenuniv.nl/handle/1887/19114>. Acesso em: 10/05/2015.

BRADFORD, P.A. Extended spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 14, p. 933-51, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89009/>. Acesso em: 10/05/2015.

BUSH, K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.1, n.1, p.109-123, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358033/>. Acesso em: 17/05/2015.

BUSSMANN, R.W. et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v.132, p.101–108, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2956840/>. Acesso em: 11/06/2015.

CARDOSO, F. L. et al. Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe rborescens* Mill. Xanthorrhoeaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 20, n.1, p. 35-40, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000100008. Acesso em: 18/05/2015.

CAUMO, K. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, Novo Amburgo, v. 11, n. 16, p.89- xx, jul./dez., 2010.

CARVALHO, A.F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.16, n.3, p.521-526, 2014. Disponível em: www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3/07.pdf. Acesso em: 10/08/2015.

CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. **Escherichia**. In: TRABULSI, L.R. et al. Microbiologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, p.215-228, 2002.

CAETANO, N. et al. Determinação de atividades antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antifi amatório. **Rev Bras Farmacogn**, v.12 (Supl.), p. 132-135. 2002. Disponível em: www.scielo.br/pdf/rbfar/v12s1/a62v12s1.pdf. Acesso em: 12/08/2015.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-first informational supplement. NCCLS document M100-521, v.34, nº.1, 2014.

COATES, A. R. M.; HU, Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. **Br. J. Pharmacol.**, v.152, n.8, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189988/>. Acesso em: 05/09/2015.

COSTA, M.C. **Investigação fitoquímica e avaliação do potencial antimicrobiano por autobiografia da Piper sp (Piperaceae)**. TCC (Monografia) - Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências da Saúde, Itajaí (SC), 2013. Disponível em: http://www.univali.br/Lists/TrabalhosGraduacao/Attachments/3210/investigacao_fitoquimica_e_avaliacao.pdf. Acesso em: 12/10/2015.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. v. 1, n. 13, p. 520-529, 2011.

CRUCES, I. L. et al. Plantas medicinais no controle de urolitíase. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, (Supl.I), p.780-788, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v15n4s1/20.pdf>. Acesso em: 02/11/2015.

DANTAS G. et al. Bacteria Subsisting on Antibiotics. **Science**. v. 320, p. 100 – 103, Apr. 2008. D’COSTA V. M. et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science**. v. 311, p. 374 - 377, Jan. 2006.

DORTA, E. J. Introdução. In: **Escala Rural: especial de plantas medicinais**. São Paulo: Escala Ltda; v.1, n. 4, p. 1-62, 1998.

DOMINGUES K. et al. Avaliação de extratos de quebra- pedra (*Phyllanthus* sp) frente à patógenos causadores de infecções no trato urinário. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.3, p.427-435, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n3/1516-0572-rbpm-17-3-0427.pdf>. Acesso em: 02/11/2015.

DUTRA, M.G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás**. Dissertação (Mestrado)- Centro Universitário de Anápolis – UniEvangélica, 2009. Disponível em: <http://www.unievangelica.edu.br/files/images/curso/mestrado.mstma/2009/maria%20da%20gl%C3%B3ria%20-%20plantas%20medicinais.pdf>. Acesso em: 13/11/2015.

DIJPA, C.D. et al. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (*Myrtaceae*). **Journ al of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 307-313, 2000. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904178. Acesso em: 03/10/2015.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Rev. Multiciência**, Campinas, v. 2, n. 7, p. 1-16, out. 2006. Disponível em: http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf. Acesso em: 13/03/2015.

DUARTE, A. F. S. **Estudos de susceptibilidade e formação de biofilmes de várias estirpes de *Acinetobacter baumannii***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2011. Disponível em: <https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/3900/1/Estudos%20de%20susceptibilidade%20e%20forma%C3%A7%C3%A3o%20de%20biofilmes%20de%20v%C3%A1rias%20estirpes%20de%20Acinetobacter%20baumannii%20-%20Andreia%20Duarte.pdf>. Acesso em: 11/04/2015

FÃO, F. Z. R. A., et al. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.1, p.91-98, jan./abr., 2012.

FARIAS, W.V.L. et al. Padrão de sensibilidade de 117 amostras clínicas de *Staphylococcus aureus* isolados em 12 hospitais. **Rev Ass Med**, v. 43, p. 199-204. 1997. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/ramb/v43n3/2036.pdf>. Acesso em: 30/01/2015.

FRANCISCO, W.; JEA, A. H. Y. **Resistência à b-lactamases por presença de ESBL**. Disponível em: <www.fleury.com.br/mednews/0301/mdcontfcb0302.htm>. Acesso em: 30/01/2015.

FAZOLIN, M. et al. Potencialidades da Pimenta-de-macaco (*Piper aduncum* L.): características gerais e resultados de pesquisa. Rio Branco, AC: **Embrapa Acre**. p.53. 2006 (Embrapa Acre. Documentos, 103).

FESSENDEN, R.J. **Organic chemistry**. Boston: Willard Grant Pres, 1982.

FERREIRA, L. L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), 2005. Disponível em: teses.icict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=056. Acesso em: 02/06/ 2015.

FERRARI, A. P. **Atividade alelopática antioxidante e antimicrobiana de plantas com uso popular antimalárico**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco 115 f., 2013. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/675>>. Acesso em: 13/01/ 2015.

FERREIRA, R. G. **Ação antimicrobiana do óleo essencial de *Piper aduncum* e dilapiol em infecções de pele**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em ciências Farmacêuticas, Belém, 2015. Disponível em: www.ppgcf.propesp.ufpa.br/ARQUIVOS/dissertacoes/roseaneferreira.pdf. Acesso em: 12/06/ 2015.

FERREIRA, E. C. et al. As propriedades medicinais e bioquímicas da planta *Stryphnodendron adstringens* “Barbatimão”. **Persp. online: bio & saúde**, v.11, n.3, p.14 -32, 2013. Disponível em:

http://www.seer.perspectivasonline.com.br/index.php/biologicas_e_saude/article/viewFile/9/7. Acesso em: 13/06/ 2015.

FILHO, V. C. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v.21, n.1, 1998. Disponível em: www.scielo.br/pdf/qn/v21n1/3475. Acesso em: 22/07/2015.

FISHBAIN, J., PELEG, A.Y. Treatment of *Acinetobacter* infections. **Clin Infect Dis**, v. 51, n.1, p. 79-84, 2010. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20504234. Acesso em: 25/07/2015.

FISHER, J. F. et al. Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. **Chemical Reviews**. v. 105, p. 395 - 424, Feb. 2005.

GARCIA, C. M. Z. et al. Estudo morfo-anatômico de *Phyllanthus niruri* L e *Phyllanthus tenellus* Roxb. **Acta. Farm. Bonaerense**, v. 23, n. 1, p. 67-70, 2004. Disponível em: www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2009000500012. Acesso em: 25/07/2015.

GALES, A.C. **Prevalência, sensibilidade a antimicrobianos e tipagem molecular de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamase de espectro ampliado**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo; 1997. Disponível em: <https://repositorio.ucs.br/xmlui/handle/11338/400>. Acesso em: 02/07/2015.

GADÉA, S. F. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana no extrato bruto e suas frações de *Glischrothamnus Ulei* (Molluginaceae) do semi-árido Baiano**. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Feira de Santana Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, BA, 2008. Disponível em: http://www2.uefs.br/ppgbiotec/portugues/arquivos/corpo%20discente/mestrado/2006/suzana_ferreira_magalhaes_gadea-dissertacao.pdf. Acesso em: 13/07/2015.

GODOY, C. S. M. **Infecções por *Acinetobacter baumannii* em adultos admitidos em unidades de terapia intensiva (UTIs) de Goiânia e Aparecida de Goiânia**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2012. Disponível em: https://posstrictosensu.iptsp.ufg.br/up/59/o/Cassia_Silva_-_Dissertacao.pdf?1338297152. Acesso em: 14/07/2015.

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin. Infect. Dis**. v. 32, (Suppl 2), p. 146-155, 2001.

GALES A.C. et al., Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin American results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 73, n. 4, p 354-60, 2012. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22656912. Acesso em: 14/07/2015.

GONZALEZ, A. M.; ARBO, M.M. Anatomy of some species of Turneraceae. **Acta. Bot. Venez.**, v. 28, p. 369-394. 2005.

GONÇALVES, A.L. et al. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 72, n. 3, p. 353-358, jul./set. 2005. Disponível em: www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V72_3/goncalves.PDF. Acesso em: 14/07/2015.

GUIMARÃES, E. F. VALENTE, M. C. Piperaceae – Piper. In: Reitz, R. (ed.). Flora ilustrada catarinense. **Herbário Barbosa Rodrigues**, Itajaí. 2001.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do nordeste brasileiro I: estado do Ceará. **Rodrig.**, v. 55, n. 84, p. 21-46, 2004.

GUIMARÃES, D. O. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GRACIOSO, J.S. et al. Antiulcerogenic activity of different extracts obtained from *Turnera diffusa* L. and *Turnera ulmifolia* L., two plants utilized in Brazilian folk. **Phytomedicine**. Suppl 7, p. 72, 2000.

GIVIZIEZ, C. R. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de Piper aduncum, Piper hispidinervum e Syzygium aromaticum e desenvolvimento de um antisséptico com princípio ativo natural.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. **Assay Methods of Antibiotic:** a Laboratory Manual, Medical Encyclopedia: New York, 1955.

GUR, S. et al. Antimicrobial activities and some fatty acids of turmeric, ginger root and linseed used in the treatment of infectious diseases. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 439-442, 2006.

HABBAL, O. et al. Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* linn (Henna) against *Pseudomonas aeruginosa*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 173-176, 2011.

HASS, A. et al. Acompanhamento farmacoterapêutico sob prescrição de antimicrobianos. Um estudo em farmácia comunitária. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar.**, v. 10, n. 2, p. 87-91, 2006.

HAUSER A.; OZER, E.A. *Pseudomonas aeruginosa*. Nature Reviews Microbiology. 2011.

JESUS, F.D. de. Uso de extrato seco de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e óleo bruto de sucupira (*Pterodon Emarginatus*) e monensina na dieta de vacas leiteiras. Dissertação

(Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Goiânia, 2015.

KARLOWSKY, J. A. et al. Stable antimicrobial susceptibility rates for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the 2001-2003 tracking resistance in the United States today surveillance studies. **Clin. Infect. Dis.** v. 15, n. 40, (Suppl 2), p. 89-88, 2005.

KALIMUTHU, K. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic crude extracts of *Turnera ulmifolia* L. **Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.** October-December, v 6, n. 4, p. 329-333, 2014.

KOLLEF, M. H. Gram-negative bacterial resistance: evolving patterns and treatment paradigms. **Clin. Infect. Dis.** v. 15, n. 40, (Suppl 2), p. 85-88, 2005.

KNOTHER, H. et al. Transferable resistance to cefataxime, cefoxitin, cefamandole, and cefuromix in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, p. 315-317, 1983.

KONEMAN, E.W. et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5ª edição, Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L.R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

LIONÇO, M.I.; DE SOUZA, T.P.; PETROVICK, P.R. Avaliação cromatográfica de polifenóis presentes nas partes morfológicas de *Phyllanthus niruri*. **In. Caderno de Farmácia**, v. 17, n. 2, p. 117 - 120, 2001. Disponível em: <www.ufrgs.br/farmacia/cadfar/.../CdF_v17_n2_p117_120_2001.pdf> Acesso em: 28/04/2015.

LIVEMORE, D. M. Beta-lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinic. Microbiol. Rev.** p. 557-584, Oct. 1995. Disponível em: <<http://cmr.asm.org/content/8/4/557.short>> Acesso em: 28/04/2015.

LIVERMORE, D.M; WOODFORD, N. Carbapenases: a problem in waiting?. **Current Opinion Microbiol**, v. 3, p 489-495, 2000. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050448> Acesso em: 22/03/2015.

LOBATO, A. K. S. et al. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Rev. Bras. de Bioc.**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 915-917, jul. 2007. Disponível em: <www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/750/626> Acesso em: 20/03/2015.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v.1, p. 352, 1992.

_____. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3ª edição, Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.

LORENZI, H.; MATOS, F.L. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

LUZHETSKYY, A.; PELZER, S.; BECHTHOLD, A. The future of natural products as a source of new antibiotics. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v.8, n.8, p. 608-13, 2007. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17668363> Acesso em: 20/03/2015.

LUZHETSKYY, A. et al. **Investig. D**, n. 8, v. 608, 2007.

LULLMANN, H. et al. **Farmacologia texto e atlas**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 416 p.

MACHADO, N. S. O. Estudo da anatomia foliar de espécies do gênero *Piper* L. (Piperaceae) no estado do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

MARTÍNEZ, J. et al. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **Intern. Microbiol.** v.7, p. 261-8, 2004. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666246> Acesso em: 20/03/2015.

MARINHO, M.G.V.; SILVA, C.C.; ANDRADE, L.H.C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Rev. Bras. de Pl. Med.**, v.13, n.2, p.170-182, 2011. Disponível em: <www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n1/1983-084X-rbpm-17-01-00133.pdf> Acesso em: 20/04/2015.

MARANHÃO, D. G. Análise situacional de seis programas de fitoterapias brasileiros. Trabalho de Conclusão de Curso TCC, Fiocruz, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/7784/2/46.pdf> Acesso em: 20/06/2015.

MACEDO, M; FERREIRA, A.R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Rev. Bras. Farmacogn.** 14(Supl. 1), p. 40-44, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2004000300016> Acesso em: 10/09/2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

_____. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

MELO, J. C. Plantas em destaque: Barbatimão (Córtex Barbatimão). **Rev. Rac.**, São Paulo, v. 45, p. 67-69, set./Out. 1998.

MELO, R.C. A. **Isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores e não produtores de kpc: relação com a presença dos genes de virulência *fimH*, *mrkD* e *irp2***. Dissertação (Mestrado Medicina Tropical)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: repositorio.ufpe.br/handle/123456789/11662. Acesso em: 11/09/2015.

MENDES, C. M. F. et al. **Microbiologia clínica: 156 perguntas e respostas**. São Paulo: Sarvier, 2005.

MINAGAWA, C. W. Estudo microbiológico fecal de linhagens de camundongos, de estirpe de *E. coli* e do meio ambiente em biotérios. São Paulo, Dissertação (Mestrado) -Universidade de São Paulo, 108 f, 2007. Disponível em: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-03042008-111549/. Acesso em: 12/05/2016.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. ***Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville**.

MIRANDA, G.S. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.15, n.1, p.104-111, 2013. Disponível em: www.scielo.br/pdf/rbpm/v15n1/a15v15n1.pdf. Acesso em: 12/02/2016.

MÖLLER, A. J. R. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. **Odontol. Tidskr.** v.74, n. 5, 1966. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5335186>> Acesso em: 14/05/2016.

MORAIS, S.M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 15, p. 169-177, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2005000200017. Acesso em: 10/06/2016.

MOREIRA, V. C. et al. *Klebsiella pneumoniae* e sua resistência a antibióticos. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/VANESSA%20CARVALHO%20MORAIS.pdf>>. Acesso em 15/05/ 2016.

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição à multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 42,n. 6, p. 465-470, 2005.

MURRAY, P.R. Laboratory Procedures for Epidemiologic Analysis. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 6ª ed., 1995.

MURRAY, P.R. et al. **Microbiologia médica**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 776 p.

MURUGAIYAH, V.; CHAN, K.L. Mechanisms of antihyperuricemic effect of *Phyllanthus niruri* and its lignan constituents. **J. of Ethnophar.**, v.124 p.233-239, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19397979>. Acesso em: 04/06/2016.

MULLER, E.D. Análise do potencial antimicrobiano, toxicidade e genotoxicidade de extratos, frações e compostos obtidos de diferentes espécies de *Piper sp.* Dissertação (Mestrado em Farmácia)- Universidade do vale do Itajaí, Itajaí (SC), 2011. Disponível em: <http://siaibib01.univali.br/pdf/Elisa%20Dalmora%20Muller.pdf>. Acesso em: 04/06/2016.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol**, v. 31, p. 247-256, 2000. Disponível em: Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822000000400003. Acesso em: 04/06/2016.

NASCIMENTO, J.E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciên. Farmacêut. Bás.e Aplic.**, Araraquara, v.29, n.2, p.143-148, 2008. Disponível em: http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/view/457/428. Acesso em: 22/06/2016.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238- 485-6). Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.

NOGUEIRA, K. S. et al. Occurrence of extended-spectrum Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 10, n. 6, p. 390-5, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702006000600006. Acesso em: 20/06/2016.

NUNES, G.P. et al. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev Bras Farmacogn**, v.13, p. 83-92, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2003000200004. Acesso em: 19/04/2016.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C, M.; TOBOUTI, N.R. Et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier. 3ª. ed. v. 1. 544p. 2010.

OLIVEIRA, C.C. et al. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de plantas do Cerrado**. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Fortaleza, p.114, 1994. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000200012. Acesso em: 19/07/2016.

OLIVEIRA, W. F. et al. Utilização de diferentes meios de cultura para o isolamento de enterobactérias em amostras fecais de frangos de corte procedentes de explorações industriais do Estado do Ceará, Brasil. **RPCV**, v. 99, n.552, p. 211-214, 2004. Disponível em: http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf12_2004/552_211_214.pdf. Acesso em: 09/03/2016.

OLIVEIRA, R.A.G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16: 77-82. 2006. Disponível em: www.scielo.br/pdf/rbfar/v16n1/a13v16n1. Acesso em: 15/03/2016.

OLIVEIRA, F. P. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 16, P.510-516, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000400013. Acesso em: 17/06/2015.

OLIVEIRA, B. E. D. et al. **Estudo Fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Phyllanthus Niruri* (Quebra - Pedra) em *Escherichia coli***. Congresso Norte e Nordeste de Pesquisa e Inovação (VII CONNEP). Palmas – Tocantins, 2012. Disponível em: <http://prop.i.iftto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/viewFile/1812/1795>. Acesso em: 17/06/2015.

ORJALA, J. et al. Chromenes and a prenylated benzoic acid derivative from *Piper aduncum*. **Phytochemistry**, v.34, n.3, p.813-818, 1993.

ORJALA, J. et al. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. **Journal of Natural Products**, v.57, n.1, p.18-26, 1994.

O’KENNEDY, R. THORNES, R.D. **Coumarins: biology, applications and mode of action**. New York: John Willey, 1997.

PADILHA, I.Q.M. et al. Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. From Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.20 n.1, p.45-47, Jan./Mar. 2010.

PALLERONI, N. et al. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 23, p. 333-339, 1973. Disponível em: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-23-4-333>. Acesso em: 11/02/2015.

PAYNE, D. J. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v. 6, n.1, p. 29-40, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17159923>. Acesso em: 11/02/2015.

PATERSON, D.L. et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. **Antimicrob. Agent. Chemother**, n.39, p. 2206–12, 2001. Disponível em: <http://jcm.asm.org/content/39/6/2206>. Acesso em: 01/04/2015.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 4, 597-673. 1997. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942297003282>. Acesso em: 03/07/2015.

PAREKH, J.; CHANDA, S.V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turk J. Biol.**, v. 31, p. 53-58, 2007. Disponível em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.465.1644&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 03/07/2015.

PELEG, A.; SEIFERT, H.; PATERSON, D. Acinetobacter baumannii: Emergence of a Successful Pathogen. **Clin. Microb. Rev.**, v. 21, n. 3, p. 538 – 582. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18625687>. Acesso em: 08/03/2015.

PEREZ, F. et al. Global Challenge of Multidrug-Resistant Acinetobacter Baumannii. In: **MINIREVIEW - Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p.3471-3484, 2007. Disponível em: <http://aac.asm.org/content/51/10/3471.full.pdf>. Acesso em: 08/08/2015.

PINHO, D. S. et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharistriamera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.20, n. 2, p. 165-170, Abr./Mai. 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2010000200005. Acesso em: 13/07/2015.

PINHO, et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Rev. Cien. Rur.** 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000200022. Acesso em: 05/09/2015.

PITT, T. L. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and related genera. P1115-1138. In: Collier, L.; Balows, A., Sussman, M. (eds). Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. Systematic bacteriology. v. 2, 1998.

POLLACK, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell, D.; Benneths, J.; Dolin, R. (eds.). **Principles and practice of infections diseases**, 1995.

PORFÍRIO, Z. et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Hidroalcoólicos de Lafoensia Pacari A. St.-Hil., Lythraceae, frente a Bactérias Multirresistentes de Origem Hospitalar. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19 n. 33, p. 85-89, Jul / Set., 2009. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000500023. Acesso em: 05/09/2015.

PHILIPPON, A.; LABIA, R.; JACOBY, G. Extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC172613/>. Acesso em: 25/03/2015.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1ª ed. Porto Alegre: editora Artmed, 512 p, 2005.

RADCLIFFE-SMITH, A. Genera Euphorbiacearum. **Royal Botanic Gardens**, Kew, 2001.

RANG, H. P; DALE, M. M.; RITTER, J. M. *Farmacologia*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA (RDC) n.º 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. 18 mar. 2004.

REZENDE, H.A., COCCO, M.I.M. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. **Revista Escola Enfermagem**, USP, v. 36, n. 3, p. 282-8, 2002.

RIBEIRO, C. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Pará, Belém. 67p, 2008.

ROOLINS, D.M.; JOSEPH, S.W. *Enterobacteriaceae*. Disponível em <<https://medic.med.utm.tmc.edu>>. Acesso em: 12/03/2015.

RODRIGUES, R.R. Trilhas do parque da Esalq. Árvores medicinais. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, Departamento de Botânica, p. 28, 1996.

RODRIGUES-MARTINEZ, J. M. et al. Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n.8, p. 3484-88, 2010. Disponível em: <http://aac.asm.org/content/54/8/3484.long>. Acesso em: 12/03/2015.

ROSSOLINI, G.M. Acquired metallo- β -lactamases: na increasing clinical threat. **Clin.Infect. Dis.** v.41, n. p.1557-1558, 2005. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/content/41/11/1557.full>. Acesso em: 05/02/2015.

ROSÁRIO, A. C. A.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica da espécie *Phyllanthus niruri* L. (quebra-pedra). **Estação Científica (UNIFAP)**. Macapá, v. 6, n. 1, p. 35-41, 2016. Disponível em:<<https://periodicos.unifap.br/index.php/estacao>> Acesso em: 14/03/2015.

ROSA, R.L. et al. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Rev. bras. plantas medicinais**. vol.14, n.2, pp. 306-310, 2012.

SADER, H. S. Principais problemas de resistência bacteriana encontrados pelos Programas SENTRY no Brasil. **SENTRY News**, v. 2, p. 1-7, 2000.

SADER, H. S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **BJID**. v. 5, n. 4, p. 201-213, 2001. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702001000400006> Acesso em: 06/05/2015.

SADER, H. S, JONES, R.N. Comprehensive in vitro evolution of cefepime combined with aztreonam or ampicilina/sulbactam against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. **Int. J. Antimicrob Agents**. v. 25, n. 5, p. 380-4, 2005. Disponível em:<www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15848291> Acesso em: 07/07/2015.

SANTOS, D. F. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial. Goiânia (GO); Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) Universidade Católica de Goiás, 2006. Disponível em:<<http://docplayer.com.br/4744026-Characterísticas-microbiológicas-de-klebsiella-pneumoniae-isoladas-no-meio-ambiente-hospitalar-de-pacientes-com-infecção-nosocomial.html>> Acesso em: 02/10/2015.

SANTOS, S.C. et al. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.16, p. 552-556, 2006. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2006000400019> Acesso em: 02/11/2015.

SANTOS, S.C. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, n.2, p. 215-9, 2007. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000200014> Acesso em: 22/09/2015.

SANT'ANA, P. J. P. **Bioprospecção no Brasil: Contribuições para uma gestão ética**. Paralelo 15, 220 p., 2002.

SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. **Clin. Infect. Dis**. v. 32, (Suppl 2), p. 146-155, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11320452>. Acesso em: 12/09/2015.

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

STEVENS, P. F. Angiosperm phylogeny website. Version 6 May 2005. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Apweb/>. Acesso em: 04/05/2015.

SMÂNIA, A. et al. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal of Ethnopharmacology**, v.45, p.177-181, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887419401212I>. Acesso em: 04/05/2015.

STERN, J.L.; et al. Phlorotannin-protein interactions. **J. of Ch. Ecol.**, v.22, p.1887-1899, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227114>. Acesso em: 04/08/2015.

SIROT, D. et al. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 20, p. 323-334, 1987. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3316146. Acesso em: 13/08/2015.

SILVA, A. E. P. et al. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica da *Turnera ulmifolia* L. (Chanana) em células eucarióticas. **Rev. Saúde em foco**, Teresina, v. 2, n. 1, art. 3, p. 25-48, jan./jul. 2015. Disponível em: www4.fsnet.com.br/revista/index.php/saudeemfoco/article/view/694. Acesso em: 23/08/2015.

SILVA, C. H. P. M. Beta-lactamases de espectro estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial. **Rev. Bras. de Anál. Clín.**, v. 32, n. 3, p. 215-219, 2000. Disponível em: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/>. Acesso em: 20/08/2015.

SILVA, K. M. R. A. CATANHA, M. T. J. A. Avaliação da atividade cicatrizante da *Turnera ulmifolia* L. em epiderme de camundongos. **Anais do XVIII Conic e II Coniti**, 2010. Disponível em: <http://www.unicap.br/simcbio/wp-content/uploads/2014/09/AN%C3%81LISE-DA-ATIVIDADE-CICATRIZANTE-DA-Turnera-subulata.pdf>. Acesso em: 20/05/2016.

SILVA, G.S. Atividade antibacteriana de plantas do cerrado da região de Botucatu. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010. Disponível em: repositorio.unesp.br/handle/11449/121205. Acesso em: 20/05/2016.

SILVA, C.H.P.M.; SALVINO, C.R. Importância do Reconhecimento das Enterobactérias Hospitalares Produtoras de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e suas Implicações Terapêuticas. **Newslab** (41):104-112, 2000.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.** v. 90, n. 2, p. 124-128, 2009. Disponível em:

http://rbfarma.org.br/files/pag_124a128_metodologia_atividades_239.pdf. Acesso em: 18/05/2016.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p, 2004.

SIQUEIRA, A. L.; TIBÚRCIO, J. D. **Estatística na área da saúde** – Conceitos, metodologias, aplicações e prática computacional. Belo Horizonte: Coopmed, 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Guia ilustrado para identificação das famílias da Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SOARES, S.P. et al. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. **Rev. Odonto. ciênc.**, v.23, n.2, p.141-44, 2008. Disponível em: <https://www.ufpe.br/ijd/index.php/exemplo/article/viewFile/138/136>. Acesso em: 18/05/2016.

SOUSA JUNIOR, M.A.; FERREIRA, E.S.; CONCEIÇÃO, G.C. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL):um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. **NewsLab** - edição 63 – 2004.

SUARÉZ, C.; GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** 27, 116, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19254642>. Acesso em: 18/05/2016.

TESKE, M; TRENTINI, A. M. M. **Compêndio de Fitoterapia**. Curitiba: Herbarium Lab. Bot. Ltda. 04ª Ed, 2001.

TERRAS, F.R.G. et al. Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors. **Plant Physiology**, v.103, p.1311-19, 1993. Disponível: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC159121/pdf/1031311.pdf>>. Acesso em: 14/06/2016.

TOLEDO, C.E.M. **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae)**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

TORTOGA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Trad [Roberta Marchiori Martins]. 8ª Ed. Porto Alegre:Artmed, 2005.

TOSIN, I. Avaliação do modo de disseminação da resistência bacteriana a antibacterianos nos hospitais brasileiros. São Paulo: [s. n.], 2001.

TORSSEL, B.G. **Natural product chemistry**: a mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. New York: John Willey, 1989. 401p. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793\(83\)80059-3/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793(83)80059-3/full)>. Acesso em: 06/05/2016.

TORRES, A.H.; et al. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas. **Rev. Esp. Quimiot.**, v. 23, n. 1, p.12-19, 2010. Disponível em:<<http://seq.es/seq/0214-3429/23/1/hernandez.pdf>>. Acesso em: 06/05/2016.

TORRES, A. C. G. et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. **Braz. J. Infect. Dis.** v.8, n. 4, p.267-71, 2004. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/bjid/v8n4/a01v08n4.pdf>>. Acesso em: 06/05/2016.

THOMSON, K. S. New plasmid-mediated beta-lactamases of gram-negative pathogens: clinical and laboratory implications. **Dade MicroScan Inc.**, 1997.

THULIN, M. Et al. Phylogeny of the Turneraceae clade (Passifloraceae *s.l.*): Trans- Atlantic disjunctions and two new genera in Africa. **Taxon**, v. 61, n.2, p. 308-23, 2012. Disponível em:<[http://www.bergianska.se/polopoly_fs/1.99927.1346930987!/menu/standard/file/Thulin%20et%20al%20\(2012\).pdf](http://www.bergianska.se/polopoly_fs/1.99927.1346930987!/menu/standard/file/Thulin%20et%20al%20(2012).pdf)>. Acesso em: 06/02/2016.

TRABULSI, R. L., SAMPAIO, F. **Microbiologia**. Edª 5ª. São Paulo, Editora Atheneu, 2015.

TSAKRIS, A. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, n.3, p. 1290-92, 2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88610/>>. Acesso em: 06/02/2016.

TURANO, H. G. **Alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes endêmicas no Brasil**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2012. Disponível em:<file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/HelenaGabrielaTurano_Mestrado_P_Corr.pdf> Acesso em: 03/04/2016.

URBAN, I. **Monographie der familie der Turneraceen**. Berlin: Gebruder Borntraeger (Ed. Eggers), 1883.

UMED, O. *Klebsiella* infections. **Microbiology Gulbarga Univ**. Disponível em:<<https://medicineinstantaccesstothemindsofmedicine>>. Acesso em: 07/04/2015.

VALADEAU, C. et al. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **J. of Ethnoph.**, v.123, n.3, p.

413-22, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514108>> Acesso em: 10/12/2015.

VASCONCELOS M.C. et al. Avaliação de atividades biológicas das sementes de *Stryphnodendron obovatum* Benth (Leguminosae). **Rev. Bras Farmacogn.**, v. 14, n.1, p. 121-127, 2004. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v14n2/a05v14n2.pdf>>. Acesso em: 14/03/2016.

VERCAUTEREN, E. et al. Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum Beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian Teaching Hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, n. 9, p. 2191-2197, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC229938/>>. Acesso em: 14/03/2016.

VIEIRA, J. E.V. et al. Pharmacologic screening of plants from Northeast Brazil. II. **Rev. Bras. Farm.**, v. 49, p. 67-75, 1968.

VIEIRA, S. **Análise de variância (ANOVA)**. 1ª Ed. São Paulo: Atlas, 2006.

WALL, M. E. et al. Plant antimutagenic agents, General bioassay and isolation procedures. **J. Nat. Prod.**, v. 51, n.5, p. 866-73, 1988. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50059a009?journalCode=jnprdf>>. Acesso em: 12/09/2015.

WALSH, C. Where will new antibiotics come from?. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.1, n.1: p.65-70, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15040181>>. Acesso em: 14/10/2015.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência bacteriana: uma guerra perdida? *Uso Racional de Medicamentos: Temas Seleccionados*, v. 1, n. 4, p. 1-6, 2004.

ZHANG, Y.; LEWIS, K. Fabinins: new antimicrobial plant peptides. **FEMS Microbiological Letters**, v.149, p.59-64, 1997. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10308.x/pdf>>. Acesso em: 14/10/2015.