



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

Avaliação in vitro da atividade antibacteriana e moduladora da resistência a antibióticos do extrato etanólico e frações de *Croton campestris* A.

CRATO – CE,
2014

ANNE KARYZIA LIMA SANTOS DE LAVOR

Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e moduladora da resistência a antibióticos do extrato etanólico e frações de *Croton campestris* A.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas M. Coutinho

CRATO – CE,
2014

Lavor, Anne Karyzia Lima Santos de.
L414a Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e moduladora da resistência a antibióticos do extrato etanólico e frações de *Croton campestris* A./ Anne Karyzia Lima Santos de Lavor. – Crato-CE, 2014.

114p. il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri- URCA.
Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas M. Coutinho

1. Atividade antibacteriana; 2. Atividade moduladora;
3. Aminoglicosídeos; 4. *Croton campestris*; 5. Resistência microbiana; I. Título.

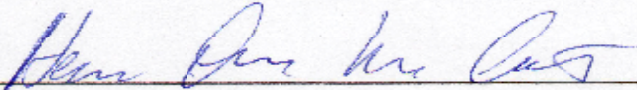
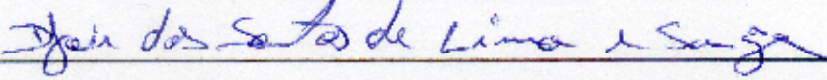
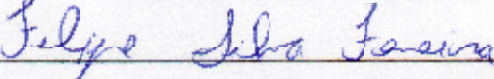
CDD: 615.323

ANNE KARYZIA LIMA SANTOS DE LAVOR

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Dissertação apresentada em: 25 / 02 / 2014

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Orientador) Departamento de Ciências Biológicas - URCA

Prof. Dr. Djair dos Santos de Lima e Souza (Avaliador externo) Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA

Prof. Dr. Felipe Silva Ferreira (Suplente) Universidade Regional do Cariri - URCA
Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes (Suplente) Universidade Regional do Cariri - URCA

Dedico às pessoas que são as peças fundamentais na minha vida, meu filho **Felipe Gabriel Lima Alves**, minha mãe **Maria Irascilda Lima Santos**, meu pai **José Romão dos Santos Neto**, minhas tias **Maria Salete de Lima** e **Francisca Maria Lima**, minha irmã **Allana Kellen Lima Santos Pereira**. E meu esposo **Joelio Alves de Lavor**. Sem vocês eu não conseguiria...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por renovar minha fé a cada dia e fazer-me perseverar mesmo quando os obstáculos pareciam-me intransponíveis!

Aos meus pais, **José Romão dos Santos Neto** e **Maria Irascilda Lima Santos** que me deram a vida e os ensinamentos de vivê-la com dignidade. Que iluminaram os meus caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo e cheia de esperanças. A vocês, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus.

Ao meu amado filho, **Felipe Gabriel Lima Alves**, por existir na minha vida, sei que sem você não teria chegado até aqui e o quanto era doloroso deixá-lo a cada despedida. Você me incentivou a caminhar com firmeza, a vencer desafios, a ter forças para continuar com abraços, beijos e sorrisos a cada reencontro, foi o alívio para os estresses e decepções com olhar carinhoso e porto seguro para nossos medos. Junto a você, filho, encontrei o amor...

As minhas irmãs, **Allana Kellen Lima Santos Pereira** e **Anielle Kênia Lima Santos**, que tanto amo, por me incentivar em apoiar em todas as etapas da minha vida. Obrigada pelo companheirismo, carinho e ombro amigo.

A meu esposo, **Joelio Alves de Lavor** pelo seu companheirismo, por estar ao meu lado apoiando e torcendo em todas as etapas da minha vida.

As minhas tias, **Maria Salete de Lima** e **Francisca Maria Lima**, (segundas mães) por todo apoio, carinho, amizade, compreensão que me proporcionaram não somente nesta etapa, mas durante toda vida. Agradeço por sempre estarem presentes em minha caminhada.

A toda minha família pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador prof. Dr. **Henrique Douglas Melo Coutinho**, pelos ensinamentos, oportunidade, apoio, parceria, amizade e paciência.

Ao Prof. Me. **Edinardo Fagner Ferreira Matias** pelas orientações dos trabalhos realizados.

Ao Prof. Dr. **José Galberto Martins da Costa** e a equipe do LPPN pelo auxílio das etapas iniciais da nossa pesquisa, pela boa receptividade e zelo com o desenvolvimento dos trabalhos.

A **Faculdade Leão Sampaio- FALS**, por ter cedido seu Laboratório para a realização da pesquisa como alternativa de um melhor acompanhamento pelo Prof. Msc. Edinardo Fagner Ferreira Matias.

A **todos os meus professores das disciplinas** do mestrado pela riqueza dos seus conhecimentos transmitidos.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, em reconhecimento por sua luta pela valorização e melhoria das condições de funcionamento do mestrado, pelo empenho, dedicação, orientação e acolhimento durante todo o tempo que estive vinculada ao programa de pós-graduação em Bioprospecção Molecular nas pessoas do Coordenador o Prof. Dr. **Allysson Pontes Pinheiro** e Vice-Coordenador, o Prof. Dr. **Irwin Rose Alencar Menezes**.

A banca de defesa: Prof. Dr. **Djair dos Santos de Lima e Souza**, Prof. Dr. **Felipe Silva Ferreira** e Prof. Dr. **Irwin Rose Alencar Menezes** pela disponibilidade.

A **Universidade Regional do Cariri- URCA** pela oportunidade de crescimento e por ceder o espaço para a realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular- LMBM, **Jacqueline Cosmo, Elba Souza, Nadghia Leite, Fernando Figueredo, Luciene Ferreira, Dara Isabel, Liscássia Beatriz, Audilene Freitas, Glauca Guedes, Rosemeire Sabino, João Vitor, Saulo Tintino e Joara Nályda**.

A **Nadghia Leite** pelo carinho, atenção, paciência, disponibilidade, apoio, lealdade, amizade e ensinamentos. Você é uma pessoa de Deus.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Maria Andecieli Rolim de Brito** e **Maria Lenira Pereira**, que pelo desempenho de suas de suas funções proporcionam um serviço de qualidade a todos que fazem o Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular.

A CAPES, FUNCAP e CNPQ pelo auxílio financeiro para a ampliação das pesquisas.

Agradecida pela colaboração de todos vocês, e por aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a elaboração desta Dissertação os meus mais sinceros agradecimentos. Sem o apoio de vocês não seria possível à realização desta pesquisa.

Muito obrigada.

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras no caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.

Mas, se você tiver grandes sonhos...
Seus erros produzirão crescimento,
Seus desafios produzirão oportunidades,
Seus medos produzirão coragem”

Augusto Cury

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ANEXOS.....	V
RESUMO.....	IV
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO	
1.1 Apresentação.....	21
1.2 Bioprospecção Molecular e Pesquisa com Produtos Naturais.....	22
1.3 Produtos Naturais no Brasil.....	24
1.4 Microrganismos e Infecções.....	24
1.4.1 Bactérias.....	25
1.4.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.4.1.2 <i>Escherichia coli</i>	27
1.4.1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
1.5 Resistência Bacteriana.....	29
1.5.1 Mecanismo da Resistência Bacteriana.....	30
1.6 Aminoglicosídeos.....	31
1.7 Resistência à Aminoglicosídeos.....	32
1.8 Potencial Modulador.....	33
1.9 Vegetais com Importância Antimicrobiana e Farmacológica.....	34
1.9.1 Gênero <i>Croton</i>	34
1.9.2 <i>Croton campestris</i> A.....	36
1.10 Justificativa da Pesquisa.....	37
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral.....	40
2.2 Objetivos Específicos.....	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Drogas e Reagentes.....	42
3.2 Material Permanente e Equipamentos Utilizados.....	42

3.3 Metodologia Geral.....	43
3.4 Seleção e Coleta do Material Botânico.....	44
3.5 Preparação e Obtenção do Extrato Etanólico e Frações de <i>Croton campestris</i> A.....	45
3.6 Preparo das Soluções a Partir do Extrato.....	46
3.6.1 Preparo da Solução Inicial e das Soluções de Teste.....	46
3.7 Prospecção Fitoquímica.....	47
3.8 Microrganismos.....	47
3.9 Meios de Cultura.....	48
3.10 Preparo e Padronização de Inóculos Bacterianos.....	48
3.11 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	49
3.11.1 Preparo dos Inóculos Bacterianos.....	49
3.11.2 Execução e Leitura dos Ensaios.....	49
3.12 Avaliação da Interferência dos Extratos Sobre à Resistência aos Antibióticos Aminoglicosídeos.....	51
3.12.1 Execução e Leitura dos Ensaios.....	51
3.13 Análise Estatística.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 ARTIGO 1	
4.1.1- Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antibacteriana e moduladora de produtos naturais extraídos das folhas de <i>Croton campestris</i> A. (euphorbiaceae) (Original em Inglês).....	56
4.2 ARTIGO 2	
4.2.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antibacteriana e moduladora das Frações Metanólica e Acetato de etila extraídos das folhas de <i>Croton campestris</i> A. (euphorbiaceae) (Original em Inglês).....	74
5. CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXOS	
APÊNDICES	

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- EAFEECC – Ethyl Acetate Fraction of Ethanolic Extract of *Croton campestris*
- ATCC – American Type Culture Collection
- BHI – Breat Heart Infusion
- CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CE – Ceará (Brasil)
- CIM – Concentração Inibitória Mínima
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- DFEECC – Dichloromethane Fraction of Ethanolic Extract of *Croton campestris*
- DMSO – dimetilsulfóxido
- EC – *Escherichia coli*
- EECC – Ethanolic Extract of *Croton campestris*
- EECC – Extrato Etanólico de *Croton campestris*
- FAEECC – Fração Acetato de Etila do Extrato Etanólico de *Croton campestris*
- FALS – Faculdade Leão Sampaio
- FDEECC – Fração Diclorometano do Extrato Etanólico de *Croton campestris*
- FeCl₃ – Cloreto Férrico
- FHEECC – Fração Hexânica do Extrato Etanólico de *Croton campestris*
- FMEECC – Fração Metanólica do Extrato Etanólico de *Croton campestris*
- FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- HFEECC – Hexanic Fraction of Ethanolic Extract of *Croton campestris*
- HIA – Heart Infusion Agar
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
- LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (URCA)
- LPPN – Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (URCA)
- MFEECC – Methanolic Fraction of Ethanolic Extract of *Croton campestris*
- MIC – Minimum Inhibitory Concentration
- PA – *Pseudomonas aeruginosa*
- Ph – Potencial hidrogeniônico
- SA – *Staphylococcus aureus*
- UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia por mililitro

UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi- Árido

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

URCA – Universidade Regional do Cariri

µg/mL– microgramas por mililitro

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

Figura 1.1 - Diferenças morfológicas das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.....	26
Figura 1.2 - A) <i>Staphylococcus aureus</i> ; B) <i>Escherichia coli</i> C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
Figura 1.3 - Arbusto de <i>Croton campestris</i> A.....	36

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 3.1 - Metodologia Geral.....	43
Figura 3.2 - Mapa ilustrativo da região de coleta do material vegetal.....	44
Figura 3.3 - Preparação do extrato etanólico.....	45
Figura 3.4 - Preparação da solução para testes.....	47
Figura 3.5 - Padronização e preparo do inóculo bacteriano.....	49
Figura 3.6 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	50
Figura 3.7 - Avaliação da atividade moduladora dos extratos frente à aminoglicosídeos.....	52

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo 1

- Figura 1** - Atividade moduladora de antibióticos do Extrato Etanólico de *Croton campestris* (EECC) em associação com aminoglicosídeos..... 71
- Figura 2** - Atividade moduladora de antibióticos da Fração Hexânica do Extrato Etanólico de *Croton campestris* (FHEECC) em associação com aminoglicosídeos..... 71
- Figura 3** - Atividade moduladora de antibióticos da Fração Diclorometano do Extrato Etanólico de *Croton campestris* (FDEECC) em associação com aminoglicosídeos 72

Artigo 2

- Figura 1** - Atividade moduladora de antibióticos da Fração Metanólica do Extrato Etanólico de *Croton campestris* (FMEECC), em associação com aminoglicosídeos 91
- Figura 2** - Atividade moduladora de antibióticos da Fração Acetato de etila do Extrato Etanólico de *Croton campestris* (FAEECC) em associação com aminoglicosídeos 92

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO

Tabela 1 -	Relação de aminoglicosídeos, sua origem e ano de descoberta.....	31
-------------------	--	----

3 MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1	Drogas e Reagentes utilizadas nos ensaios.....	42
Tabela 2	Extrato seco e rendimento (g).....	46
Tabela 3 -	Fontes das cepas bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.....	48

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo 1

Tabela 1 -	Fontes das cepas bacterianas e perfil de resistência a antibióticos	72
Tabela 2 -	Extrato seco e rendimento das frações etanólicas (g).....	73
Tabela 3 -	Prospecção fitoquímica do extrato e frações de <i>Croton campestris</i>	73

Artigo 2

Tabela 1 -	Fonte das cepas bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.....	90
Tabela 2 -	Extrato seco e rendimento das frações metanólica e acetato de etila (g).....	90
Tabela 3 -	Prospecção fitoquímica das frações de <i>Croton campestris</i>	91

APÊNDICE

- Tabela 1 -** Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos do extrato etanólico de *Croton campestris* A.
- Tabela 2 -** Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos da fração hexânica obtida do extrato etanólico de *Croton campestris* A
- Tabela 3 -** Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos da fração diclorometano obtida do extrato etanólico de *Croton campestris* A.
- Tabela 4 -** Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos da fração acetato de etila obtida do extrato etanólico de *Croton campestris* A.
- Tabela 5 -** Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos da fração metanólica obtida do extrato etanólico de *Croton campestris* A.

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 -** Comprovante de artigo aceito para publicação – ARTIGO 1
In vitro Evaluation of the Antibacterial and Modulatory-Antibiotic Activity of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)
- Anexo 2 -** Comprovante de submissão – ARTIGO 2
In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)
- Anexo 3** Comprovante de artigo aceito para publicação
Avaliação da atividade citotóxica e potencial antiparasitário *in vitro* do α -pineno e carvacrol.
- Anexo 4** Comprovante de artigo aceito para publicação
Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*.
- Anexo 5** Comprovante de publicação
Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenácea* DC. As Tool to validate the Ethnobiological Usage.
- Artigo 6** Comprovante de publicação
Use of natural products to enhance the antibiotic activity of gentamicin and other aminoglycosides: the future of antibiotic therapy.

RESUMO

A espécie *Croton campestris* A., popularmente conhecida como velame-do-campo, é um arbusto de origem brasileira e ocorre especialmente nas regiões nordeste e sudeste. É amplamente empregada pela população como poderoso depurativo e entre outras aplicações anti-infecciosa. *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* representam duas das principais espécies bacterianas causadoras de doenças infecciosas humanas que apresentam elevada capacidade de desenvolver resistência a antibióticos. O presente trabalho tem como objetivo avaliar em ensaios *in vitro* a atividade antibacteriana e moduladora da resistência a antibióticos do extrato etanólico e frações de *Croton campestris* A. Todos os ensaios foram realizados *in vitro* e para isto foi preparado o extrato etanólico, obtendo-se as frações hexânica (FHEECC), diclometano (FDEECC), acetato de etila (FAEECC) e metanólica (FMEECC). A avaliação e identificação das classes de metabólitos secundários presentes no extrato foi realizada através da prospecção fitoquímica, seguindo o método descrito por Matos, 1997. Os testes se baseiam na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos, tendo sido detectada a presença de taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leucoantocianidinas, catequinas e flavononas. Extrato etanólico e as frações obtidas das folhas da espécie vegetal foram analisados para a atividade antibacteriana por meio de teste de microdiluição para determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e modulação de aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e neomicina). Os testes foram realizados em triplicata, onde os resultados foram expressos como média geométrica. Para análise estatística foi aplicada a two-way ANOVA seguida do teste de Bonferroni *posttests*. Considerando significância estatística $p < 0,001$. A avaliação da CIM, do extrato e frações revelaram valores $CIM \geq 1024 \mu\text{g/mL}$ frente todas as linhagens bacterianas testadas. Porém, não ocorreu atividade clinicamente relevante. Os testes de modulação da resistência bacteriana e de interações entre os produtos naturais e os antibióticos, mostraram que as interações do EECC, FDEECC e FHEECC com os aminoglicosídeos potencializaram sua ação reduzindo a concentração de antibiótico utilizado frente todas as linhagens bacterianas testadas, reafirmando sua atividade moduladora, onde apresentaram atividade moduladora mais efetiva quando comparado às frações FAEECC e FMEECC, contudo os resultados não inviabilizam a utilização destas frações para tais testes. Com os resultados obtidos, *Croton campestris* A., demonstrou ser uma promissora fonte de pesquisa na área de produtos naturais com ação moduladora.

Palavras-chaves: atividade antibacteriana, atividade moduladora, aminoglicosídeos, CIM, *Croton campestris*, resistência microbiana.

ABSTRACT

The species *Croton campestris* A., popularly known as canopy-of-the-field, is a shrub originally from Brazil and occurs especially in the northeast and southeast regions. Is widely employed by the population as a powerful cleanser, and among other anti-infective applications, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* represent two of the main bacterial species that cause infectious human diseases showing a high capacity to develop resistance to antibiotics. This study aims to evaluate in vitro antibacterial activity and antibiotic resistance modulator of the ethanol extract and fractions of *Croton campestris* A. All assays were performed in vitro and for that the ethanolic extract was prepared, yielding hexane fractions (HFEECC), dichloromethane (DFEECC), ethyl acetate (AFEECC) and methanol (MFEECC). The evaluation and identification of secondary metabolites classes present in the extract was performed by phytochemical prospection, following the method described by Matos, 1997. The tests are based on visual observation of color change or precipitate formation after addition of specific reagents, having detected the presence of tannins, flavones, flavonols, xanthones, chalcones, auronas, flavononóis, leucoanthocyanidins, catechins and flavanones. Ethanolic extract and fractions obtained from the leaves of plant species were analyzed for antibacterial activity by the means of microdilution test for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and modulation of aminoglycosides (amikacin, gentamicin and neomycin). Tests were performed in triplicate, where the results were expressed as geometric means. For the statistical analysis was applied to two-way ANOVA followed by the Bonferroni *posttests* test. Considering statistical significance $p < 0,001$. The evaluation of the MIC, of the extract and fractions showed MIC values ≥ 1024 mg / mL up against all bacterial strains tested. However, did not occur clinically relevant activity. The tests of modulation of bacterial resistance and of the interactions between natural products and antibiotics, showed that the interactions of the EECC, DFEECC and HFEECC with aminoglycosides potentiated its action by reducing the concentration of antibiotic used in all bacterial strains tested reaffirming its modulatory activity, where showed modulating activity more effective when compared to the fractions AFEECC and MFEECC, however the results do not set aside the use of these fractions for such tests. With the obtained results, *Croton campestris* A., proved to be a promising source of research in the area of natural products with modulating action.

Keywords: antibacterial activity, modulatory activity, aminoglycosides, MIC, *Croton campestris* A., microbial resistance.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos principais: identificar por meio de prospecção fitoquímica, as principais classes de metabólitos secundários presentes na espécie *Croton campestris* A. e, paralelamente, investigar suas possíveis atividades biológicas, para isto foram utilizadas como ferramentas ensaios *in vitro*, com o intuito de avaliar as atividades antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico das folhas de *C. campestris* e suas frações descritas a seguir: Fração Hexânica de *Croton campestris* (FHEECC), Fração Diclorometano de *Croton campestris* (FDEECC), Fração Acetato de etila de *Croton campestris* (FAEECC) e Fração Metanólica de *Croton campestris* (FMEECC).

Diante dos objetivos propostos, os resultados e discussões desta dissertação foram organizados em dois artigos. A disposição dos experimentos se deu de forma a agrupar os dados no formato de artigos originais, seguindo as normas de formatação propostas pelo corpo editorial de revistas científicas selecionadas de acordo com a área de concentração dos trabalhos.

No artigo 1, intitulado “*In vitro* Evaluation of the Antibacterial and Modulatory-Antibiotic Activity of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)”, identificou-se a composição de metabólitos secundários no extrato etanólico de folhas de *C. campestris* e nas frações hexânica e diclorometano. Os ensaios microbiológicos avaliaram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato, frente às cepas padrão e multirresistente de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Em seguida, investigou-se a atividade modulatória do extrato e de suas frações, quando associados a fármacos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e neomicina), frente às cepas previamente citadas.

No artigo 2, intitulado “*In vitro* Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)”, identificou-se a composição de metabólitos secundários das frações acetato de etila e metanólica obtidos através do extrato etanólico de folhas de *C. campestris*. Os ensaios microbiológicos, realizados em triplicata, avaliaram a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações, frente às cepas padrão e multirresistente de *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Em seguida, investigou-se a atividade modulatória das frações, quando associados a fármacos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e neomicina), frente às cepas previamente citadas.

Croton campestris A. é uma espécie nativa da Caatinga popularmente conhecida como velame-do-campo. Possui vasto uso popular sendo usado como poderoso depurativo, bem como para doenças venéreas, tumorais, artrismos, diarreia, dentre outras. Por apresentar atividades antimicrobianas comprovadas, foi verificado se o extrato, obtido das folhas da espécie, e suas frações possuíam atividade moduladora de antibiótico. Portanto, optou-se por produzir o extrato etanólico e a partir deste, as frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e metanólica.

1.2 Bioprospecção Molecular e Pesquisa com Produtos Naturais

A bioprospecção é definida como uma pesquisa de material biológico que tem como objetivo a produção dos seus recursos genéticos (AZEVEDO, 2003). A partir desta definição, a bioprospecção molecular, de forma multidisciplinar (envolvendo as ciências biológicas, química e da saúde), objetiva obter informações importantes quanto à aplicabilidade de moléculas e substâncias químicas oriundas de material biológico para várias finalidades, ao mesmo tempo salientando a importância do seu uso sustentável (MATIAS *et al.*, 2010).

O profundo conhecimento do arsenal químico da natureza pelos povos antigos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para a descoberta de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo (VIEGAS JR. BOLZANI, 2006), embora este conhecimento exposto pelas populações seja processado empiricamente, ao longo dos anos vem sendo elaborados distintos métodos para comprovação científica da eficácia de produtos naturais na cura de doenças. De forma indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, farmacologia, botânica e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a fonte medicinal natural: a flora do mundo (LÓPEZ, 2006).

A biodiversidade brasileira é a mais rica do planeta: inclui de 15 a 25% de todas as espécies vegetais e apresenta elevado grau de endemismo. Com distintas hipóteses, uma delas é que esta biodiversidade tem sido explorada extensivamente desde a ocupação do território sul-americano por populações indígenas que para cá migraram partindo do continente asiático, há cerca de 15.000 anos (FUSELLI *et al.*, 2003).

O termo produto natural é atribuído ao material biológico que oferece substâncias com moléculas bioativas, que podem ser únicas a um único organismo ou comuns a um grupo de organismos relacionados filogeneticamente (MANN, 1998).

As substâncias naturais compreendem aproximadamente 11,5% do total de prescrições na medicina moderna e metade dos 25 medicamentos mais vendidos no mundo seja, direta ou indiretamente, são oriundos de produtos naturais de plantas. Assim, os herboristas, como também, as companhias farmacêuticas dependem em grande parte da natureza para a produção de drogas com fins comerciais (SIMÕES *et al.*, 2002).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelos vegetais como uma consequência do metabolismo secundário, também são reconhecidas empiricamente há muito tempo e foram apenas recentemente comprovadas cientificamente (JANSEN *et al.*, 1987). Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas exóticas também têm sido relatados em vários países tais como Brasil, Cuba, Índia, Jordânia e México, que possuem uma diversificada flora e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antifúngico ou antibacteriano. (AHMAD, 2001; MAHASNEH, 1999; DUARTE, 2005).

Muitas plantas têm sido avaliadas não apenas para demonstrar de forma direta seu potencial antimicrobiano, mas também como fontes de substâncias com potencial de serem agentes capazes de modificar a atividade antibiótica (GIBBONS, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Muitos extratos de plantas fornecem o seu potencial pela presença de substâncias tais como: compostos fenólicos e taninos. Essas substâncias são em geral encontradas em diversas partes das plantas como folhas, raízes, casca. Diversas plantas têm-se, por isso, tornado fontes de importantes drogas, e as indústrias farmacêuticas têm explorado a medicina tradicional como uma fonte de agentes bioativos que podem ser usados na preparação de medicamentos sintéticos, no controle e tratamento de várias infecções e enfermidades (JUNAID *et al.*, 2008).

A busca por fitoconstituintes ativos para formulação de fitoterápicos sugere um trabalho interdisciplinar. Neste sentido, preconiza-se que as pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina popular e tradicional (etnobotânica); isolamento, purificação e caracterização dos princípios ativos (química orgânica: fitoquímica); investigação farmacológica dos constituintes químicos isolados e extratos (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacologia) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A

integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais leva a um caminho eficaz e promissor para descobertas de novos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2002)

Novas necessidades e novos conhecimentos com certeza encontrarão no reino vegetal soluções, através da descoberta e desenvolvimento de moléculas novas com atividade terapêutica, ou com aplicações na tecnologia farmacêutica ou no desenvolvimento de fitoterápicos com uma maior eficiência de ação (SIMÕES *et al.*, 2010).

1.3 Produtos Naturais no Brasil

Neste aspecto, o Brasil tem a vantagem de contar com uma biodiversidade exuberante e uma área fértil extensa. Isso permite indicar que, qualquer que seja a política nacional com relação à pesquisa científica, ela deve sempre levar em consideração a necessidade de estudar os compostos presentes na nossa diversidade vegetal. Contudo, sabe-se que diversas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de adulterantes ou contaminantes presentes nas preparações fitoterápicas, exigindo um rigoroso controle na qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração dos seus constituintes, até a preparação do medicamento final (ELVIN-LEWIS, 2001).

1.4 Microrganismos e Infecções

O mundo possui uma extensa diversidade de microrganismos. Essencialmente podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, estando também presentes sobre o interior e exterior do organismo humano, desde o nascimento até a morte. Constituindo a flora ou microbiota normal (TORTORA *et al.*, 2008).

Microrganismos são seres microscópicos, individualmente minúsculos para serem vistos a olho nu. Devido a seu arranjo estrutural e celular são classificados em procarióticos e eucarióticos. Apresentam uma variedade de formas celulares e distintos tipos de reações químicas. O grupo de microrganismos inclui bactérias, fungos, protozoários, vírus e algas microscópicas (VERMELHO *et al.*, 2006; TORTORA *et al.*, 2008).

Segundo Tortora *et al.*, (2008), uma pequena parte dos microrganismos são patogênicas, responsáveis por diversas infecções. Porém a maioria realiza a manutenção do equilíbrio entre os organismos vivos e os compostos químicos do ambiente, contribuindo para a manutenção dos ecossistemas.

As doenças infecciosas tem sido a causa de morte de muitas pessoas em todo o mundo. Quando um patógeno invade um hospedeiro suscetível, seu processo, ou parte do seu ciclo vital ocorre dentro dele e ao final, frequentemente, o surgimento de enfermidades (MURRAY *et al.*, 2010). Embora a proporção do total de mortes causadas por infecções tenham caído de 50% para 5% ao longo dos últimos oitenta anos, as doenças infecciosas continuam sendo um problema de saúde pública no Brasil (BARRETO *et al.*, 2011).

Nesta pesquisa abordaremos apenas um grupo microbiano de reconhecida relevância clínica: as bactérias.

1.4.1 Bactérias

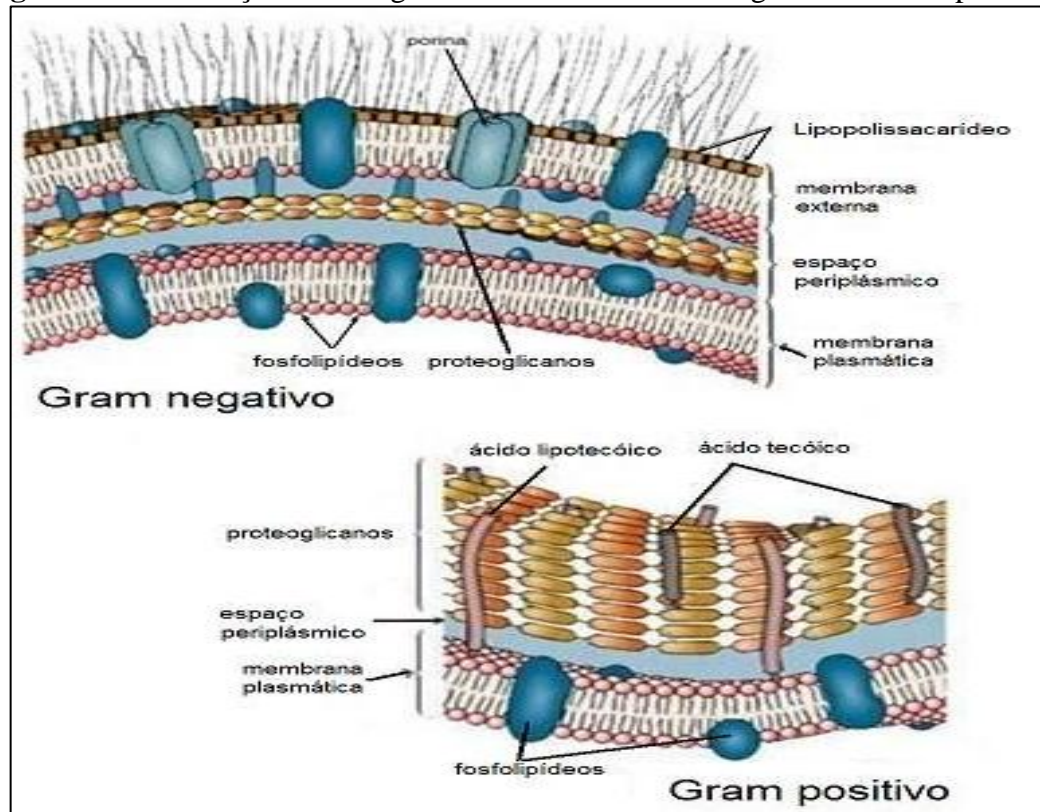
As bactérias são organismos simples, de uma única célula, cujo material genético não está envolto por uma membrana nuclear especial, sendo por esta razão nomeados procariotos. As milhares de espécies de bactérias são caracterizadas por diversos fatores, incluindo a morfologia (forma), a composição química (comumente detectada por reações de coloração), as atividades bioquímicas, as necessidades nutricionais, e a fonte de energia (luz solar ou química) (TORTORA *et al.*, 2008).

Quanto à composição química da parede celular as bactérias são classificadas em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas.

Nas bactérias gram-positivas, a parede celular é composta por diversas camadas de peptidoglicano, que impedem a passagem de compostos hidrofóbicos, devido à presença de aminoácidos e açúcares, constituindo uma estrutura espessa e rígida. Além de possuir na sua constituição, ácidos teicóicos, que consistem fundamentalmente em um álcool (glicerol) e fosfato (SCHAECHTER *et al.*, 2002; TORTORA *et al.*, 2008).

Por outro lado, a parede celular das bactérias Gram-negativas consiste de uma ou poucas camadas de peptidoglicano e uma membrana externa. Devido à pequena quantidade de peptidoglicano as bactérias Gram-negativas são mais susceptíveis ao rompimento mecânico. A membrana externa formada fundamentalmente por lipoproteína, lipopolissacarídeos e fosfolipídios desempenha várias funções especializadas, atribui uma barreira para enzimas digestivas (lisozima), certos antibióticos (penicilina), os detergentes, os sais biliares, os metais pesados e certos corantes (TORTORA *et al.*, 2008). As diferenças estruturais entre as células bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas encontram-se evidenciadas na figura 1.1.

Figura 1.1: Diferenças morfológicas das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.



Fonte: <http://www.medicinageriatrica.com.br/2008/07/06/bacterias-gram-positivas-e-gram-negativas/>. Acesso em 15 de outubro de 2013.

Neste trabalho iremos abordar três espécies bacterianas de reconhecida importância clínica são elas:

1.4.1.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcae, ao lado dos gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*. Hoje em dia, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, destas 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (SANTOS *et al.*, 2007). Usualmente, esse gênero está presente na microbiota normal da pele humana, além de estar presente nas fossas nasais, garganta e intestinos. Desses locais anatômicos, as narinas possuem o índice de colonização mais elevado (CAVALCANTI *et al.*, 2005). A espécie estafilocócica de maior interesse é o *Staphylococcus aureus* (Imagem 2A), designada assim por causa da pigmentação amarelada das colônias (*aureus* = Dourado). Recentemente é um dos microrganismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo (CASSETTARI *et al.*, 2005; TORTORA *et al.*, 2008).

Bactéria Gram-positiva, *Staphylococcus aureus*, apresenta-se como cocos esféricos, de quase 0,5 a 1,5µm de diâmetro, não-esporulados, imóveis, e na maioria das vezes não-encapsulados (TRABULSI *et al.*, 2005). Os participantes desta espécie são germes anaeróbios facultativos, com temperatura ótima de crescimento em torno de 30 a 37°C (BRESOLIN *et al.*, 2005).

Staphylococcus aureus cresce relativamente bem em condições de alta pressão e baixa umidade, o que explica em parte a sua capacidade de crescimento e sobrevivência nas cavidades nasais e em certos alimentos que, pelas referidas condições de pressão e umidade, tendem a inibir os outros microrganismos. Devido a uma considerável resistência ao calor, células vegetativas de *S. aureus* podem tolerar até 60°C por 30 minutos. Sua resistência à dessecação e a radiação também ajudam a sua sobrevivência na superfície da pele, para onde são transportadas a partir das cavidades nasais do hospedeiro. *S. aureus* produz diversas toxinas que alargam a sua capacidade de invadir e causar danos aos tecidos. As infecções mais comuns envolvem a pele e feridas em sítios distintos. Algumas infecções são agudas, piogênicas e podem espalhar para outros tecidos, provocando focos metastáticos. Quadro mais grave como bacteremia, pneumonia, endocardite, miocardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais são descritos com frequência (LOWY, 1998). Além de infecções, *S. aureus* pode causar distintas intoxicações, seja por conta de um processo infeccioso ou não, como intoxicação alimentar e síndrome do choque tóxico (SILVA *et al.*, 2007).

1.4.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (Figura 1.2B) é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Enterobacteriaceae usualmente encontrada no intestino grosso de seres endotérmicos, tornando-se reconhecida como um patógeno versátil e um comensal inofensivo (VOGT *et al.*, 2005).

E. coli são encontrados na forma de bastonetes gram-negativos, não esporulados, tamanho aproximadamente entre 1,1-1,5 µm por 2-6 µm. São microrganismos anaeróbios facultativos, uma vez que, possuem o metabolismo fermentativo e respiratório, com temperatura de crescimento entre 18° - 44° C. Normalmente encontradas na microbiota intestinal do homem, o local específico é intestino grosso de seres endotérmicos (VOGT *et al.*, 2005; FORTES, 2008).

A bactéria *E. coli* é avaliada um patógeno versátil e muitas vezes inofensiva, porém, as linhagens infecciosas são designadas *E. coli* enterovirulentas, dividindo-se em quatro grupos:

E. coli enterotoxigênica (doença diarreica em indivíduos de todas as faixas etárias), *E. coli* patogênica (gastroenterites com diarreia aquosa e sanguinolenta, predominante em crianças com menos de um ano) *E. coli* enterohemorrágica (enterocolite hemorrágica em indivíduos de todas as faixas etárias) e *E. coli* invasora (diarreia sanguinolenta ou não, com presença de leucócitos e muco) (TRABULSI *et al.*, 2004).

1.4.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (Imagem 1.2C), um bacilo Gram-negativo aeróbio, normalmente habita a água, o solo, vegetais e ambientes hospitalares (equipamentos, água, desinfetantes e utensílios), e ainda faz parte da microbiota normal do ser humano, sendo encontrada na garganta, pele e fezes de indivíduos saudáveis. Por apresentar mínimas exigências para seu crescimento, possui ampla distribuição ambiental (SILVA, 1999; MURRAY *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2007).

As infecções causadas por *P. aeruginosa* variam desde lesões superficiais na pele até septicemias fulminantes. Este microrganismo causa infecções oportunistas, em processos cirúrgicos queimaduras, meningites, cateterização urinária, endocardites e pneumonias, especialmente após processo de entubação, o que pode resultar em severas bacteremias (MURRAY *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007).

Figura 1.2: A - *Staphylococcus aureus*; B- *Escherichia coli*; C- *Pseudomonas aeruginosa*



Modificada a partir de <http://golly-gee.org/tag/staph/>;
<http://www.astrographics.com/GalleryPrintsIndex/GP2144.html>; <http://fineartamerica.com/featured/3-pseudomonas-aeruginosa-bacteria-sem-steve-gschmeissner.html>.

1.5 Resistência Bacteriana

O conhecimento a respeito da resistência a agentes químicos e físicos entre os microrganismos data de tempos antigos, essa resistência ocorreu devido à introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica específica. As bases para o tratamento farmacológico das infecções por microrganismos datam de 1936, com a utilização clínica de sulfamidas em humanos e a produção de benzilpenicilina em 1941, o que colaborou, nas três décadas seguintes, para o aumento de oito anos da perspectiva média de vida da população (DIAS e MONTEIRO, 2010). O aparecimento dos quimioterápicos trouxe durante algum tempo conforto e despreocupações às populações humanas, pois se acreditava que enfermidades existentes seriam curadas e que seria primada e preservada a qualidade de vida. Desde os anos de 1940, o desenvolvimento de fármacos efetivos e seguros para lidar com as infecções bacterianas revolucionou o tratamento médico, a morbidade e a mortalidade associadas a estas doenças foram drasticamente diminuídas (RANGE *et al.*, 2007). Porém, a história tomou outra direção quando se observou que as pessoas permaneciam suscetíveis aos mais diversos tipos de infecções, e que esta condição vinha sendo alarmantemente ampliada em relação a um amplo número de microrganismos. O que ocorria é que em um pequeno espaço de tempo surgiam linhagens de microrganismos resistentes à droga e capazes de sobreviver ao tratamento realizado (VERMELHO *et al.*, 2007).

A resistência microbiana a múltiplos antimicrobianos e agentes quimioterápicos impõe sérios obstáculos às opções para o tratamento de infecções, representando uma ameaça para a saúde da população. Ela é uma inevitável consequência do uso indiscriminado e de maneira maciça dessas drogas em animais e humanos, associado a fatores como doses subterapêuticas, inefetividade da droga selecionada, baixa penetração no local, esquemas terapêuticos curtos da infecção e do conhecimento indevido das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do fármaco para escolha terapêutica (SILVEIRA *et al.*, 2006; COUTINHO *et al.*, 2010).

Para conseguir combater a resistência microbiana atualmente estão sendo utilizadas combinações múltiplas de drogas. Essas combinações vêm sendo utilizadas também entre produtos naturais, antibiótico e substâncias isoladas com o objetivo de alterar a ação dos antibióticos, seja revertendo à resistência ou aumentando a atividade antibiótica (COUTINHO *et al.*, 2008).

A situação atual da resistência às drogas tem origem em muitos fatores, incluindo a transferência de determinantes genéticos de resistência entre cepas bacterianas, seleção de

mutantes resistentes por exposição a agentes antimicrobianos e disseminação clonal de cepas resistentes entre pacientes hospitalizados e entre instituições hospitalares. Como consequência está o aumento da morbidade e mortalidade entre pacientes, a redução do número de drogas utilizáveis por futuras gerações de pacientes, além do impacto econômico trazido pelos custos com infecções (McGOWAN JR, 2004).

Durante muitas décadas, foram desenvolvidos fármacos visando combater, de modo eficaz, infecções bacterianas, ocasionando a diminuição da mortalidade causada por doenças microbianas (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Hoje em dia o problema da resistência microbiana tornou-se mais grave devido às grandes dificuldades para a descoberta e o lançamento de novos antimicrobianos no mercado o que impõe sérios obstáculos às opções para o tratamento de infecções, representando uma ameaça para a saúde pública (FERRONATTO *et al.*, 2007).

1.5.1 Mecanismo da Resistência Bacteriana

Os dois principais fatores envolvidos no desencadeamento da resistência aos antibióticos em bactérias são a pressão seletiva e a presença de genes de resistência (WITTE, 2000). A resistência de uma bactéria a um determinado antibiótico é determinada, quando ocorre *in vitro*, crescimento em concentrações mais altas que a maior concentração alcançada pela droga no sítio da infecção (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005; TORTORA *et al.*, 2008).

Os microrganismos muitas vezes adquirem resistência através de dois mecanismos moleculares: os bioquímicos que incluem a produção de enzimas que inativam a droga e os genéticos, como exemplo as mutações (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Através do desenvolvimento de mecanismos bioquímicos, as bactérias podem adquirir resistência aos antibióticos, impossibilitando o antibiótico de realizar o seu mecanismo de ação no interior ou exterior da célula bacteriana (ANDRADE; 2013).

Segundo Vermelho *et al.*, (2007), os agentes antimicrobianos são importantes porque geralmente possuem como alvos de ação vias metabólicas, estruturas celulares, ou enzimas que são específicas para bactérias e não para o hospedeiro. Entretanto, uma diversidade de mecanismos acaba mediando à resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos, dentre eles, inativação do antibiótico pelas enzimas, ocorrendo a modificação química da estrutura da droga, e no aumento da síntese de substrato com o qual a droga compete; alterações no alvo das drogas, de forma que a ligação da droga ou a inibição da função não ocorrem; diminuição

da permeabilidade da célula bacteriana à droga, o que resulta na incapacidade do agente alcançar o seu alvo em uma concentração crítica e o efluxo do antibiótico da célula, a modificação ou destruição do quimioterápico, tornando o seu transporte para o interior da célula ou o reconhecimento do alvo impossíveis de ocorrerem.

Nos mecanismos genéticos a resistência desenvolvida por diversas bactérias pode ser determinada pelo seu genoma, que codifica a expressão de moléculas capazes de neutralizar os efeitos dos antibióticos (FERREIRA, 2007). A mutação é um mecanismo caracterizado pelo grande número de divisões que ocorre na bactéria, resultando na troca de bases nitrogenadas durante a síntese do DNA, ocorrendo alterações nas características genéticas da célula bacteriana. (JACOBY, 2005; TORTORA *et al.*, 2008).

1.6 Aminoglicosídeos

Os antibióticos aminoglicosídeos são parte importante do arsenal terapêutico antibacteriano desde sua descoberta, na década de 40. As pesquisas que culminaram com o descobrimento desta classe de antibióticos iniciaram-se em 1939, no Departamento de Microbiologia da Unidade de Agricultura Experimental da Universidade Rutgers, de New Jersey, nos Estados Unidos. Em 1943, após examinar diversos actinomicetos de solo Waksman e colaboradores (Tavares, 2001) isolou uma cepa de *Streptomyces griseus*, que produzia uma substância que inibia o crescimento do bacilo da tuberculose e de vários microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, e a partir deste ocorrido, em 1944, a estreptomicina foi isolada. Logo então, foi descoberta uma linha de novas substâncias com potencial antibacteriano, derivadas dos actinomicetos como mostra a tabela 1, assim como os aminoglicosídeos semi-sintéticos, amicacina e netilmicina derivados da canamicina e sisomicina, respectivamente (GILBERT *et al.*, 1995).

Tabela 1: Relação de aminoglicosídeos, sua origem e ano de descoberta.

Nome	Origem	Ano
Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	1944
Neomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949
Canamicina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957
Paromomicina	<i>Streptomyces fradiae</i>	1959
Gentamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	1963
Tobramicina	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	1968
Amicacina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1972
Netilmicina	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1975

Espectinomicina	<i>Streptomyces spectabilis</i>	1962
Sisomicina	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1970
Dibecacina	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1971
Isepamicina	<i>Micromonospora purpurea</i>	1978

A atividade antimicrobiana dos aminoglicosídeos ocorre especialmente em meio aeróbio e em pH alcalino, pois precisa de oxigênio para transporte ativo nas células microbianas e é mais ativo em meio alcalino do que ácido. A farmacocinética de todos os aminoglicosídeos é muito semelhante. (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

1.7 Resistência à Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são antibióticos inibidores da síntese protéica, exibem atividade antimicrobiana contra um extenso espectro de microrganismo como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (aeróbicos), micobactérias e protozoários (PINSETTA, 2010). A atividade bactericida destes antibióticos deve-se a capacidade de inibir a síntese protéica por se ligarem à subunidade ribossomal 30S, tornando o ribossomo bacteriano incapaz para a tradução, o que resulta em morte celular (KOTRA *et al.*, 2000). Os aminoglicosídeos também podem causar danos à membrana por alterar sua permeabilidade e composição, alterar as concentrações iônicas da célula e interferir nos processos de replicação e transcrição (FOURMY *et al.*, 1996). Na maioria das vezes são utilizados no tratamento de septicemias, bacteriemias, endocardites em associação com vancomicina e tuberculose (KATZUNG, 2010).

O grupo aminoglicosídeos é isolado de *Micromonospora* spp. (gentamicina) ou *Streptomyces* spp. (estreptomina, neomicina e trombamicina), ou provindos por semi-síntese (amicacina, netilmicina, arbecacina e isepamicina e outros) (DURANTE-MANGONI *et al.*, 2009). São moléculas hidrofílicas, formadas por um anel hexose, que estão unidos a vários açúcares aminados, através de ligações glicosídicas, mas ativos em pH alcalino. O principal mecanismo de resistência estabelecido clinicamente é a produção de uma enzima chamada transferase, que inativa o aminoglicosídeo por acetilação, adenilação ou fosforilação. Outros mecanismos são relatados como a diminuição na concentração de aminoglicosídeo no interior da célula alvo, pela redução da penetração na célula bacteriana e a alteração ou destruição da proteína 30S, local alvo de ligação do aminoglicosídeo (KATZUNG, 2010).

1.8 Potencial Modulador

A pesquisa de novas substâncias antibacterianas é importante e indispensável devido ao avanço progressivo da resistência de patógenos clinicamente importantes, para as classes de antibióticos conhecidos (COSTA *et al.*, 2007).

Modificadores da atividade antibiótica é um termo usado para substâncias que modulam ou mesmo que reverterem a resistência bacteriana a alguns antibióticos, como é o caso de vários produtos naturais de origem vegetal (fitoconstituintes, extratos ou substâncias isoladas) que alteram a susceptibilidade microbiana a antibióticos por inibição de bombas de efluxo (GIBBONS, 2004; COSTA *et al.*, 2008) que são proteínas complementares da membrana citoplasmática bacteriana e que tem sido responsabilizadas por vários casos de resistência a drogas, as quais são lançadas para fora da célula (PIDDOC, 2006).

Hoje em dia, combinações múltiplas de drogas estão sendo empregadas no combate à disseminação de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos. Relatos indicam que diferentes combinações antibióticas testadas *in vitro* e aplicados em clínicas são muito comuns, é o caso da combinação de gentamicina com a penicilina. Essa combinação vem sendo utilizada também entre produtos naturais de origem vegetal e antibiótico que vai alterar a sua ação, seja revertendo à resistência ou aumentando a atividade antibiótica (COUTINHO *et al.*, 2008).

Quando a substância utilizada na combinação, aumenta a atividade do antibiótico, ou seja, intervém de forma positiva, é dito que provoca um efeito sinérgico. Ao contrário, quando há uma diminuição ou inativação da ação dos antibióticos frente à substância ocorrerá o efeito antagônico (CANTON; ONOFRE, 2010).

Segundo Katzung (2010) o sinergismo antimicrobiano possuem alguns mecanismos importantes: 1) Inibição das enzimas de inativação e 2) Ampliação da absorção do agente antimicrobiano.

Devido a determinados fatores as combinações sinérgicas entre produto natural, antimicrobianos e substância isolada se mostram, na maioria das vezes, mais efetivas quando comparada a monoterapia com componentes individuais (ANDRADE, 2013).

A ação sinérgica de produtos naturais junto a antimicrobianos é conhecida e normalmente utilizados no tratamento terapêutico, determinando uma diminuição na sua CIM (MATIAS *et al.*, 2010a; SOUSA *et al.*, 2011).

1.9 Vegetais com Importância Antimicrobiana e Farmacológica

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e/ou prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (DUTRA, 2009). Ainda hoje, o uso de plantas medicinais, muitas vezes, é o único recurso terapêutico de diversas comunidades e grupos étnicos. Em distintas regiões e cidades do país, verifica-se o cultivo de plantas medicinais com o alvo terapêutico em hortos caseiros e sua comercialização em feiras livres e mercados populares (ETHUR *et al.*, 2011).

O aumento do consumo de plantas medicinais em todo o mundo tem sido atribuído a vários fatores e justificado de forma diferenciada. Segundo Tomazzoni *et al.*, (2006) dentre os fatores relacionados ao crescente interesse pelo uso de plantas medicinais estão o alto custo dos medicamentos industrializados, a crise econômica, a falta de acesso da população à assistência médica e farmacêutica e uma tendência dos consumidores em utilizar produtos de origem natural.

Grandes empresas farmacêuticas têm investido intensamente na pesquisa de plantas que produzam princípios ativos medicamentosos, cultivando-as de modo sustentável, sem o comprometer o meio ambiente (RIBEIRO, 2001).

1.9.1 Gênero *Croton*

A família Euphorbiaceae, que inclui 280 gêneros e aproximadamente 7500 espécies, disseminadas em todo o mundo especialmente nas regiões tropicais, com menor ocorrência em regiões temperadas e raramente em regiões frias. Os maiores centros de dispersão encontram-se na África e nas Américas (HELUANI *et al.*, 2000).

O gênero *Croton*, cujo nome significa “carrapato”, é o segundo maior da família Euphorbiaceae e pertencente à subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae (BRAGA, 1976). É subdividido em 40 secções, das quais 350 espécies distribuídas em 29 secções ocorrem no Brasil (BERRY, 2006). Destas, um total de 52 espécies distribuídas em 18 secções são referidas para a região Nordeste (CORDEIRO; CARNEIRO- TORRES, 2006).

Espécies do gênero *Croton* recebeu atenção de diversos estudiosos (BAILLON, 1858; MUELLER, 1865, 1866, 1873; BENTHAM, 1880), destacando-se Webster (1993), que propôs a classificação infragenérica mais recente para o gênero. Desde o tratamento de Mueller (1873), não existe uma revisão de *Croton* para o Brasil, o que dificulta o reconhecimento de suas espécies. Embora constitua o principal ponto de partida para estudos

sobre o gênero, a Flora Brasiliensis (MUELLER, 1873) se encontra desatualizada devido às recentes sinonimizações, publicação de novos táxons e mudanças na sua classificação infragenérica. Estudos tratando de *Croton* no Nordeste ainda estão dispersos na literatura, ficando restritos a trabalhos florísticos e/ou fitossociológicos (CORDEIRO, 1995; LUCENA, 2001; CARNEIRO-TORRES *et al.*, 2002).

No ecossistema terrestre o *Croton* é um grupo funcionalmente importante. Várias de suas espécies são pioneiras, colonizando locais perturbados, tais como beira de estradas, clareiras de matas e margens de rios. Essa característica se deve principalmente a produção massiva de flores e frutos durante a maior parte do ano, o que torna suas espécies indicadas para a restauração de áreas degradadas (LIMA; PIRANI, 2008). Além disso, *Croton* possui forte potencial econômico, especialmente para a indústria farmacêutica, devido aos diversos metabólitos secundários, como alcalóides, flavonoides e terpenóides que conferem propriedades terapêuticas a muitas espécies (RIZSCK, 1987; PAYO *et al.*, 2001).

Diversas espécies de *Croton* há muito tempo desempenham papel importante nos usos tradicionais de plantas medicinais na Ásia, África e América do Sul. Tais usos incluem tratamento de câncer, constipação intestinal, diarreia e outros problemas digestivos, feridas externas, febre, vermes intestinais, diabetes, hipertensão, inflamação, úlcera, dor e obesidade (SALATINO *et al.*, 2007).

Espécies do gênero *Croton* atraem o interesse para seu estudo devido à diversidade do uso tradicional, atividades biológicas e como fonte promissora de novos e interessantes compostos naturais bioativos (DOURADO, 2003).

Várias espécies de *Croton* têm um látex vermelho que contém, em algumas espécies, pró-antocianidinas e/ou alcalóides (SALATINO *et al.*, 2007).

Estudos, envolvendo diversas espécies do gênero *Croton*, têm mostrado diferentes atividades farmacológicas tais como: a anti-helmíntica e efeito cardiovascular de *Croton zehntneri* (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2007), moluscicida de *Croton campestris* (BABILI *et al.*, 2006), antiinflamatória de *Croton cuneatus* (SUÁREZ *et al.*, 2006), antinociceptiva de *Croton urucurana* (RAO *et al.*, 2007), anticancerígeno de *Croton flavens*, mutagênica e antioxidante de *Croton lechleri* (LOPES; LOPES *et al.*, 2004).

1.9.2 *Croton campestris* A.

A espécie *Croton campestris* A. (Figura 1.3), popularmente distinguida como velame-do-campo, é um arbusto de 1-2 metros de altura originário do Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões sudeste e nordeste (CORRÊA, 1975). Conhecida popularmente como velame do campo, velame verdadeiro ou curraleira. Sobre seu aspecto etnobotânico, suas folhas e raízes, sob a forma de chá, são utilizadas na medicina popular em doenças inflamatórias e parasitárias (RIBEIRO PRATA *et al.*, 1993). E há relatos na literatura sobre o uso de outras espécies de *Croton* na forma de infusão ou decocto das raízes e folhas, e chás das cascas do caule (SALATINO *et al.*, 2007).

Possui ainda vasto emprego tradicional, como poderoso depurativo, usado no combate à escrofulose, doenças venéreas, tumores, impigens, moléstias de pele, reumatismos, úlcera do útero, artrismo e diarreia (SANTOS, 2005; CRUZ, 1982).

Figura 1.3: Arbusto de *Croton campestris* A.



Fonte: LAVOR, 2012

Trata-se de uma espécie largamente distribuída na região neotropical (CARNEIRO – TORRES, 2009). No Brasil, sua presença é verificada em praticamente toda a Região Nordeste, estendendo-se até o estado de Minas Gerais (LUCENA, 2001). Frequentemente, é encontrada em vegetação de Caatinga, embora também ocorra em brejos de altitude, cerrados e restingas.

Ao longo de sua área de distribuição, *C. campestris* apresenta ampla variação morfológica quanto ao tamanho, forma das folhas, cor e indumento. No entanto, pode ser diferenciada das demais espécies, especialmente, pela columela do fruto tripartida no ápice após a deiscência do fruto. Caracteriza-se, ainda, pelos tricomas estrelados-porrectos adensados nas estruturas vegetativas e reprodutivas (SILVA *et al.*, 2009).

Ultimamente, alguns estudos têm revelado o potencial fitoquímico e farmacológico do *Croton campestris* A. Do extrato butanólico das folhas foram isolados quatro flavonoides, todos *O*-glicosídeos da quercetina (SANTOS, 2005; PUEBLA *et al.*, 2002). No “screening” fitoquímico realizado com o extrato etanólico bruto das folhas (EBF) de *Croton campestris* foi confirmada a presença de alcalóides (RIBEIRO PRATA *et al.*, 1993).

Segundo RIBEIRO PRATA *et al.* (1993) o extrato bruto das folhas de *Croton campestris*, apresentou efeito sobre algumas preparações farmacológicas tais como: relaxamento de preparações isoladas da musculatura lisa intestinal, uterina e da árvore brônquica de cobaias.

Croton campestris A. apresenta atividade purgativa (BABILI *et al.*, 1998), moluscida (BABILI *et al.*, 2006), antimicrobiana (MATIAS, 2010) e gastroprotetora (BRITO JÚNIOR, 2010),

Estudos relatam a presença de duas substâncias, velamona e velamolona, que podem ser responsáveis ou agir em sinergismo com outras moléculas, contribuindo para a atividade anticâncer (MONTEIRO, 2012).

1.10 Justificativa da Pesquisa

No Brasil, especialmente na Região Nordeste, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem essencial importância no tratamento das patologias que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão oral dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS, 1989).

A partir das informações obtidas no referencial teórico sobre os aspectos fitoquímicos, etnobotânicos, etnofarmacológicos e quimiossistemáticos disponíveis, ficaram demonstradas a relevância quanto à busca de se conhecer potencialidades antibacterianas do extrato etanólico e as frações hexânica (FHEECC), diclorometano (FDEECC), acetato de etila (FAEECC) e metanólica (FMEECC) obtidas das folhas da espécie vegetal *Croton campestris* A. (velame do campo) podendo assim descobrir nessa planta tão importante na cultura

popular de moradores da região Nordeste um poderoso fitoterápico aliado ao desenvolvimento de novas terapias.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar em ensaios *in vitro* a atividade antibacteriana e moduladora da resistência a antibióticos do extrato etanólico e frações de *Croton campestris* A.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Realizar o fracionamento do extrato etanólico bruto de *Croton campestris* nas frações hexânica, diclorometano, acetato de etila e metanólica.
- ✓ Identificar por meio de prospecção fitoquímica as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato e frações.
- ✓ Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e frações obtidos a partir das folhas de *Croton campestris* A., oriundos da Biorregião do Araripe mais efetivos sobre as linhagens bacterianas patogênicas *in vitro*.
- ✓ Verificar a eficácia do extrato e frações obtidos a partir de folhas de *Croton campestris* A., na modulação da resistência bacteriana à aminoglicosídeos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Drogas e reagentes

Quanto às drogas e os reagentes utilizados, estes estão relacionados na tabela 1 com suas respectivas procedências:

Tabela 1. Drogas e Reagentes utilizadas nos ensaios.

SUBSTÂNCIAS	ORIGEM
Acetato de Etila	QEEL, Brasil
Amicacina	Sigma, EUA
Brain Heart Infusion (BHI)	HIMEDIA, India
Diclorometano	QEEL, Brasil
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Merck, Alemanha
Etanol	Dinâmica, Brasil
Gentamicina	Sigma, EUA
Hexano	QEEL, Brasil
Metanol	QEEL, Brasil
Neomicina	Sigma, EUA
Resazurina	Sigma , EUA

3.2 Material Permanente e Equipamentos Utilizados

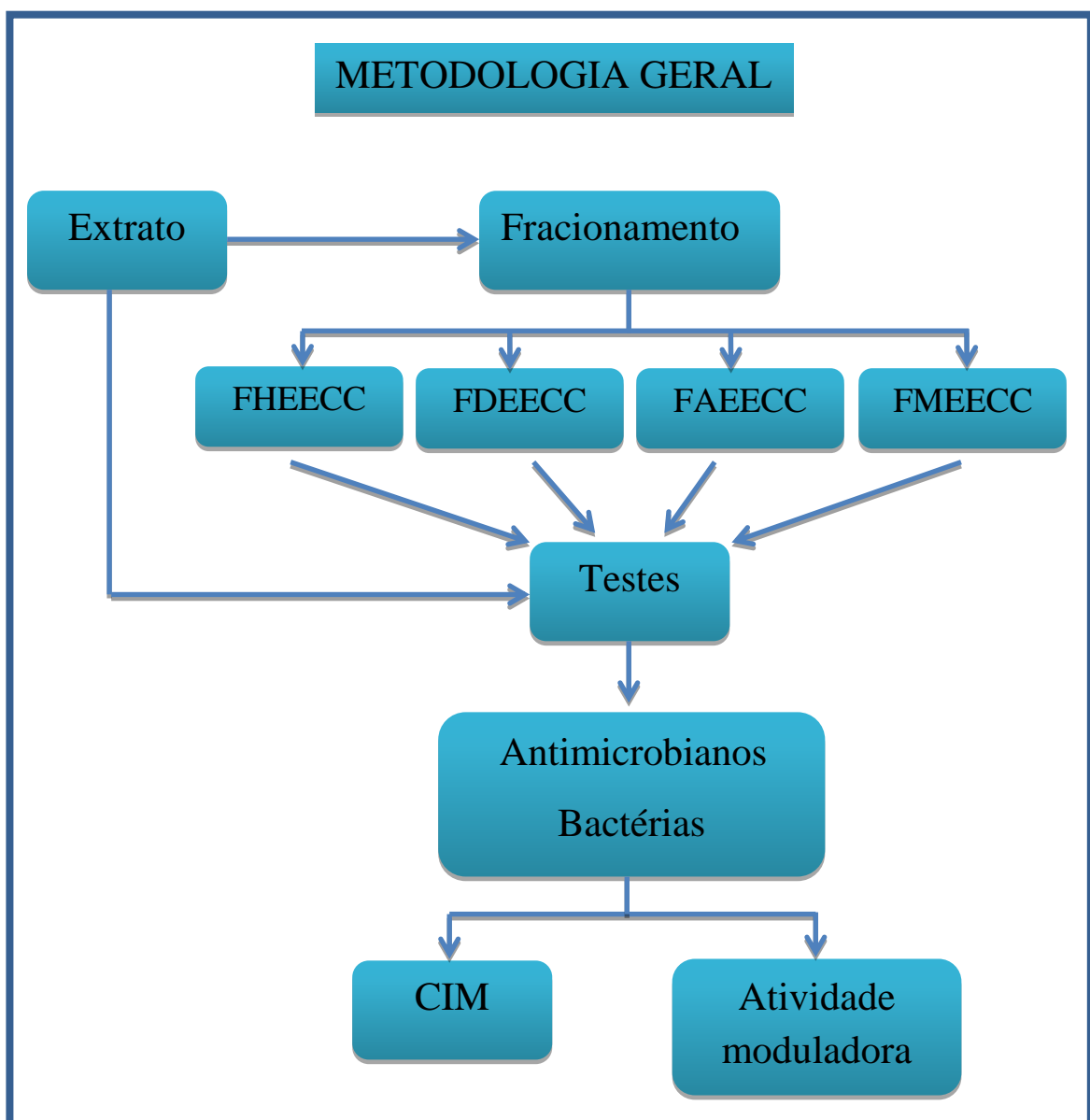
- Autoclave de esterilização à vapor quente (Primatec autoclaves)
- Balança analítica de precisão (*Metler Toledo AB204*)
- Ultrathermal Banho (Modelo 100, *Fanem Ltda.*)
- Estufa de secagem e esterilização (Modelo SL 100, SOLAB)
- Estufa Microbiológica de Cultura (*incusafe, SANYO*)
- Materiais de biossegurança
- Pipetas automáticas (*Maxipette e Kasil*)
- Placas de microdiluição estéreis
- Condesador Rotativo à Vácuo (*Fisatom*)
- Microtubos de centrífuga

- Tubos *Falcon*
- Vidrarias gerais

3.3 Metodologia Geral

Na figura abaixo é possível observar a sequência de operações para a execução do trabalho.

Figura 3.1: Esquema indicando os passos seguidos e todas as bioatividades avaliadas durante o desenvolvimento da pesquisa.



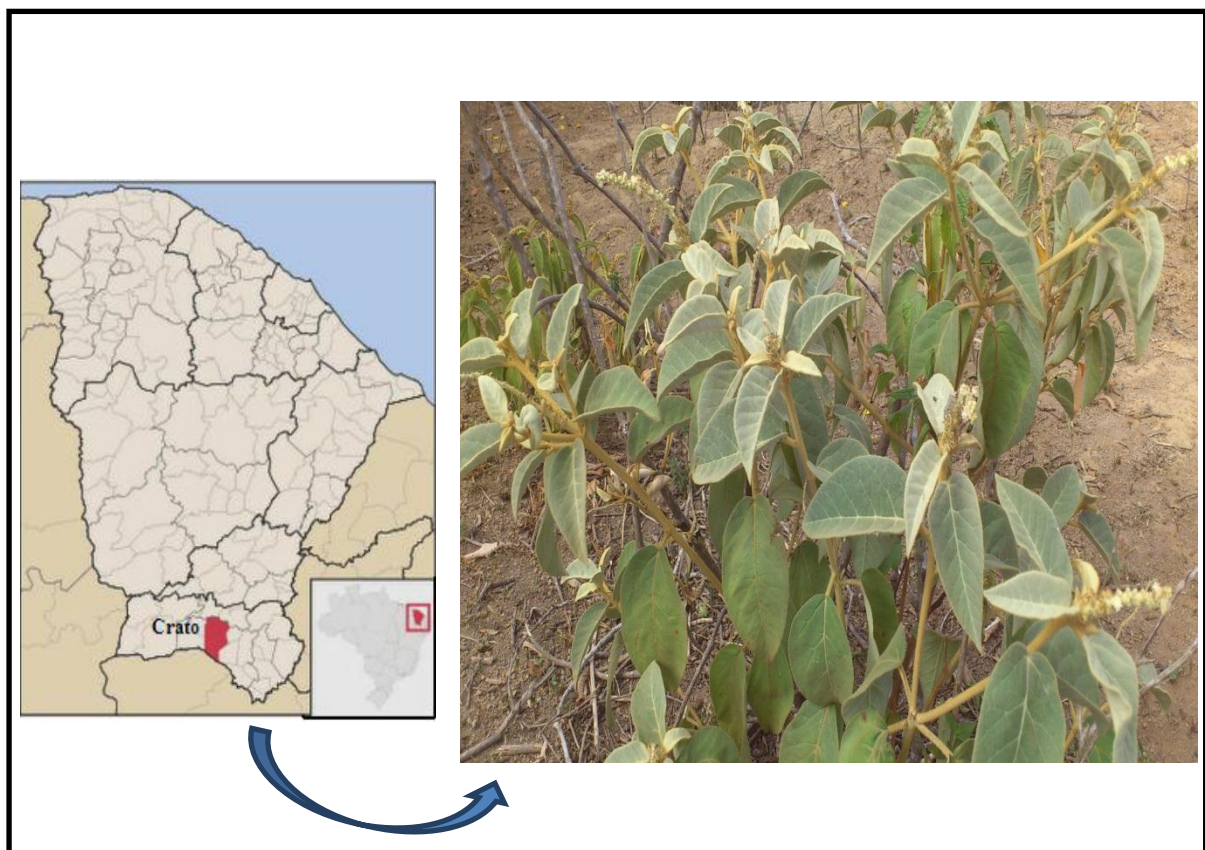
FHEECC- Fração Hexânica do Extrato Etanólico de *Croton campestris* A; FDEECC- Fração Diclorometano do Extrato Etanólico de *Croton campestris* A; FAEECC- Fração Acetato de Etila do Extrato Etanólico de *Croton campestris* A; FMEECC- Fração Metanólica do Extrato Etanólico de *Croton campestris* A; CIM- Concentração Inibitória Mínima.

3.4 Seleção e Coleta do Material Botânico

Foi utilizado nos experimentos o extrato etanólico e frações obtidos das folhas frescas de *Croton campestris* A. A utilização de folhas do material vegetal em estudo, se deve ao fato de serem partes que estão em constante renovação, não prejudicando assim o vegetal.

A coleta de material para preparo do extrato foi realizada na Fazenda Barreiro Grande (7°12'30"S e 39°28'42,4"W, altitude: 892m acima do nível do mar), Crato- Ceará, em área de Cerrado da Chapada do Araripe no mês de maio/ 2012, em dia ensolarado, cujas coordenadas foram obtidas através de aparelho GPS (Garmin) (Figura 3.2). O material vegetal foi identificado e uma exsicata da espécie foi depositada em Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), sob o número: #7095.

Figura 3.2 : Mapa ilustrativo do município de Crato e da Fazenda Barreiro Grande onde o material vegetal foi coletado.



Fonte: http://www.achetudoeregiao.com.br/ce/crato/meio_ambiente.htm; LAVOR, 2012.

3.5 Preparação e Obtenção do Extrato Etanólico e Frações de *Croton campestris* A.

Para preparação e obtenção do extrato (figura 3.3) foram coletadas folhas que ainda frescas foram cortadas com tesoura manual, tendo assim aumentada a superfície de contato, em seguida foram acondicionadas em recipientes individualizados contendo solvente suficiente para submergir todo material vegetal por 72h, sendo após esse período, filtrado em papel filtro e concentrado em condensador rotativo a vácuo (model Q-344B – Quimis, Brazil) e ultrathermal banho (model Q-214M2 – Quimis, Brazil) (BRASILEIRO *et al.*, 2006), obtendo-se massa de extrato bruto indicado na tabela 2, sendo o procedimento realizado para a espécie vegetal.

Para obtenção das frações, 49 g do extrato foi misturado à sílicagel 60 (VETEC), sendo depois colocados em um funil de *Busting* com papel de filtro acoplado a um kitassato e bomba à vácuo para filtração. Solventes em escala crescente de polaridade foram vertidos e misturados à farofa um a um nesta ordem: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol para enfim se obter as frações desejadas. Cada fração foi concentrada em evaporador rotativo e levadas a banho-maria para retirada de todo o solvente. Foram obtidos os seguintes rendimentos: fração hexânica de *C. campestris* (FHEECC): 7,85 g; fração diclorometano de *C. campestris* (FDEECC): 3 g; fração acetato de etila de *C. campestris* (FAEECC): 3 g e fração metanólica de *C. campestris* (FMEECC): 28,18 g.

Figura 3.3: Preparação do Extrato Etanólico.

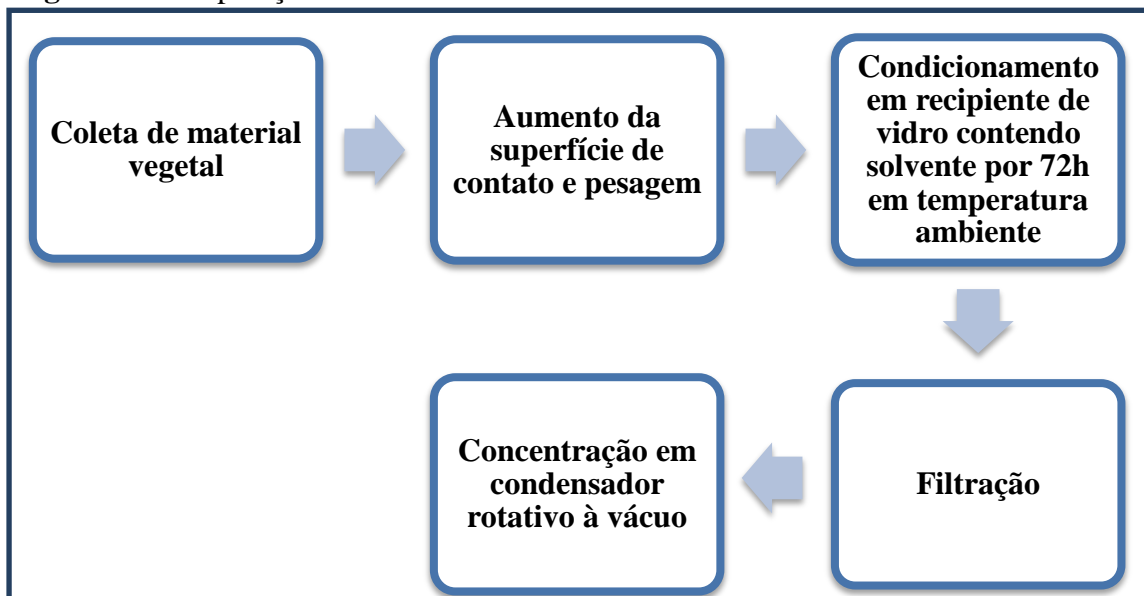


Tabela 2. Extrato seco e rendimento (g).

Espécie Biológica	Solvente (Sigla)	Matéria	Massa seca (g)	Rendimento (g)
<i>Croton campestris</i> A.	Etanol - (EECC)	Folhas	1704	97.1
	Hexano - (FHEECC)	Extrato	49	7.85
	Diclorometano - (FDEECC)	Extrato	49	3
	Acetato de etila - (FAEECC)	Extrato	49	3
	Metanol - (FMEECC)	Extrato	49	28.18

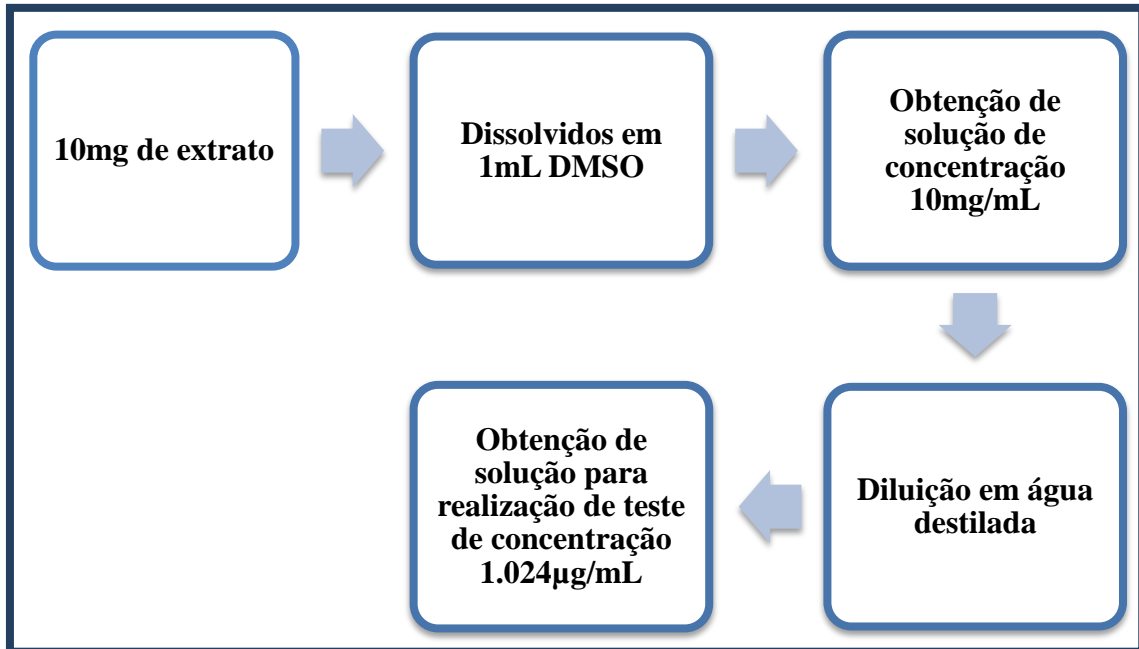
EECC – Extrato Etanólico de *Croton campestris*; FHEECC – Fração Hexânica do Extrato Etanólico *Croton campestris*; FDEECC – Fração Diclorometano do Extrato Etanólico *Croton campestris*; FAEECC – Fração Acetato de Etila do Extrato Etanólico *Croton campestris*; FMEECC – Fração Metanólica do Extrato Etanólico *Croton campestris*.

3.6 Preparo das Soluções a partir do Extrato

3.6.1 Preparo da Solução Inicial e das Soluções de Teste.

No preparo da solução inicial, (figura 3.4) o extrato foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo observadas as seguintes proporções: 10mg de extrato solubilizados em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para obter uma concentração inicial de 10mg/mL. Em seguida, esta solução foi diluída em água destilada atingindo concentração de extrato de 1024µg/mL e reduzindo a concentração de DMSO para 10% e a partir desta, efetuaram-se diluições seriadas 1:1, durante o teste microdiluição, obtendo-se as concentrações de extrato variando de 512 a 8µg/mL e DMSO para 5% de concentração.

Figura 3.4: Preparação da solução para testes.



3.7 Prospecção Fitoquímica

A avaliação e identificação das classes de metabólitos secundários presentes no extrato foi realizada através da prospecção fitoquímica, seguindo o método descrito por Matos (1997). Os testes se baseiam na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

3.8 Microrganismos

Os microrganismos que foram utilizados nos testes foram obtidos através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Foram utilizadas linhagens padrão e multirresistente de bactérias *S. aureus* (SA- ATCC 25923 e SA358), *E.coli* (EC- ATCC 10536 e EC 27) e *P. aeruginosa* (PA- ATCC 15442 e PA03).

Teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM): linhagens bacterianas (padrão): *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 10536 e *P. aeruginosa* ATCC 15442 e (multirresistentes de isolados clínicos) *S. aureus* 358, *E. coli* 27 e *P. aeruginosa* 03.

Teste de modulação da ação de antibióticos: linhagens bacterianas (multirresistentes de isolados clínicos) *S. aureus* 358, *E. coli* 27 e *P. aeruginosa* 03 cujo perfil de resistência se encontra descrito na tabela 3:

Tabela 3: Fonte das cepas bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.

Bactéria	Origem	Perfil de resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> SA358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	–	–
<i>Escherichia coli</i> EC27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA03	Ponta de catéter	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	–	–

Ast-Aztreonan; Ax- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicacina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefadroxil; Cfc- cefaclor; Cf- Cefalotina; Caz-Ceftazididima; Cip-Ciproflaxacina; Clo –Clorafenicol; Im- Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametrim, Tet-Tetraciclina; Tob- Tobramicina; Oxa- Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo- Neomicina; Para- Paramomicina; But- Butirosina; Sis-Sisomicina; Net- Netilmicina; (-)ausência de resistência ou resistência sem relevância.

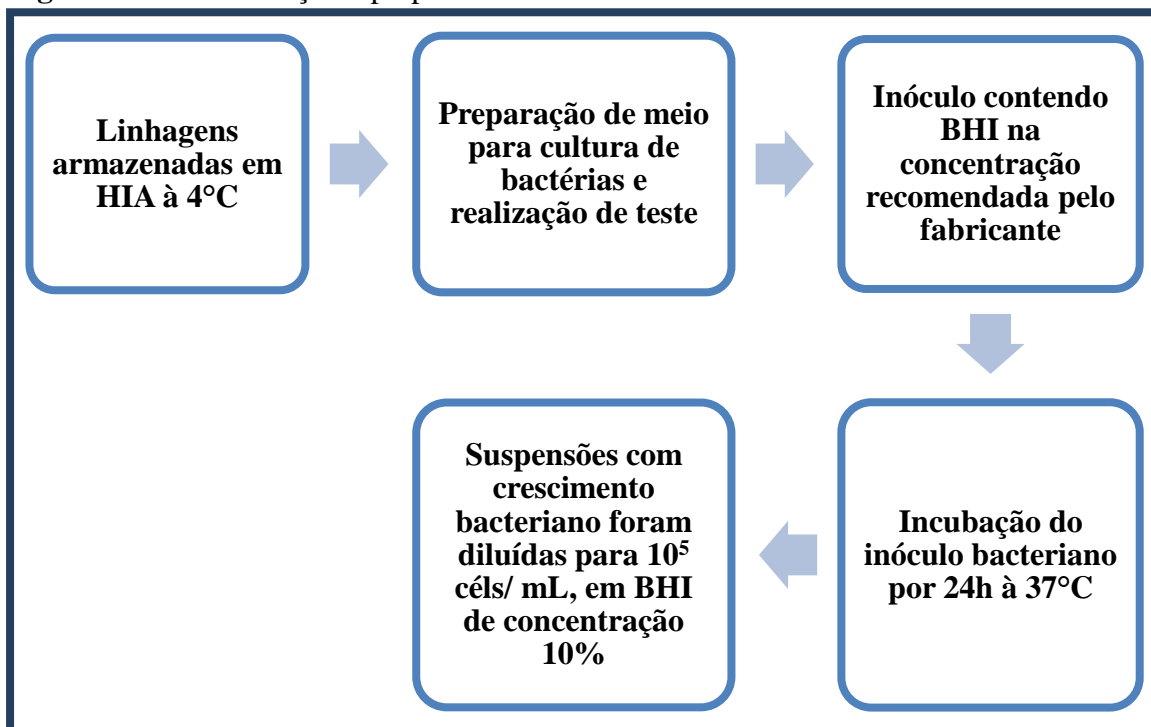
3.9 Meios de Cultura

Foram utilizados nos ensaios biológicos os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion - HIA (Difco Laboratories Ltda.), Brain Heart Infusion broth – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente.

3.10 Preparo e Padronização de Inóculos Bacterianos

Culturas de bactérias ficaram mantidas a 4°C em Infusão de Coração em Agar (Heart Infusion Agar - HIA). Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas a 35°C por 24 horas. As linhagens repicadas a serem testadas foram inoculadas em Caldo de Coração e Cérebro (Brain Heart Infusion - BHI) na concentração recomendada pelo fabricante, e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Suspensões com crescimento bacteriano foram diluídas em BHI em concentração de 10% até a obtenção de 10⁵ UFC/mL (NCCLS, 2000).

Figura 3.5: Padronização e preparo do inóculo bacteriano.



3.11 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios para determinação da CIM do extrato etanólico e frações foram efetuados através do Método de Microdiluição em Caldo, com concentrações variando de 512 a 8 µg/mL.

3.11.1 Preparo dos Inóculos Bacterianos

As suspensões bacterianas previamente padronizadas foram diluídas na proporção 1:10 em Caldo BHI 10% para obtenção da concentração final de 10⁵ UFC/mL (NCCLS, 2000).

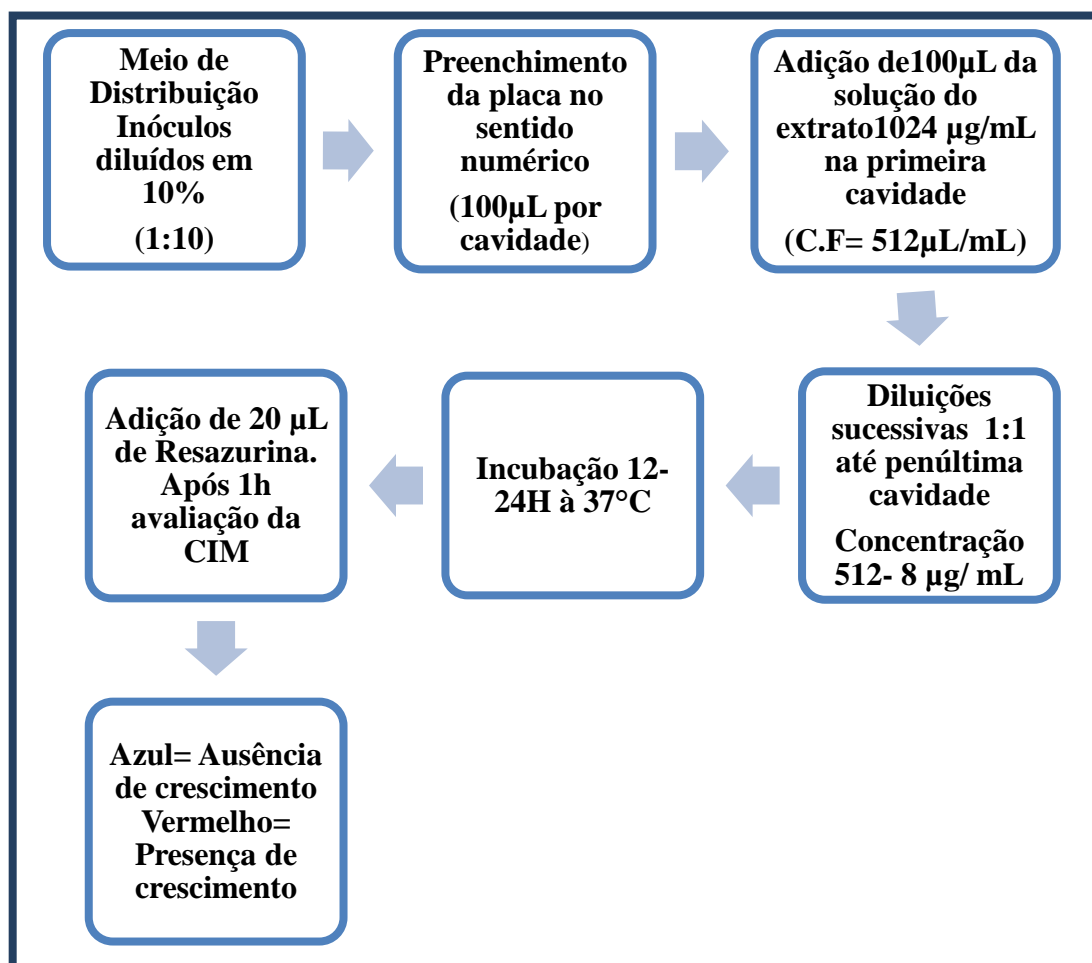
3.11.2 Execução e Leitura dos Ensaio

Este método utiliza pequenos volumes de meio e de soluções preparadas a partir do extrato, distribuídos em cavidades de microplacas estéreis. As soluções de testes foram preparadas em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL e posteriormente serão diluídas seriadamente 1:1

em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 μL do meio de cultura uma amostra de suspensão bacteriana foi diluída na proporção 1:10. Controles positivos (meio + inóculo) e controles de inibição utilizando solução em concentração de 512 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram incluídos nos ensaios. As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas (JAVADPOUR *et al.*, 1996).

Para evidenciar a CIM das soluções frente às linhagens bacterianas, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 μL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indica o crescimento bacteriano (MANN, MARKHAN, 1998; PALOMINO *et al.*, 2002), auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, evidenciado pela cor azul inalterada.

Figura 3.6: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).



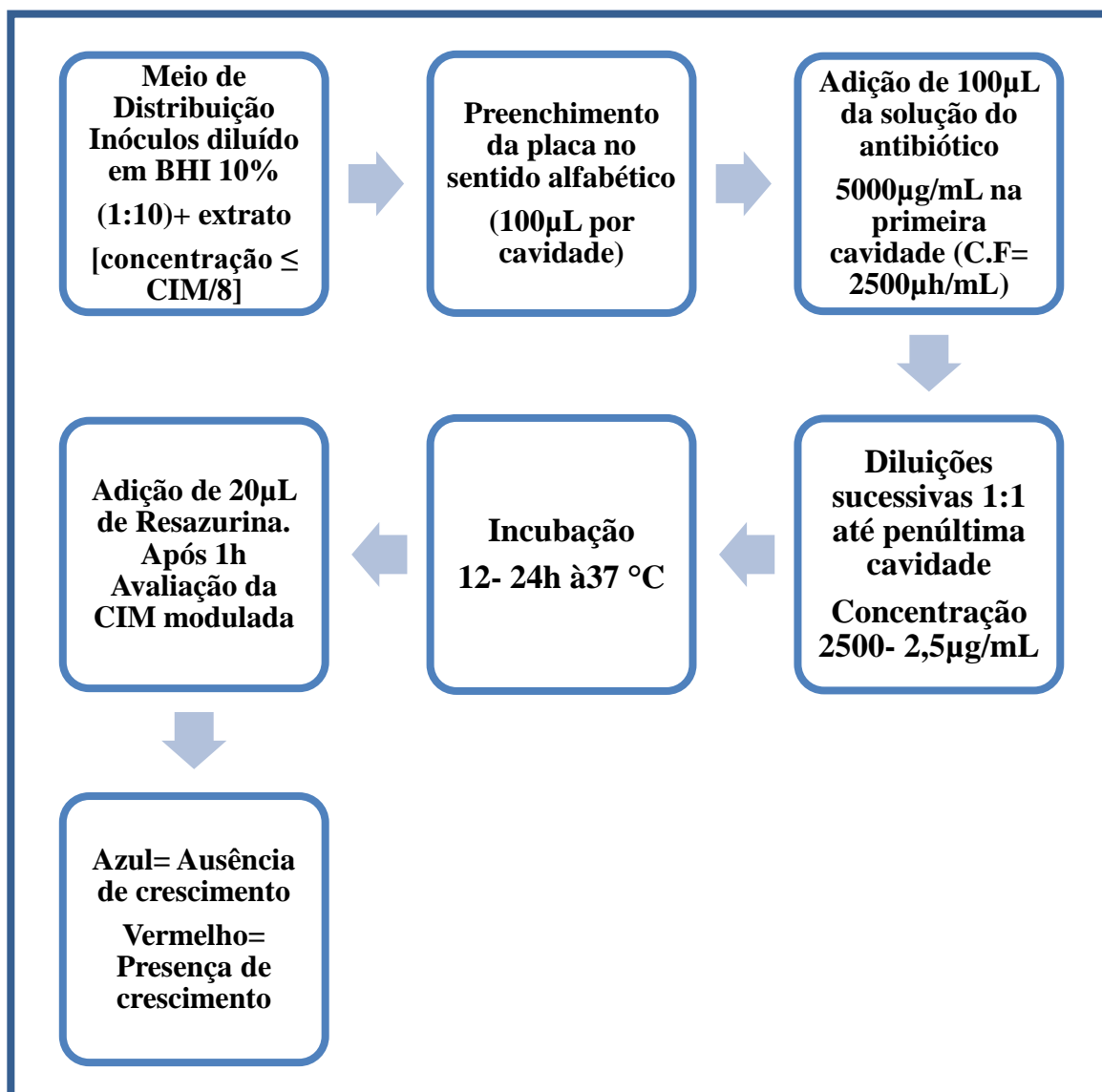
3.12 Avaliação da Interferência do Extrato Sobre a Resistência aos Antibióticos Aminoglicosídeos

Para avaliar os extratos como moduladores da ação antibiótica, a CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e neomicina) foram avaliados na presença e na ausência dos extrato em microplacas estéreis. Os aminoglicosídeos foram avaliados nas concentrações variando de 2500 a 2,5µg/mL. Todos os antibióticos testados foram obtidos junto a Sigma.

3.12.1 Execução e Leitura dos Ensaio

Para verificar se o extrato modificaria a ação dos antibióticos frente às cepas testadas, utilizou-se o método proposto por Coutinho *et al.* (2008), onde a solução do extrato foi testada em concentração sub-inibitória (CIM/8) de 128 µg/mL. Foram preparados tubos *ependorf*® contendo cada um deles 1,5 mL de solução com 1.162 µL de BHI 10%, 150 µL da suspensão bacteriana e 188 µL do produto natural (extrato ou frações). Para o controle foram preparados tubos *ependorf*® com 1,5 mL de solução contendo 1.350 µL era BHI (10%) e 150 µL de suspensão de microrganismos. A placa foi preenchida no sentido alfabético adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço. Em seguida, 100 µL de droga (antibiótico) foi misturada ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. As concentrações de aminoglicosídeos variavam gradualmente de 5000 a 2,44 µg/mL. As placas preenchidas no sentido alfabético foram incubadas a 37°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina como citado anteriormente no teste de determinação da CIM.

Figura 3.7: Avaliação da atividade moduladora do extrato frente à aminoglicosídeos.



3.13 Análise estatística dos resultados microbiológicos

Os resultados dos testes foram feitos em triplicata e expressos como média geométrica. A análise estatística aplicada foi a two- way ANOVA seguido por Bonferroni *posttests* usando o software GraphPad Prism 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo realizado sobre as atividades biológicas de *Croton campestris* A., originou dois artigos. Até o presente momento foram submetidos em revistas indexadas. Estas produções estão apresentadas abaixo, bem como os comprovantes de submissão às referidas revistas e editora, aos quais foram encaminhadas.

Nomes dos Artigos

Artigo 1- Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e moduladora de antibiótico de *Croton campestris* A. (euphorbiaceae). – O artigo foi submetido para publicação no European journal of integrative medicine.

Artigo 2- Aumento *in vitro* da atividade antibacteriana de Frações de folhas de *Croton campestris* A. (euphorbiaceae). – O artigo foi submetido para publicação na Chemotherapy.

Quando realizada a prospecção fitoquímica foram identificadas algumas classes de metabólitos secundários presentes no extrato. Nesta pesquisa foi confirmada no extrato e frações a presença de taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leucoantocianidinas, catequinas e flavononas, descritos na literatura como agentes antimicrobianos, fortalecendo a hipótese da atividade moduladora do extrato e frações da espécie avaliada.

A avaliação antibacteriana para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato e frações testados frente às linhagens bacterianas padrões e multirresistentes foram descritas nos artigos “Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e moduladora de antibiótico de *Croton campestris* A. (euphorbiaceae)” e “Aumento *in vitro* da atividade antibacteriana por Frações de folhas de *Croton campestris* A. (euphorbiaceae)” onde foi identificada uma CIM de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para todas as linhagens, sendo considerado valor com relevância clínica a CIM $\leq 256 \mu\text{g/mL}$.

A atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeo foi avaliada, descrita e discutida nos artigos intitulados “Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana e moduladora de antibiótico de *Croton campestris* A. (euphorbiaceae)” e “Aumento *in*

vitro da atividade antibacteriana por Frações de folhas de *Croton campestris* A. (euphorbiaceae)”. Nestes manuscritos, foi descrito a utilização dos aminoglicosídeos: amicacina, gentamicina e neomicina, combinados com o extrato e as frações em concentração subinibitória (CIM/8) determinada após o teste de CIM por microdiluição frente às linhagens multirresistente de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Observamos que em todos os casos ocorreram modificação da resistência bacteriana para os aminoglicosídeos, reduzindo consideravelmente a concentração desses antibióticos. Nesta avaliação observamos e confirmamos que o EECC, FHEECC e FDEECC proporcionaram maior modulação dos antibióticos em comparação as frações FAEECC e FMEECC nos testes de modulação da atividade antibacteriana.

O fato do EECC ter proporcionado maior potencialização deve-se provavelmente aos extratos, obtidos de vegetais, apresentar diversos mecanismos que podem inibir o crescimento de microrganismos, que pode ser devido à natureza hidrofóbica de alguns componentes. Esses componentes podem interagir com dupla camada lipídica da membrana celular levando à suspensão da atividade celular vital seja afetando a produção de energia ou mesmo tornando a estrutura celular mais permeável aos antibióticos.

Quando comparado que as frações FHEECC e FDEECC proporcionaram maior potencialização aos antibióticos em comparação as frações FAEECC e FMEECC este fato deve-se a característica lipofílica da membrana plasmática podendo estar relacionado com uma maior afinidade com as frações apolares. Porém, não torna a utilização das frações acetato de etila e metanólica inviáveis.

Foi elucidado o efeito modulador do extrato etanólico e frações obtidos da espécie *Croton campestris* através das técnicas relacionadas à atividade antibacteriana.

4.1 ARTIGO 1

¹4.1.1 *In vitro* Evaluation of the Antibacterial and Modulatory-Antibiotic Activity of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)

Os testes deste artigo que tratam da atividade antimicrobiana e modulatória da planta *Croton campestris* A., são parte inerentes da dissertação sendo assim eles são os que compõem o projeto original.

Esse artigo encontra-se em inglês, pois foi desta maneira que foi submetido na revista European journal of integrative medicine.

***In vitro* Evaluation of the Antibacterial and Modulatory-Antibiotic Activity of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)**

Aumento *in vitro* da atividade antibacteriana e moduladora de antibiótico de *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae).

Anne Karyzia L. S. Lavor^a, Edinaldo F.F. Matias^b, Erivania F. Alves^b, Beatriz S. Santos^b, Fernando G. Figueredo^a, Luciene F. Lima^a, Nadghia F. Leite^a, Celestina E. Sobral-Souza^a, Jacqueline C. Andrade^a, Liscássia B.B. Alencar^a, Dara I.V. Brito^a, Rosimeire S. Albuquerque^a, Henrique D.M. Coutinho^a

RESUMO

Croton campestris A. popularmente conhecido como “Velame do campo” da família Euphorbiaceae, é um arbusto originário do Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões sudeste e nordeste. Usado na medicina popular na forma de decocção contra várias doenças com característica inflamatória, transtornos hematológicos, gripe e gastrite. Este estudo teve como objetivo avaliar o extrato etanólico (EECC), a fração diclorometano (DFEECC) e a fração hexânica (HFEECC) do extrato etanólico de *Croton campestris* A. quanto ao seu potencial antibacteriano e possível ação moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeo frente linhagens padrão e resistentes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para avaliar a atividade antibacteriana e moduladora foi utilizado o método de microdiluição com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) que foram realizados em triplicatas sendo os resultados expressos pela média geométrica e foram submetidos à análise estatística (ANOVA) two- way e seguida do teste de Bonferroni posttests com significância $p < 0.001$. Os resultados da atividade antibacteriana do EECC, DFEECC e HFEECC revelaram valores da CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ frente todas as linhagens bacterianas testadas, onde se considera CIM $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ como valor clinicamente relevante. Para os testes de modulação da resistência bacteriana e as possíveis interações entre os produtos naturais e os antibióticos, os resultados mostraram que as interações do EECC, DFEECC e HFEECC com os aminoglicosídeos demonstraram efeito sinérgico com significância $p < 0.001$ reduzindo a concentração do antibiótico e potencializando seu efeito frente todas as linhagens bacterianas testadas. Os presentes resultados indicam que o extrato e as frações podem ser uma fonte alternativa de produtos naturais com uma atividade modificadora da resistência bacteriana aos aminoglicosídeos

Palavras-chave: *Croton campestris* A., atividade antibacteriana, atividade moduladora, aminoglicosídeos, resistência microbiana.

¹Artigo Submetido: Outubro de 2013, European journal of integrative medicine.

***In vitro* Evaluation of the Antibacterial and Modulatory-Antibiotic Activity of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)**

Short Title: *Croton campestris* A.

Anne Karyzia L. S. Lavor^a, Edinaldo F.F. Matias^{b*}, Erivania F. Alves^b, Beatriz S. Santos^b, Fernando G. Figueredo^a, Luciene F. Lima^a, Nadghia F. Leite^a, Celestina E. Sobral-Souza^a, Jacqueline C. Andrade^a, Liscássia B.B. Alencar^a, Dara I.V. Brito^a, Rosimeire S. Albuquerque^a, Henrique D.M. Coutinho^a,

^a Universidade Regional do Cariri-URCA- 63.100-000, Crato, CE, Brasil; ^b Faculdade Leão Sampaio-CE-FALS-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brasil.

* Autor para correspondência: Edinaldo Fagner Ferreira Matias - Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: effm_biologia@hotmail.com

Resume: Plants have been used as a source of remedies throughout human history. A great deal is already known about their use partly due to popular knowledge. With scientific advances, this age-old practice has lost ground to synthetic medications. However, the high cost of these drugs, along with the associated side effects, has contributed to the reemergence of phytotherapy (therapy through plants). *Croton campestris*A., popularly known as "Velame do campo" (from the Euphorbiaceae family), is a shrub originating from Brazil, mainly present in the Southeast and Northeast regions. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of the ethanol extract (EECC), hexane (HFEECC) and dichloromethane fractions (DFEECC), obtained from the ethanol extract of *Croton campestris* A. leaves. Antibacterial and modulating activity (on bacterial resistance) was determined by micro dilution method to identify the MIC (Minimum Inhibitory Concentration), performed in triplicate and statistical significance tested by ANOVA (two-way) with Bonferroni post hoc test ($P < 0,001$). In the antibacterial activity tests the fractions showed a MIC of $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ (where $\leq 256\ \mu\text{g/mL}$ for MIC is considered clinically relevant). In regards to modulation of bacterial resistance, all products showed synergism when combined with antibiotic against bacterial strains. Was observed that all products potentiated the antibiotic action af all antibiotics assayed against all bacterial strains. The results indicate that the extracts and fractions obtained from *Croton campestris* leaves could represent an alternative source of natural products capable of modifying and interfering with bacterial resistance to aminoglycosides.

Key words: aminoglycosides, antibacterial activity, modulating activity, *Croton campestris* A., microbial resistance.

The Bacteria domain is composed of a highly diverse group in terms of physiology and morphology, as well as varied nutritional requirements related to sources of carbon, energy and environmental factors (oxygen, PH, temperature and osmotic pressure)¹. Bacteria are simple unicellular organisms whose genetic material is not contained within a special nuclear membrane, which is why they are called prokaryotes².

Bacteria of the *Staphylococcus* genus are found throughout nature as well as on the skin's normal microbiota and the mucosa of animals and birds. Some of these are commonly recognized as causative agents in opportunist infections in humans and animals^{3,4}. *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* and *S. haemolyticus* are the most frequently reported species causing hospital and human infections. Besides causing different types of illness, *S. aureus* represents the most common cause of infections such as boils, carbuncles, abscesses, myocarditis, endocarditis, pneumonia, meningitis and bacterial arthritis⁵.

Escherichia coli is a major cause of infections in humans and is known for producing enterotoxins whose properties and role in diarrhea have been investigated. The activities of cytotoxins and their role in human illness has been elucidated^{6,7,8}, especially in urinary tract infections⁹. *Pseudomonas aeruginosa* is responsible for a wide range of infections including those that affect the skin, urinary tract, ears and eyes. The wide environmental distribution of the *Pseudomonas* is guaranteed by its limited developmental requirements. In addition, they possess abundant structural factors, enzymes and toxins that potentiate its virulence as well as making them more resistant to the most common antibiotics¹⁰.

The ability to develop resistance to antibacterial agents is a characteristic generally observed among microorganisms. However, bacteria have managed to develop distinct resistance mechanisms that are genetically coded with resistance genes being acquired through mutation and transfer of genetic material¹¹.

There has been vast scientific interest in chemical and pharmacological investigations of medicinal plants in regards to biological properties¹²⁻¹⁷. It is well known that various

medications used in clinical procedures have derived from medicinal plants. The use of extracts as antimicrobial agents presents a lower risk of microbial resistance because they contain multiple compounds, increasing the complexity for microbial adaptation¹⁸.

Plants of the *Euphorbiaceae* family encompass 290 genus and approximately 7500 species distributed worldwide (especially in tropical regions) with the largest dispersion centers found in Africa and in the Americas¹⁹.

Numerous biological studies relate to the *Croton* genus. The plants from this genus are rich in secondary metabolites responsible for biological activities. The active constituents include proanthocyanidin, alkaloids, terpenes, flavonoids and other phenolic compounds²⁰. Among the activities attributed to the *Croton* genus we note: anthelmintic and cardiovascular effect of *Croton zehntneri*²¹; anti-nociceptive effect of *C. zehntneri*²¹; moluscicidal activity of *C. campestris*²³; anti-inflammatory activity of *C. cuneatus*²⁴; the anti-cancerous properties of *C. flavens*; and the antioxidant and mutagenic effects of *C. lechleri*²⁵.

Croton campestris A., commonly known as "velame-do-campo" is a shrub originating in Brazil that stands out in the Southeast and Northeast regions. It is popularly used as a powerful depurative agent and used to combat scrofula, venereal diseases, dermatophytosis, tumors, skin diseases, rheumatisms, ulcers of the uterus, arthritis and diarrhea²⁶.

The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of the ethanol extract of *Croton campestris* (EECC) as well as the hexane and dichloromethane fractions of the extract. In addition, we evaluated the capacity to modulate the bacterial resistance to aminoglycosides of compounds against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and Methods

Bacterial Material - The bacterial strains used were: *S. aureus* (SA-ATCC25923 and SA358), *E.coli* (EC- ATCC 10536 and EC 27) and *P. aeruginosa* (PA-ATCC15442 e PA03) with

resistance profile identified in table 1. All the strains were kept in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco Laboratories LTDA). Before testing the cells were cultivated for 24h at 37°C in brain heart infusion (BHI, Difco Laboratories LTDA).

Plant Material - Croton Campestris leaves were collected in the city of Crato, Ceará, Brazil, during May/2012 at 9am. The plant material was identified and a specimen was deposited at the Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), under registry n° 7095.

Preparation of the extract and fractions of Croton campestris - For the preparation of the extract and fractions, the leaves (which remained immersed in ethanol for 72h) were filtered and concentrated in a rotary vacuum condenser (model Q- 344B – Quimis Brazil) and ultrathermal bath (model Q – 214M2 – Quimis), to give a mass return from the gross extract. To obtain Hexane and dichloromethane fractions, we used vacuum filtration with solvents of varied polar characteristics from the extract, (see table 2 for products obtained). The solutions tested were prepared at a concentration of 10 mg/mL, dissolved in DMSO and then diluted in distilled water to a concentration of 1024 µg/mL. A pilot study using only DMSO (in varied concentrations) was performed. The concentration used in the antibacterial and modular tests did not show interference or toxicity.

Phytochemical prospecting - Phytochemical tests were done to detect the presence of heterosids, saponins, tannins, flavonoids, steroids, triterpens, cumarines, quinones, organic acids and alkaloids²⁷. The tests were based on colorimetric analysis or formation of precipitate following the addition of specific reagents.

Drugs - Antibiotics used were: Amikacin, Gentamycin and Neomycin obtained from SIGMA and prepared according to the manufacturer's instructions.

Test of Antibacterial Activity - The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined via broth microdilution assay²⁸ using a 100 μ L inoculation from each bacterial strain, suspended in broth BHI at a concentration of 10^5 UFC/mL on 96 well microtiter plates, with dilutions in a series (50%). In each well, we added 100 μ L of test solution and the final concentrations varied between 8 - 512 μ g/mL. Standard antibiotics were used as controls (Amikacin, Gentamycin and Neomycin) whose final concentrations were between 2.4 - 2500 μ g/mL. The preparations were incubated to a temperature of 35°C for 24 hours. Colorimetric analysis was performed with resazurin with the MICs recorded as the lowest concentrations for growth inhibition.

Test of Bacterial Resistance Modulation – Extracts were tested at sub-inhibitory concentrations (MIC/8), where 100 μ L of a solution was distributed with BHI 10%, bacterial inoculations and test solution. After that, 100 μ L of antibiotic was serially diluted at 1:1. The concentrations of aminoglycosides gradually varied from 2.44 to 5000 μ g/mL. The plates were incubated at 35°C for 24h. Plates were read by using resazurin. All the tests were performed in triplicates²⁹.

Statistical Analysis - The test results were expressed as geometric means. For statistical analysis, a two-way ANOVA test was used followed by a Bonferroni post hoc test, considering the $p < 0.001$ as statistically significant.

Results

Phytochemical examination of the ethanol extract of *C. campestris* and the hexane and dichloromethane fractions revealed the presence of various potentially bioactive compounds, such as: condensed tannins, flavones, flavonols, xanones, chalcones, aurones, flavononols, leucoanthocyanidins, catequines, flavonones and alkaloids displayed on table 3.

To determine antibacterial activity and the Minimum Inhibition Concentration (MIC) of EECC, HFEECC and DFEECC against standard and multi resistant bacterial strains, a MIC of

$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ was identified for all strains (the value $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ was considered clinically relevant).

Figures 1, 2 and 3 represent analysis of the modulating activity of bacterial resistance when EECC, HFEECC and DFEECC are combined with aminoglycosides. The natural products potentiated the effects of the antibiotic when applied together against all bacterial strains tested ($p < 0.001$).

Discussion

Metabolites identified by phytochemical screening included an extensive variety of biological activities, for example, antioxidant³⁰, anti tumor, anti-ophidic and antimicrobial³¹.

Secondary metabolites such as tannins are synthesized by plants in response to microbial infections^{32,33}, modifying the cellular wall or destroying the bacterial plasma membrane^{34,26}.

Flavonoids are phenolic compounds that can inhibit growth, replication, increase the membrane's permeability and interfere with the cell motility of micro organisms³⁵.

This activity could be due to its ability to form complexes with extracellular soluble proteins (and with the cellular wall) or to the lipophilic characteristics of flavonoids damaging the cellular membrane of micro organisms^{34, 36}.

Studies highlighting natural products or bioactive plant substances with antimicrobial activities have presented significant data¹⁷. The antibacterial activity of natural products depends on their composition and interaction among the various chemical components³⁷.

Due to complex mixtures, the plant extracts display diverse mechanisms that can inhibit the growth of micro organisms, which can in part be due to the hydrophobic nature of some compounds. These compounds can interact with phospholipids of the cellular membrane, affect energy production and the respiratory chain³⁸, or make the cellular structure more permeable to

antibiotics, leading to the suspension of vital cellular activity³⁸. Interference with the bacteria's enzymatic activity can also be a potential action mechanism⁴⁰.

Aminoglycoside antibiotics exhibit bactericidal activity by specifically linking themselves to 30S sub units of bacterial ribosomes. This interrupts ribosome-mRNA interactions consequently reducing the synthesis of bacterial proteins^{41,42}. The continuous use of aminoglycoside antibiotics should be carefully controlled, due to the nephrotoxic and ototoxic effects^{43,42}. Due to these side effects, the combination of the ethanol extract of *C. campestris* could represent an excellent therapeutic option in minimizing such side effects of this group of antibiotics.

Studies done with extracts of different polarities obtained from *C. campestris* leaves presented antibacterial activity with a clinically relevant MIC²⁶. These natural products, when combined with aminoglycosides, presented a synergistic effect, considerably reducing the concentration of antibiotics used in tests⁴⁴.

Conclusion

We conclude that the ethanol extract and the hexane and dichloromethane fractions of the extract from the *Croton campestris* leaves worked synergistically with aminoglycosides against the resistant bacterial strains used in the modulation tests. The extract and the fractions could therefore be potential sources of natural products with a modifying activity of bacterial resistance. Nevertheless, new studies would be required to create new therapeutic alternatives for the treatment of pathologies caused by bacteria.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Brazilian agencies CNPQ, CAPES and FUNCAP by the financial support and URCA by the institutional support.

References

1. Vermelho AB, Bastos MCF & Branquinha M (2007), *Bacteriologia Geral*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
2. Tortora GJ, Funke BR & Case CL (2008), *Microbiologia*. 8^a ed. Porto Alegre, Artmed.
3. Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G & Morelli I, Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett*, 230 (2004) 191.
4. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-JR JP & Lima EO, Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in ethicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33 (2010) 467.

5. Verhoeff J, Beaujean D, Vlok, H, Baars A, Meyler A & Werkwn VDC, A dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18 (1999) 461.
6. Konowalchuk J, Speirs JI & Stavric S, Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immunity*, 18 (1977) 775.
7. Konowalchuk J, Dickie NS, Stavric S & Speirs JI, Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infect Immunity*, 20 (1978) 575.
8. Scotland SM, Day NP, Willshaw GA & Rowe B, Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet*, 315 (1980) 90.
9. Hughes C, Muller D, Hacher J & Goebel W, Genetics and pathogenic role of *Escherichia coli* haemolysin. *Toxicon* 20 (1982) 247.
10. Murray PR (2004), *Microbiologia médica*. 4a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
11. Carneiro JCO (2006), *Padrão de consumo de antibacterianos em uma UTI geral: correlação com a resistência bacteriana*. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas)-Universidade de Brasília, Brasília.
12. Saúde-Guimarães DA & Faria AR, Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev Bras Farmacogn*, 17 (2007) 455.
13. Barbosa-Filho JM, Nascimento-Júnior FA, Tomaz ACA, Athayde-Filho PF, Silva MS & Cunha EVL, Natural products with antileprotic activity. *Rev Bras Farmacogn*, 17 (2007) 141.
14. Biavatti M, Marensi V, Leite SN & Reis A, Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. *Rev Bras Farmacogn*, 17 (2007) 640.
15. Oliveira FQ, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M & Souza M, Espécies vegetais indicadas na odontologia. *Rev Bras Farmacogn*, 17 (2007) 466.

16. Barbosa-Filho JM, Alencar AA, Nunes XP, Tomaz ACA, Sena-Filho JG & Athayde-Filho PF, Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. *Rev Bras Farmacogn*, 18 (2008) 135.
17. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-JR JP & Lima EO, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Braz Jour Pharmacog*, 18 (2008) 670.
18. Daferera DJ, Ziogas BN & Polissiou MG, The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protect*, 22 (2003) 39.
19. Heluani CS, Catalan CAN, Hernández LR Tapia, EB & Natan PJ, Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. *J Nat Prod*, 63 (2000) 222.
20. Dalbó S (2004), *Avaliação da atividade antinociceptiva da subfração 63 (SF63) obtida a partir das cascas de Croton celtidifolius (EUPHORBIACEAE) – estudo do mecanismo de ação*. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, UFSC, Florianópolis..
21. Camurça-Vasconcelos ALF, Bevilaqua CML, Morais SM, Maciel MV, Costa CT, Macedo IT, Oliveira LM, Braga RR, Silva RA & Vieira LS, Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Vet Paras*, 148 (2007) 288.
22. Rao VS, Gurgel LA, Lima-Júnior RCP, Martins DT, Cechinel-Filho V & Santos FA, Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *J Ethnopharmacol*, 113 (2007) 357.
23. Babili FEL, Fabre N, Moulis C & Fouraste I, Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. *Fitoterapia*, 77 (2006) 384.
24. Suárez AI, Blanco Z, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Zapata V & Alvarado C, Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol*, 105 (2006) 99.

25. Lopes E Lopes MI, Saffi J, Echeverrigaray S, Henriques JA & Salvador M, Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *J Ethnopharmacol*, 95 (2004) 437.
26. Matias EFF, Santos KKA, Costa JGM & Coutinho HDM, Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. *Rev Bras Bioci*, 8 (2010) 294.
27. Matos FJA (1997), *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2ª Ed. Ed UFC, Fortaleza.
28. NCCLS (2003), *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6. NCCLS, Pennsylvania.
29. Coutinho H DM, Costa JGM, Lima E O, Falcão-Silva V S & J P Siqueira-jr, Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy*, 54 (2008) 328.
30. Barreiros ALBS & David JM, Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. *Quím Nova*, 29 (2006) 113.
31. Okuda T, Yoshida T & Hatano T, Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med*, 55 (1989) 117.
32. Dixon RA, Dey PM & Lamb CJ, Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv Enzymol Rel Areas Mol Biol*, 55 (1983) 1.
33. Ho KY, Tsa, CC, Huang JS, Chen CP, Lin TC & Lin CC, Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. *J Pharma Pharmacol*, 53 (2001) 187.
34. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fuyiwara S, Ohyama M, Takasa T & Linuma M, Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*, 50 (1996) 27.

35. Simões CC, Araújo DB & Araújo RPC, Estudo *in vitro* e *ex vivo* da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Rev Bras Farmacogn*, 18 (2008) 84.
36. Cowan MM, Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 12 (1999) 564.
37. Dorman HJD, Deans SG, Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*, 88 (2000) 306.
38. Nicolson K, Evans G & O'toole PW, Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol Lett*, 179 (1999) 233.
39. Burt S, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol*, 94 (2004) 223.
40. Wendakoon C & Sakaguchi M, Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *J Food Protect*, 58 (1995) 280.
41. Patrick GL (2005), *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, New York.
42. Guimarães DO, Momesso LS & Pupo MT, Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím Nova*, 33 (2010) 667.
43. Walsh C (2003), *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. ASM Press, Washington.
44. Matias EFF, Santos KKA, Almeida TS, Costa JGM & Coutinho HDM, Modulation of antibiotic resistance on multiresistant bacterial strain by *Croton campestris* A. *Chemotherapy*, 57 (2011) 305.

Figure 1. Modulatory antibiotic activity of the Ethanol Extract of *Croton campestris* (EECC) in association with aminoglycosides.

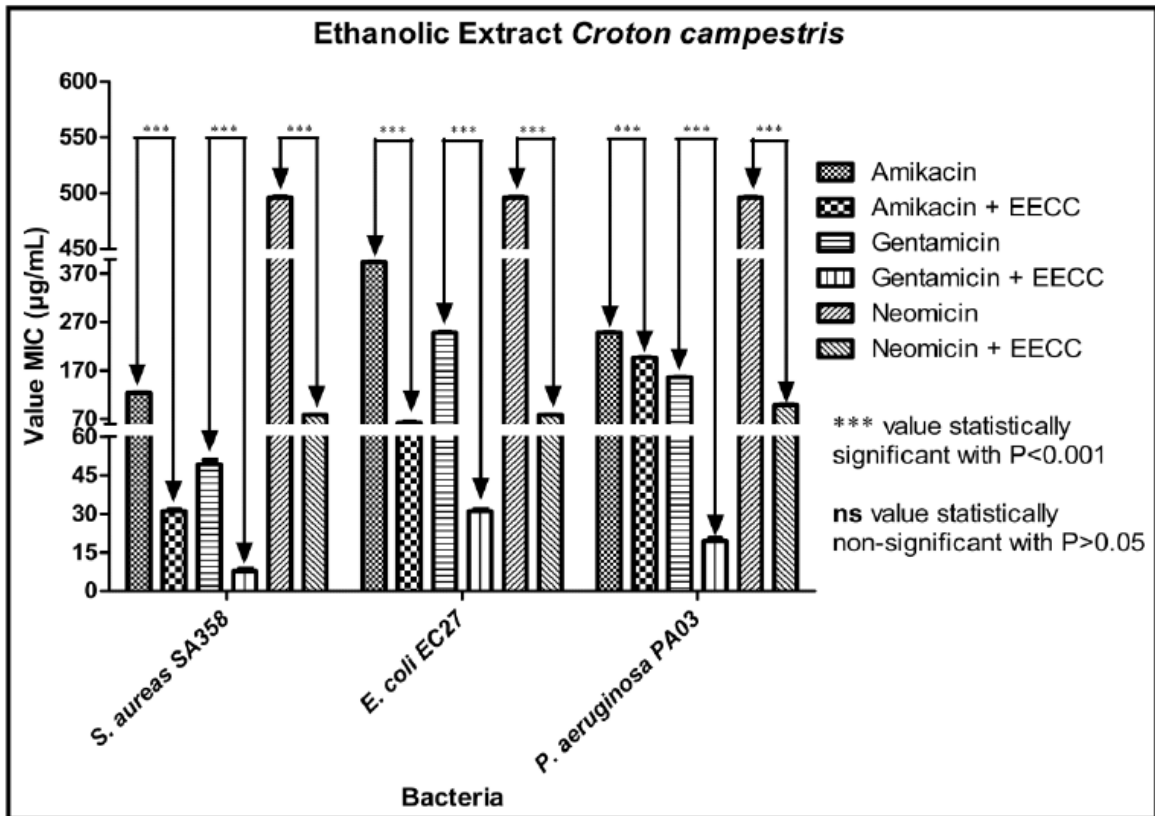


Figure 2. Modulatory antibiotic activity of the Hexane fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris* (HFEECC) in association with aminoglycosides.

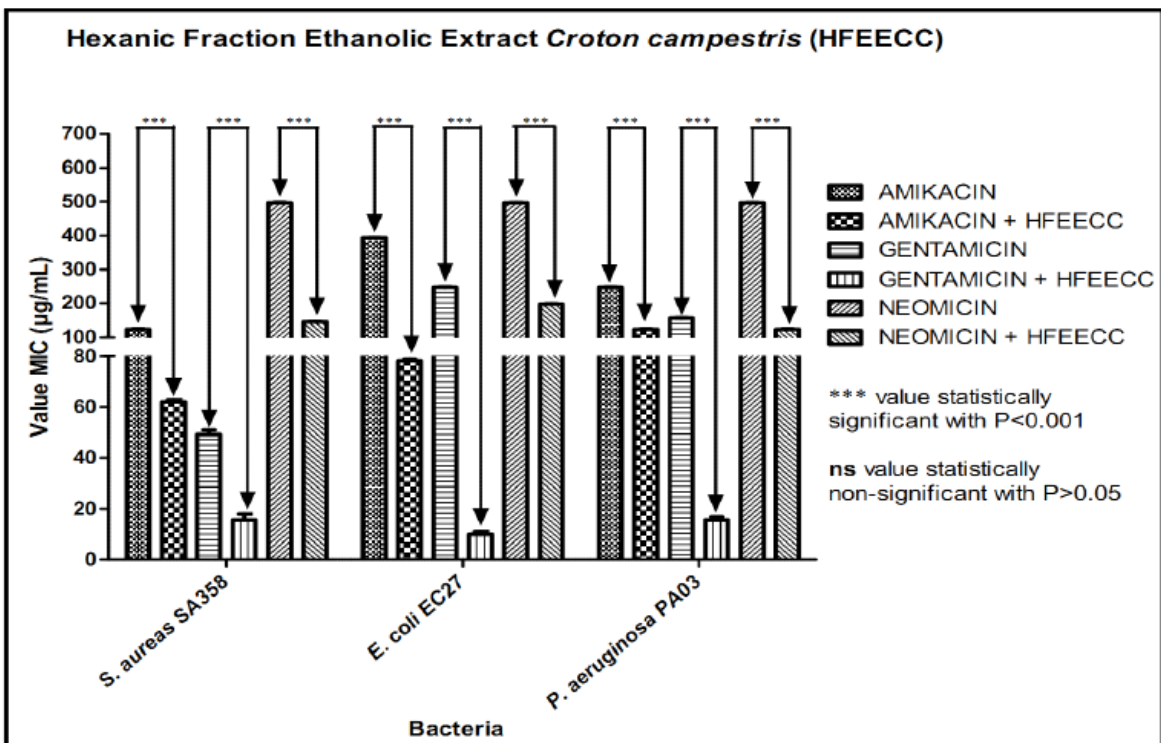


Figure 3. Modulatory antibiotic activity of the Dichloromethane Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris* (DFEECC) in association with aminoglycosides.

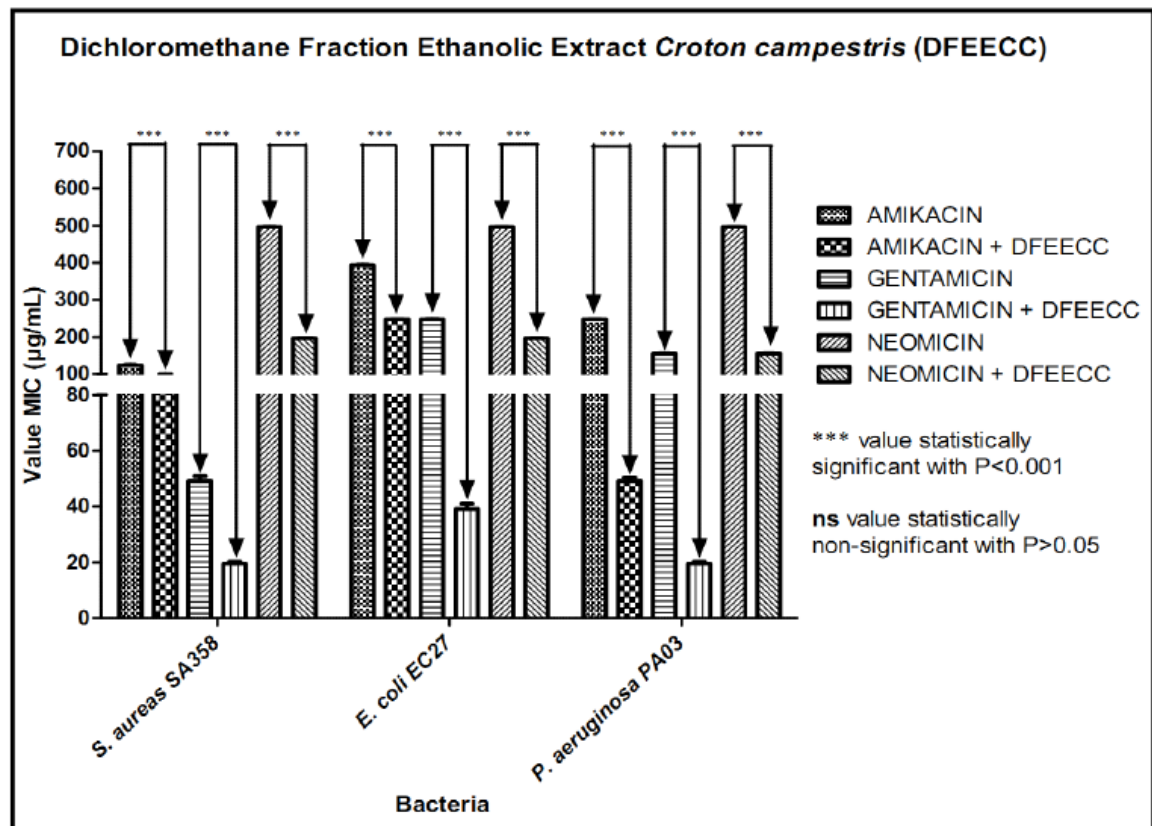


Table 1. Source of the bacterial strains and resistance of antibiotics profile.

Bacteria	Source	Resistance profile
<i>Staphylococcus aureus</i> SA358	Surgical wound	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC	–
<i>Escherichia coli</i> EC27	Surgical wound	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	ATCC	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA03	Tip of catheter	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	ATCC	–

Ast-Aztreonan; Ax- Amoxicilin; Amp-Ampicilin; Ami-Amikacin; Amox-Amoxilin, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefador; Cf- Cefalotine; Caz-Ceftazidime; Cip-Ciprofloxacin; Clo –Clorafenicol; Im- Imipenem; Can-Kanamycin; Szt-Sulfametrim, Tet-Tetracilin; Tob- Tobramycina; Oxa- Oxacilin; Gen-Gentamicin; Neo-Neomycin; Para- Paramomycin; But- Butirosine; Sis-Sisomycin; Net- Netilmycina.

Table 2. Dry extract and yield from ethanol fractions (g).

Specie	Solvent used (Sigla)	Materia 1	Dry mass	Yield
<i>Croton campestris</i> A.	Ethanol (EECC)	Leaves	860.8	49
	Hexane (HFEECC)	Extract	49	7.85
	Dichloromethane (DFEECC)	Extract	49	3

EECC – Ethanol Extract of *Croton campestris*; HFEECC – Hexane Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris*; DFEECC – Dichloromethane Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris*.

Table 3. Phytochemical prospection of the extract and fractions of *Croton campestris*.

	METABOLITES														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EECC	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HFEECC	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
DFEECC	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

1 – Phenols; 2 – Hydrolyzable Tannins; 3 – Condensed Tannins; 4 – Anthocianins; 5 – Anthocianidines; 6 – Flavones; 7 – Flavonols; 8 – Xanthonnes; 9 – Chalcones; 10 – Aurones; 11 – Flavononols; 12 – Leucoanthocianidines; 13 – Catequines; 14 – Flavonones; 15 – Alkaloids; (+) presence; (-) absense. **EECC**- Ethanol Extract of *Croton campestris*; **DFEECC**- Dichloromethane Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris*; **HFEECC**- Hexane Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris*.

4.2 ARTIGO 2

²4.2.1 *In vitro* Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)

Os testes deste artigo que tratam da atividade antimicrobiana e modulatória da planta *Croton campestris* A., são parte inerentes da dissertação sendo assim eles são os que compõem o projeto original.

Esse artigo encontra-se em inglês, pois foi desta maneira que foi submetido na revista Chemotherapy.

***In vitro* Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)**

Aumento *in vitro* da atividade antibiótica de Frações de folhas de *Croton campestris* A. (euphorbiaceae).

Anne Karyzia L. S. Lavor^a, Edinaldo F.F. Matias^b, Erivania F. Alves^b, Beatriz S. Santos^b, Fernando G. Figueredo^a, Luciene F. Lima^a, Nadghia F. Leite^a, Celestina E. Sobral-Souza^a, Jacqueline C. Andrade^a, Liscássia B.B. Alencar^a, Dara I.V. Brito^a, Rosimeire S. Albuquerque^a, Henrique D.M. Coutinho^{a*}

RESUMO

Croton campestris A. popularmente conhecido como “Velame do campo” da família Euphorbiaceae, é um arbusto originário do Brasil. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana das frações metanólica (FMEECC) e acetato de etila (FAEECC) obtidas a partir do extrato etanólico de folhas de *Croton campestris* A. A avaliação atividade antibacteriana e moduladora foi realizado pelo método de microdiluição para determinação da CIM, realizados em triplicata e submetido à análise estatística (ANOVA) two- way e seguida do teste de Bonferroni posttests com significância $p < 0,001$. Os resultados mostraram que as interações da fração metanólica com os aminoglicosídeos demonstraram significância com $p < 0,001$ para a associação com a amicacina frente à *Escherichia coli* e com gentamicina frente a todas as linhagens testadas. Também houve sinergismo com significância $p < 0,001$ na associação do produto com a neomicina frente à *coli* 27, *P. aeruginosa* 03 e *S. aureus* 358. Além de evidenciar antagonismo com significância de $p < 0,001$ nas associações da fração com amicacina frente à *P. aeruginosa* 03. Os resultados mostraram que as interações da fração com os aminoglicosídeos demonstraram significância com $p < 0,001$ na associação com amicanina frente *P. aeruginosa* 03 e *S. aureus* 358. Além de indicar a mesma significância sinérgica na associação do produto com a gentamicina contra a *P. aeruginosa* 03. Porém apresentou antagonismo com significância de $p < 0,001$ na associação da amostra com a amicacina e gentamicina frente à *E. Coli* – 27. Além de indicar a mesma significância antagonica na associação do produto com a neomicina frente à *P. aeruginosa* 03. Apresentou antagonismo com significância de $p < 0,001$ na associação da amostra com a gentamicina frente à *S. aureus* 358. Produtos naturais extraídos de *Croton campestris* poderiam representar uma excelente opção terapêutica no tratamento de infecções sugerindo a composição de um fármaco com multi-drogas.

Palavras-chave: aminoglicosídeos, atividade antibacteriana, atividade moduladora, *Croton campestris* A., resistência microbiana.

Artigo Submetido: Outubro de 2013, Chemotherapy.

***In vitro* Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)**

Anne Karyzia L. S. Lavor^a, Edinaldo F.F. Matias^b, Erivania F. Alves^b, Beatriz S. Santos^b, Fernando G. Figueredo^a, Luciene F. Lima^a, Nadghia F. Leite^a, Celestina E. Sobral-Souza^a, Jacqueline C. Andrade^a, Liscássia B.B. Alencar^a, Dara I.V. Brito^a, Rosimeire S. Albuquerque^a, Henrique D.M. Coutinho^{a*}

^aLaboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato (CE);

^bFaculdade Leão Sampaio, Juazeiro do Norte (CE) Brasil

* Autor para correspondência: Henrique Douglas Melo Coutinho. Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE, Brasil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291. E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Abstract:

Background: The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of methanol (MFEECC) and ethyl acetate (AFEECC) fractions, obtained from the ethanol extract of *C. campestris* A. leaves. **Methods:** Antibacterial and modulating activity (on bacterial resistance) was determined by micro dilution method to identify the MIC (Minimum Inhibitory Concentration), performed in triplicate and statistical significance tested by ANOVA (two-way) with Bonferroni post hoc test ($P < 0,001$).

Results: In the antibacterial activity tests the fractions showed a MIC of $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. In regards to modulation of bacterial resistance, MFCC showed synergism when combined with antibiotic against bacterial strains. In the modulation tests, AFCC potentiated the effects of amikacin against *S. aureus* and *P. aeruginosa* but had an antagonistic effect against *E. coli*. AFCC combined with gentamicin displayed antagonism against *S. aureus* and *E. coli* and an antagonistic effect against *P. aeruginosa*. When AFEECC was combined with Neomycin it resulted in antagonism against *P. aeruginosa* but did not affect *S. aureus* and *E. coli*. **Conclusions:** The results indicate that the extracts and fractions obtained from *C. campestris* leaves could represent an alternative source of natural products capable of modifying and interfering with bacterial resistance to aminoglycosides.

Key words: aminoglycosides, antibacterial activity, modulating activity, *Croton campestris* A., microbial resistance.

Introduction

Bacteria of the *Staphylococcus* genus are widely distributed, occurring on the normal skin microbiota and on the mucosa of animals and birds. Some *Staphylococcus* species are recognized as etiological agents of opportunist infections in animals and humans [1]. *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* and *S. haemolyticus* are the most frequent cause of hospital-related and human infections. Besides causing distinct types of illness, *S. aureus* represents the most common etiological agent in infections such as boils, carbuncles, abscesses, myocarditis, endocarditis, pneumonia, meningitis and bacterial arthritis [2].

Escherichia coli is a major cause of infections in humans. It

produces enterotoxins whose properties and role in diarrhea have been widely investigated. The activities of cytotoxins and their role in human infection have been described [3] in urinary tract infections [4].

Pseudomonas aeruginosa is responsible for a large number of infections including those affecting the skin, urinary tract, eyes and ears. The broad distribution of the *Pseudomonas* is guaranteed by its limited developmental requirements. In addition, a large number of structural features such as enzymes and toxins potentiate its virulence and make them more resistant to the most common antibiotics [5].

With the emergence of antibiotic resistant bacterial strains, natural products can be a convenient alternative [6]. Different plants were analyzed, not only for a direct antimicrobial activity but also as potential agents for modifying antibiotic resistance [7]. There is growing interest in the use of biologically active compounds, isolated from plants for the treatment of infections caused by microorganisms that are resistant to antibiotics [8-9].

Even new antibiotics have been produced in the last three decades, microorganisms resistance has increased for these drugs [10]. In general, bacteria have a genetic capacity to transmit and gain resistance to these drugs, which are used as therapeutic agents [11].

The mechanisms of bacterial resistance to antibiotics are three fold: 1) Inactivation of the antibiotics by enzymatic activity; 2) Molecular modifications to avoid the antibiotic binding to its target site; 3) Permeability barrier or modifications to restrict antibiotic reaching its target. It is also possible that these can occur simultaneously [12].

The association of antimicrobials is evaluated by its ability to suppress the emergence of resistant mutants and produce an *in vivo* synergic effect. Extending the

working life of current antimicrobials could be possible if used in combination with other products, such as natural ones. These could represent a therapeutic alternative in the treatment of infections caused by pathogens [13].

Plants of the Euphorbiaceae family (290 genus and approximately 7500 species) are distributed globally, especially in tropical regions. The largest dispersion centers are found in Africa and in the Americas [14]. Numerous biological studies focus on the *Croton* genus. The plants from this genus are rich in secondary metabolites responsible for biological activities. Active compounds include: proanthocyanidins, alkaloids, terpenes, flavones and other phenolic compounds [15]. Among the activities attributed to the *Croton* genus we note the anti-helminth, cardiovascular, anti-nociceptive, moluscicidal, anti-inflammatory, anti-cancer, antioxidant and mutagenic effects [16-20].

Croton campestris A., popularly known as "*velame-do-campo*", is a shrub originating in Brazil. The species is common in the Southeast and Northeast regions and popularly used as a powerful depurative as well as to combat scrofula, venereal diseases, dermatophytosis, tumors, skin diseases, rheumatisms, ulcers of the uterus, diarrhea and arthritis [21].

The objective of the present study was to assess the antibacterial properties and modulating effect on antibacterial resistance to aminoglycosides of the methanol and ethyl-acetate fractions of the ethanol extract from *Croton campestris* A. leaves against standard and multi resistant bacterial strains.

Materials and Methods

Bacterial Material

The bacterial strains used were: *S. aureus* (SA-ATCC25923 and SA358), *E. coli* (EC-

ATCC 10536 and EC 27) and *P. aeruginosa* (PA-ATCC15442 e PA03) (see Table 1 for resistance profiles). All the strains were kept in Heart Infusion Agar slants (HIA, Difco Laboratories LTDA). Prior to experiments, the cells were cultivated for 24h in 37°C in brain heart infusion (BHI, Difco Laboratories LTDA).

Plant Material

Croton campestris leaves were collected in the city of Crato, Ceará, Brazil (May/2012 at 9am). The plant material was identified and a specimen deposited at Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), under registry nº 7095.

Preparation of the extract and fractions of Croton campestris

For extract and fraction preparation, leaves (which were submerged in ethanol for 72h) were filtered and concentrated in a rotary vacuum condenser(model Q- 344B – Quimis Brazil) and ultrathermal bath (model Q – 214M2 – Quimis), obtaining a mass return from the gross extract. To isolate the methanol and ethyl-acetate fractions, we used vacuum filtration with solvents of varied polar characteristics from the extract (table 2). Test solutions were prepared at a concentration of 10 mg/mL, dissolved in DMSO and then diluted in distilled water to a concentration of 1024 µg/mL. A preliminary study(using only DMSO in various concentrations) was performed. We observed that DMSO (at the concentration used in the antibacterial and modular tests) did not show interference or toxicity.

Phytochemical analysis

Phytochemical tests were done to detect the presence of heterosids, saponins, tannins, flavonoids, steroids, triterpenes, cumarines, quinones, organic acids and alkaloids [22]. The tests were based on colorimetric readings or formation of precipitate following the

addition of specific reagents.

Drugs

Antibiotics used were: Amikacin, Gentamycin and Neomycin (SIGMAChemicals (St. Louis,USA) prepared according to the manufacturer's instructions.

Testing Antibacterial Activity

The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) was calculated by broth microdilution assay [23] using a 100 μ L inoculation from each bacterial strain, suspended in BHI broth at a concentration of 10^5 UFC/mL on 96 well microtiter plates, with serial twofold dilutions. To each well, we added 100 μ L of test solution with final concentrations varying between 512-8 μ g/mL. Standard antibiotics were used as a control (Amikacin, Gentamycin and Neomycin) whose final concentrations varied between 2500-2.4 μ g/mL. Plates were incubated at 35°C for 24 hours before colorimetric readings were performed with resazurin. MICs were recorded as the lowest concentrations for inhibition of growth.

Modulation of Bacterial Resistance

Extract and fractions were tested at a sub-inhibitory concentration (MIC/8) with 100 μ L of a solution containing BHI 10%, bacterial suspension and test solution. 100 μ L of antibiotic solution was added (in a proportion of 1:1) until the penultimate well. The concentrations of aminoglycosides varied between 5000-2.44 μ g/mL. Plates were incubated at 35°C for 24h, after which, colorimetric readings were made using resazurin. Tests were performed in triplicates [24].

Statistical Analysis

Data are expressed as geometric means. Statistical significance was assessed with a two-way ANOVA test followed by the Bonferroni post hoc test (where $p < 0.001$ was considered significant).

Results

The phytochemical analysis of the methanol (MFCC) and ethyl acetate (AFCC) fractions revealed the presence of several potentially bioactive compounds, such as: condensed tannins, flavones, flavonols, xanthones, chalcones, aurones, flavonoids, leucoanthocyanidins, catechins, and alkaloids (Table 3).

Antibacterial activity of MFCC and AFCC displayed a MIC of $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ against standard and multi resistant bacterial strains (an MIC value of $\leq 256 \mu\text{g/mL}$ was considered clinically relevant).

When combined with aminoglycosides, MFCC showed synergistic activity against tested bacterial strains (where we verified a reduction in antibiotic concentration in the presence of a natural product). Only the combination of amikacin and natural product did not affect bacterial growth (tested against *S. aureus*). In addition, the combination also resulted in reduced efficacy when assayed against *P. aeruginosa* (as seen by an increase on MIC of amikacin in the presence of natural product).

When investigating the modulation of bacterial resistance to aminoglycosides we found that when AFCC was combined with amikacin potentiated the antibiotics effects against *S. aureus* and *P. aeruginosa* while an antagonistic effect was observed against *E. coli*. When AFCC was combined with Gentamicin, it displayed antagonism against *S. aureus* and *E. coli*, an antagonistic effect against *P. aeruginosa*. When combined with neomycin, AFCC showed antagonism against *P. aeruginosa* and no difference when tested against *S. aureus* and *E. coli*. Synergism was characterized by a reduction in the

antibiotics' MIC while antagonism was defined as the increase in antibiotic MIC. Results were analyzed statistically and significance attained when $p < 0.001$. Sub inhibitory concentration of MFCC and AFCC were combined with aminoglycosides to test antibiotic resistance in multi-resistant bacterial strains (see Figures 1 and 2).

Discussion

The metabolites identified in the phytochemical analysis displayed a variety of biological activities such as antioxidant [25], antitumor, anti ophidic and antimicrobial [26]. Because they are factors of interaction among organisms, secondary metabolites frequently provide interesting biological activities [27].

Flavonoids represent one of the most important and diverse phenolic groups among the products produced by plants [27]. Recently, interest in the pharmacological properties of flavonoids has grown because they present a diverse array of activities [28], including antimicrobial [29]. This activity could be due to its ability to form complexes with extracellular soluble proteins (and cellular wall). The antimicrobial activity could also be attributed to the lipophilic character of the flavonoids, which could rupture the cellular membrane of microorganisms [30].

Tannins are described as substances with antimicrobial properties. This effect could be associated with the hydrolysis of a gallic acid ester bond, which works as a natural defense mechanism against microbial infections. The antimicrobial property of tannic acid can also be used in food processing to increase the shelf life of products. The tannin component of epicatechine and catechine (*Vaccinium vitisidaea L.*) had a strong antibacterial activity against fungi and bacteria [31].

Other studies that used active plant substances or natural products with antimicrobial and modulating activities have obtained satisfactory results [9]. The

antibacterial activity of isolated compounds depends on its chemical structure [32]. There are numerous mechanisms by which the extracts could inhibit the development of microorganisms. This could be partly due to a hydrophobic nature of some components. These can interact with the double lipid layer of the cellular membrane and affect the respiratory chain and energy production [33]. It may also increase the permeability to antibiotics leading to the suspension of vital cellular activity [34]. Interfering with enzymatic activity could also be a potential action mechanism [35].

Aminoglycoside antibiotics exhibit a bactericidal effect by binding to 30S sub units of bacterial ribosomes. This activity prevents ribosomal activity on the mRNA, consequently blocking protein synthesis [36]. The continuous use of aminoglycoside antibiotics should be controlled due to ototoxic and nephrotoxic effects [37,36].

When used in combination with Gentamicin and Neomycin, natural products obtained from plants could be used to minimize the undesirable effects of these antibiotics when used for the treatment of tested strains. When the natural product potentiates the effects of the antibiotic, the MIC of these drugs could be lowered to achieve therapeutic success [38].

The different activities (synergistic or antagonistic) of natural products on amikacin against resistant strains could be associated with structural differences of these aminoglycosides. These are hydrophilic molecules formed by an aminocyclitol ring linked to one or more amino sugars through a glycosidic connection. In most of these compounds used in the clinic, the aminocyclitol group is a 2-deoxystreptamine, which can be irreplaceable in the position 4 and 5 or 4 and 6 [39], therefore being able to interfere in the polarity, solubility and ultimately in the absorption of these drugs.

Conclusion

The results indicate that the methanol and ethyl acetate fractions obtained from *Croton campestris* leaves did not present clinically relevant antibacterial activity. However, when combined with antibiotics we report that MFCC and AFCC significantly modulate antibiotic resistance to aminoglycosides, reducing or potentiating the pharmacological action. Thus, natural products extracted from *Croton campestris* could represent an excellent therapeutic option in the treatment of infections, combining multiple compounds to create a greater effect. In the meantime, more in depth phytochemical studies are necessary to isolate and identify the substances responsible for modulating aminoglycosides antibiotic activity.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Brazilian research agencies CNPq and FUNCAP.

Conflict of interest

The authors have not conflict of interest to disclose.

References

1. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-JR JP, Lima EO: Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in ethicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010; 33: 467.
2. Verhoeff J, Beaujean D, Vlok H, Baars A, Meyler A, Werkwn VDC: A dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 461-466.
3. Scotland SM, Day NP, Willshaw GA, Rowe B: Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* 1980; 315: 90.

4. Hughes C, Muller D, Hacher J, Goebel W: Genetics and pathogenic role of *Escherichia coli* haemolysin. *Toxicon* 1982; 20: 247-252.
5. Murray PR: *Microbiologia médica*. 4a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.
6. Arora DS, Kaur GJ, Kaur H: Antibacterial Activity of Tea and Coffee: Their Extracts and Preparations. *Int J Food Prop* 2009; 12: 286-294.
7. Gurib-Fakim A: Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 1-93.
8. Gulcin I, Tel AZ, Kirecci E: Antioxidant, Antimicrobial, Antifungal, and Antiradical Activities of *Cyclotrichium Niveum* (BOISS.) Manden and Scheng. *Int J Food Prop* 2008; 11: 450-471.
9. Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-JR JP, Lima EO: *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Braz J Pharmacogn* 2008; 18(Supl.): 670-675.
10. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL: Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz J Microb* 2000; 31: 247-256.
11. Cohen ML: Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era. *Science* 1992; 257: 1050-1055.
12. Daza PRM: Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud* 1998; 22: 3.
13. Musumeci R: *Berberis aetnensis* C. Presl. extracts: antimicrobial properties and interaction with ciprofloxacin *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 48-53.
14. Heluani CS, Catalan CAN, Hernández LR Tapia, EB, Natan PJ: Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. *J Nat Prod* 2000; 63: 222-225.

15. Dalbó S: Avaliação da atividade antinociceptiva da subfração 63 (SF63) obtida a partir das cascas da *Croton celtidifolius* (Euphorbiaceae) – estudo do mecanismo de ação. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.
16. Camurça-Vasconcelos ALF, Bevilaqua CML, Morais SM, Maciel MV, Costa CT, Macedo IT, Oliveira LM, Braga RR, Silva RA, Vieira LS: Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Rev Bras Parasitol Vet* 2007; 148: 288-294.
17. Rao VS, Gurgel LA, Lima-Júnior RCP, Martins DT, Cechinel-Filho V, Santos FA: Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. *J Ethnopharmacol* 2007; 113: 357-360.
18. Babili FEL, Fabre N, Moulis C, Fouraste I: Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. *Fitoterapia* 2006;77:384-387.
19. Suárez AI, Blanco Z, Compagnone RS, Salazar-Bookaman MM, Zapata V, Alvarado C: Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 2006; 105: 99-101.
20. Lopes E Lopes MI, Saffi J, Echeverrigaray S, Henriques JA, Salvador M: Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. *J Ethnopharmacol* 2004; 95: 437-445.
21. Matias EFF, Santos KKA, Costa JGM, Coutinho HDM: Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. *Rev Bras Bioci* 2010; 8: 294-298.
22. Matos FJA: Introdução à Fitoquímica Experimental. 2ª Ed. Fortaleza, Edições UFC, 1997.

23. NCCLS: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; *Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A. Wayne, Pennsylvania, 2003.
24. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP: Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy* 2008b;54: 328-330.
25. Barreiros ALBS, David JM: Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. *Quím Nova* 2006;29: 113-123.
26. Okuda T, Yoshida T, Hatano T: Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Med* 1989; 55: 117-122.
27. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.
28. Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT: Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução* 2008; 27: 33-39.
29. Taleb-Contini SH, Salvador MJ, Watanabe E, Ito IY, Dionéia CRO: Atividade antimicrobiana dos flavonóides e esteróides isolados de duas espécies de *Chromolaena*. *Rev Bras Ciênc Farm* 2003; 30: 403-408.
30. Cowan MM: Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 564-582.
31. Ho KY, Tsai CC, Huang JS, Chen CP, Lin TC, Lin CC: Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea* L. *J Pharm Pharmacol* 2001; 53: 187-191.

32. Dorman HJD, Deans SG: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000; 88: 306-118.
33. Nicolson K, Evans G, O'toole PW: Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 179: 233-239.
34. Burt S: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 223-253.
35. Wendakoon C, Sakaguchi M: Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Int J Food Prop* 1995; 58: 280-283.
36. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT: Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím Nova* 2010; 33: 667-679.
37. Walsh C: *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press, Washington, 2003.
38. Figueredo FG, Ferreira EO, Lucena BFF, Torres CMG, Lucetti DL, Lucetti ECP: Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 1-5.
39. Magnet S, Blanchad JS: Molecular Insights into aminoglycosides Action and Resistance. *Chem Rev* 2005; 105: 477-497.

Table 1. Source of bacterial strains and antibiotic resistance profile.

Bacteria	Source	Resistance profile
<i>Staphylococcus aureus</i> SA358	Surgical wound	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	ATCC	–
<i>Escherichia coli</i> EC27	Surgical wound	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	ATCC	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA03	Tip of catheter	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	ATCC	–

Ast-Aztreonan; Ax- Amoxicilin; Amp-Ampicilin; Ami-Amikacin; Amox-Amoxilin, Ca-Cefadroxil; Cfc-cefaclor; Cf- Cefalotine; Caz-Ceftazidime; Cip-Ciprofloxacin; Clo –Clorafenicol; Im- Imipenem; Can-Kanamycin; Szt-Sulfametrim, Tet-Tetracilin; Tob- Tobramycina; Oxa- Oxacilin; Gen-Gentamicin; Neo-Neomycin; Para- Paramomycin; But- Butirosine; Sis-Sisomycin; Net- Netilmycin.

Table 2. Dry extract and yield of fractions methanolic and ethyl acetate (g)

Specie	Solvent used (Sigla)	Material	Dry mass	Yield
<i>Croton campestris</i> A.	Methanol (MFCC)	Extract	49	28.18
	Ethyl-acetate (AFCC)	Extract	49	3

MFCC – Methanol Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris*; AFCC – Ethyl acetate Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris*.

Table 3. Phytochemical prospection of the fractions of *Croton campestris*.

METABOLITES															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
MFCC	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AFCC	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

1 – Phenols; 2 – Hydrolyzable Tannins; 3 – Condensed Tannins; 4 – Anthocianins; 5 – Anthocianidines; 6 – Flavones; 7 – Flavonols; 8 – Xanthones; 9 – Chalcones; 10 – Aurones; 11 – Flavononols; 12 – Leucoanthocianidines; 13 – Catequines; 14 – Flavonones; 15 – Alkaloids; (+) presence; (-) absence. **MFCC**- Methanol Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris*; **AFCC**- Ethyl-acetate Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris*

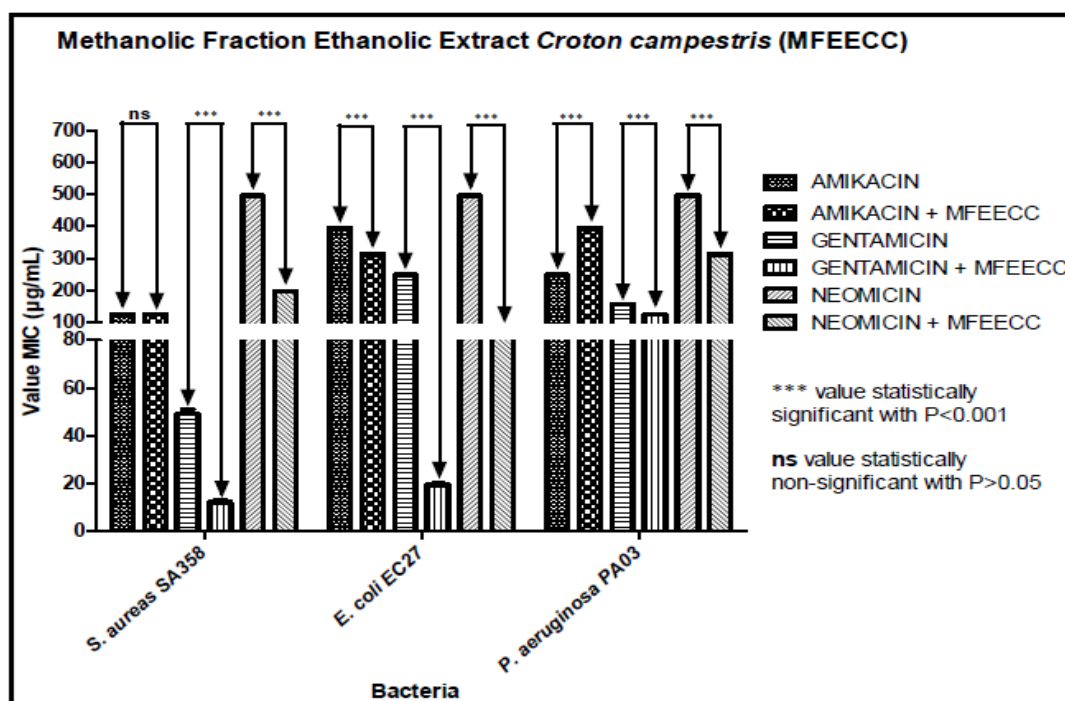
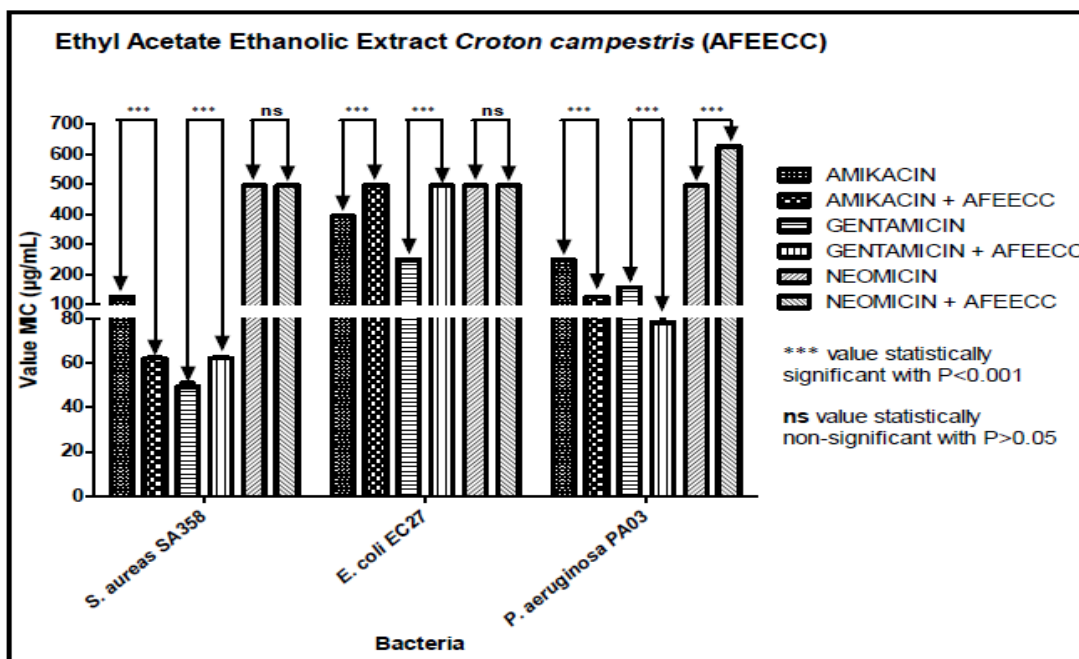
Figure 1. Modulatory antibiotic activity of the Methanol Fraction of the Ethanol Extract of *Croton campestris* (MFEECC) in association with aminoglycosides.

Figure 2. Modulatory antibiotic activity of the Ethyl-acetate Fraction of Ethanol Extract of *Croton campestris* (EECC) in association with aminoglycosides.



4 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- A análise fitoquímica revelou a presença de importantes classes de metabólitos secundários, sendo elas taninos, flavonoides e alcalóides.
- *Croton campestris* não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas.
- O extrato e as frações hexânica e diclorometano contribuíram de forma aditiva para a inibição dos microrganismos quando associados às drogas.
- A fração acetato de etila apresentou interação sinérgica associada a amicacina contra *S. aureus* 358 e *P. aeruginosa* 03, onde ocorreu a mesma significância sinérgica na associação da gentamicina contra *P. aeruginosa* 03.
- A fração metanólica apresentou sinergismo quando associada a amicacina contra *E. coli* 27, e a mesma significância sinérgica na associação da gentamicina e neomicina frente a todas as linhagens testadas.

5 REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AHMAD I. AND BEG A.Z. **Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens**, J. of Ethnopharmacol. 74: 113-123, 2001.
- ANDRADE. J. C. **Avaliação in vitro do Potencial modulador das vitaminas lipossolúveis colecalciferol, alfa- tocoferol e menadiona**. Dissertação, 174f. Mestrado em Bioprospeção Molecular, Universidade Regional do Cariri, Crato- CE, 2013.
- AZEVEDO, C.M.A. **Bioprospeção: Coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos**. Cad. n.17, 2º Ed. Revisada. Série Ciência e Pesquisa. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2003.
- BABILI, F. E. *et al.* **Three furano diterpenes from the bark of *Croton campestris***. Phytochemistry, v.48, p. 165-169, 1998.
- BABILI, F.EL.; FABRE, N.; MOULIS, C.; FOURASTE, I. **Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris***. Fitoterapia, 77: 384-387, 2006.
- BAILLON, H. **Etude générale du grupo dès Euphorbiacées**. Victor Masson, Paris, 1858.
- BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M. G.; BASTOS, F. I; XIMENES, R.A.A.; BARATA, R. B, RODRIGUES, L. C. **Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa**. (Saúde no Brasil 3) <http://download.thelancet.com/flatcontentassets/pdfs/brazil/brazilpor3.pdf>; acessado em 30 de janeiro de 2014.
- BENTHAM, G. Note on **Euphorbiaceae**. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 37, p.185-267, 1880.
- BERRY, P. **Croton Research Network Madison, University of Wisconsin Board of Regents**. 2006. Disponível em: <http://www.botany.wisc.edu/croton>. Acesso em março de 2009.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. Escola Superior de Agricultura de Mossoró. Ed. Fortaleza, 1976.
- BRASILEIRO, B.G.; PIZZILO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. **Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district**, Revista brasileira ciências farmacêutica, 42: 195-202, 2006.
- BRESOLIN, B.M.Z.; JULIA, K. D.; SILVA, S.E.F. **Pesquisa sobre a bactéria *staphylococcus aureus* na mucosa nasal e mãos de manipuladores de alimentos em curitiba/paraná/brasil** Estud. Biolog., Vol.27 (59), 2005.
- BRITO JUNIOR F E. **Bioprospeção farmacológica de plantas medicinais do nordeste brasileira: Avaliação da atividade gastroprotetora e antimicrobiana do**

***Croton campestris* A. St.-Hill.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA. Crato, 2010.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; MORAIS, S.M.; MACIEL, M.V.; COSTA, C.T.; MACEDO, I.T.; OLIVEIRA, L.M.; BRAGA, R.R.; SILVA, R.A.; VIEIRA, L.S. **Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils.** Veterinary parasitology, 148: 288-294, 2007.

CANTON, M. and ONOFRE, S. B. **Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 20(3): 348-354, 2010.

CARNEIRO-TORRES, D. S.; CORDEIRO, I.; FRANÇA, A família Euphorbiaceae na flora de inselbergs da região de Milagres, Bahia. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 20: p. 31-47, 2002.

CARNEIRO-TORRES, D. S. **Diversidade de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no bioma Caatinga-** Tese de Doutorado Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, p 387, 2009.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. ***Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality?** Braz J Infect Dis. Vol. 9(1): 70-6, 2005.

CAVALCANTI, S. *et al.* **Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a university hospital.** Braz J Infect Dis. Vol. 9(1): 56-63, 2005.

CORDEIRO, I. Euphorbiaceae. In: STANNARD, BL. (ed). Flora do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia-Brasil. **Royal Botanic Gardens Kew**, p. 300-317, 1995.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. **Euphorbiaceae. In: checklist das plantas do Nordeste brasileiro: angiospermas e gimnospermas.** Brasília: Ministério de Ciência Tecnologia, p. 71-74, 2006.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil.** Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1975.

COSTA, J.G.; RODRIGUES, F.F.G.; ANGÉLICO, E.C.; PEREIRA, C.K.B.; SOUSA, E.O.; CALDAS, G.F.R.; SILVA, M.R.; SANTOS, N.K.A.; MOTA, M, L.; SANTOS, P.F. **Composição química e avaliação da atividade antibacteriana e toxicidade do óleo essencial de *Croton zehntneri* (variedade estragol).** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, p.583-586, 2007.

COSTA, V.C.O.; TAVARES, J.F.; AGRA, M.F.; FALCÃO-SILVA, V.S.; FACANALI, R.; VIEIRA, M.A.R.; MARQUES, M.O.M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, M.S. **Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries.** Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol.18(2): 245-248, 2008.

COUTINHO, H.D. M; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J.P. **Increasing of the Aminoglycoside Antibiotic Activity Against a Multidrug-Resistant *E. coli* by *Turnera ulmifolia* L. and Chlorpromazine.** Biological Research for Nursing 11(4) 332-335, 2010.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; SIQUEIRA, JR.J.P.; LIMA, E.O. ***In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains.** Brazilian journal of pharmacognosy, 18 (Supl.): 670-675, 2008.

COUTINHO, HDM; COSTA, JG; LIMA, EO; FALCÃO-SILVA, VS; SIQUEIRA-JÚNIOR, JP. **Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine.** Chemotherapy, Vol.54: 328-330, 2008.

CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. EDEL. 1982.

DIAS, M.; MONTEIRO, M.S. Antibióticos e Resistência Bacteriana, Velhas Questões, Novos Desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação,** 2010.

DOURADO, R. C. M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: *Croton sonderianus* – Euphorbiaceae.** Tese de doutorado, Fortaleza, UFC, 2003.

DUARTE M.C.T., FIGUEIRA G.M., SARTORATTO A., REHDER V.L.G., MACHADO A.L.M., DELARMELINA C. **Anti-Candida activity of essential oils and extracts from native and exotic medicinal plants used in Brazil.** J. of Ethnopharmacol. 97: 305-311, 2005.

DURANTE-MANGONI, E.; GRAMMATIKOS, A., UTILI, R.; FALAGAS, M. **Do we still need the aminoglycosides?** International journal of Antimicrobial Agents. Vol.33: 201-205, 2009.

DUTRA MG. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás.** Anápolis. 112p. Mestrado em sociedade, tecnologia e meio ambiente. Centro Universitário de Anápolis, 2009.

ELVIN-LEWIS, Memory. **Should we be concerned about herbal medicines?** Journal ethnopharmacology, 75: 141-164, 2001.

ETHUR LZ, JOBIM JC, RITTER JG, OLIVEIRA G, TRINDADE BS. **Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquí – RS.** Rev. Bras. Pl. Med. 13(2): 121-128, 2011.

FERREIRA, A.B.L. **Identificação da atividade Antibiótica e relação Estrutura-atividade de moléculas de origem sintética e animal** – Dissertação, 110f, Mestrado em Neuroimunologia – Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ, 2007.

FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E.D.; PEZENTI E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S.B. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae).** Revista Brasileira de Farmacognosia. Vol. 17(2): 224-230, 2007.

FORTES, F.B.B. **Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de matéria avícola no estado do Rio Grande do sul e sua relação com a patogenicidade.** 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, 2008.

FOURMY, D.; RECHT, M.I.; BLANCHARD, S.C.; PUGLISI, J.D. **Structure of the A-site of *E. coli* 16 S rRNA complexed with an aminoglycoside antibiotic.** *Science*, 274: 1367–1371, 1996.

FUSELLI, S.; TARAZONA-SANTOS, E.; DUPANLOUP, I.; SOTO, A.; LUISELLI, D.; PETTENER, D. *Mol. Biol. Evol.*, Vol.20, pp.1682-1691, 2003.

GIBBONS, S. **Anti-staphylococcal plant natural products.** *Natural products reports*, 21: 263-277, 2004.

GILBERT, D.N. Aminoglycosides. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases.** 4th ed. New York: Churchill Livingstone, p.279-306, 1995.

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

HELUANI, C.S.; CATALAN, C.A.N.; HERNÁNDEZ, L.R.; TAPIA, E.B.; NATAN, P.J. **Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*.** *Journal of natural products*, 63: 222-225, 2000.

JACOBY, G. A. **Mechanisms of resistance to quinolones.** *Clinical Infectious Diseases*. Vol. 41: 120-26, 2005.

JANA, S.; DEB, J.K. **Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance.** *Applied microbiology and biotechnology*, 70: 140–150, 2006.

JANSEN A.M., SCHEFFER J.J.C., BAERHEIM S. A. **Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species,** *Pharmazie* 45: 70, 1987.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, S.L.; MCLAUGHLIN, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of medicinal chemistry*, 39: 3107-3113, 1996.

JUNAID S.A. et al (2008). **Evaluation of *Securidaca longipendunculata* leaf and root extracts for antimicrobial activities.** Acedido a 05 de Dezembro de 2010, em: www.academicjournals.org/ajmr.

KATZUNG, Bertram G. **Farmacologia básica e clínica.** 10. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

KOTRA, L.P.; HADDAD, J.; MOBASHERY, S. **Aminoglycoside: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance.** *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44: 3249–3256, 2000.

LOPES E LOPES, M.I.; SAFFI, J.; ECHEVERRIGARAY, S.; HENRIQUES, J.A.; SALVADOR, M. **Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems.** *Journal of ethnopharmacology*, 95: 437-445, 2004.

LÓPEZ, C.A.A. **Considerações gerais sobre plantas medicinais.** *Ambiente: Gestão e Desenvolvimento*, v. 1, n.1, p. 19-27, 2006.

LOWY, F. ***Staphylococcus aureus* infection.** *The New England journal of medicine*, 339: 520-532, 1998.

- LUCENA, M. F. A. **Estudos taxonômicos do gênero *Croton* L. (Crotonoideae-Euphorbiaceae) nas Zonas do Litoral e da Mata do estado de Pernambuco- Brasil.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 136p, 2001.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR., V.F. **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares,** Química Nova, v. 25, n. 3, 429-438, 2002.
- MAHASNEH A.M.A., ADEL M.A., EL-OQLAH A.A.B. **Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan,** J. of Ethnopharmacol. 64(3): 271-276, 1999.
- MANN, C.M.; MARKHAN, J.L. **A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils.** Journal of applied microbiology, 84: 538-544, 1998.
- MATIAS, E. F. F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (velame do campo), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) e *Cordia verbenaceae* DC. (erva baleeira).** Mestrdo em Bioprospeção Molecular, Universidade regional do Cariri-URCA, Crato- CE, 2010).
- MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. **Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC.** Latin American Journal of Pharmacy, v. 29, n. 6, p. 1049-1052, 2010.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** 2ª Ed. – Fortaleza: UFC. 1997.
- MATOS, F.J.A. **Plantas Mediciniais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** Fortaleza: IOCE, 1989.
- McGOWAN Jr, J.E. **Minimizing antimicrobial resistance: The key role of the infectious diseases Physician,** Clinical infectious disease, v: 38, n. 7, p. 939-942, 2004.
- MONTEIRO, P.A. **Atividade anticâncer de extratos e frações obtidos de *Croton campestris* A.St.-Hil.** Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP, 2012.
- MUELLER, J. *Croton.* In CANDOLLE, A. P. **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis,** v. 15, Victor Masson, Paris: p. 511-708, 1866.
- MUELLER, J. *Croton.* In MARTIUS, C.F P.; EICHLER, A.G. (eds.). **Flora brasiliensis,** v. 11. F. Fleischer, Lipsiae: p. 81-274, 1873.
- MUELLER, J. **Euphorbiaceae. Linnaea,** v.34, p. 77-142, 1865.
- MURRAY P.R. *et al.* **Microbiologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000
- MURRAY, P.R. ROSENTHAL, K.S., PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica.** Tradução Carlos Pelleschi Taborda et al. 6 ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2010.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 5^a ed. Villanova, PA: NCCLS approved standard M7-A5, 20: 2, 2000.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica**. Revista Brasileira de Farmacognosia, Vol. 16(1): 77-82. 2006.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. **Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis***. Antimicrobial agents and chemotherapy, 46: 2720-2722, 2002.

PAYO, H. A. *et al.* **Tamizaje fitoquímica preliminary de espécies del gênero *Croton* L.** Revista Cubana de Farmácia, v 35, p. 203-206, 2001.

PIDDOC, L.J. V. **Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance**. Nature Reviews Microbiology, Vol.4: 629-636, 2006.

PINSETTA, R.F. **Síntese e relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de um fármaco segura para o tratamento da doença de ménière**. Dissertação, 122f. Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2010.

PUEBLA, P. *et al.* **Neo-clerodane diterpenoids from *Croton schiedeanus***. Phytochemistry, v. 62, p. 551-555, 2003.

RANGE, H.P. **Farmacologia**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 829 p.

RAO, V S.; GURGEL, L.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; MARTINS, D.T.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, F.A. **Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice**. Journal of ethnopharmacology, 113: 357-360, 2007.

RIBEIRO PRATA, E. M.; PAULO, M. Q.; SOUZA BRITO, A. R. M. **Isolamento do princípio ativo de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae)**. Revista Brasileira de Farmacologia, 74.n. 2, p. 36-41, 1993.

RIBEIRO, M.A.R. **Public health and chemical-pharmaceutical companies**. História, ciências, saúde—Manguinhos, 7: 607-626, 2001.

RIZSK, A.F. 1987. **The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae**. Botanical Journal of the Linnean Society 94: 293-326.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. **Traditional uses, chemistry and pharmacology of croton espécies (Euphorbiaceae)**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.18, n. 1, p.11-33, 2007.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. ***Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar**. J Bras Patol Med Lab. Vol. 43(6): 413-423, 2007.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPEMA, J.; KUSTER, R.M. **Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia 15, n.4, p. 321-325, out/dez, 2005.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. Microbiologia: **Macanismo das doenças infecciosas**. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia**: um texto ilustrado/Carlos Henrique de Menezes e Silva. Teresópolis, RJ, Eventos, p. 121-134, 165-206, 1999.

SILVA, J. S. *et al.* **O gênero *Croton* (Euphorbiaceae) na microrregião do Vale do Ipanema, Pernambuco, Brasil**. Rodriguésia, v 60, n.4, p. 879-901, 2009.

SILVA, J.G.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. **Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. Em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus***. Revista brasileira de farmacognosia, Vol. 17: 572-577, 2007.

SILVEIRA, G.P. *et al.* **Estratégias utilizadas no combate a resistência microbiana**, Química Nova, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 1102, 2010.

SOUSA, E.O.; BARRETO, F.S.; RODRIGUES, F.F.G.; COSTA, J.G.M. **Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* Linn e *Lantana montevidensis* Briq na resistência de aminoglicosídeos**. Revista brasileira de Biociências, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2011.

SOUZA, O. C. *et al.* **Antimicrobial resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in feces of patients infected with human immunodeficiency vírus**. Caderno Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v.15, n.3, p. 392 -379, 2007.

SUÁREZ, A.I.; BLANCO, Z.; COMPAGNONE, R.S.; SALAZAR-BOOKAMAN, M.M.; ZAPATA, V.; ALVARADO, C. **Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract**. Journal of ethnopharmacology, 105: 99-101, 2006.

TAVARES, W. **Aminociclítóis aminoglicosídeos**. In: TAVARES W, ed. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos. São Paulo: Atheneu, p. 573-626, 2001.

TOMAZZONI MI, NEGRELLE RR, CENTA ML. **Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica**. Texto e Contexto Enfermagem 15(1): 115-121, 2006.

TORTORA, GJ; FUNKE, BR; CASE, CL. **Microbiologia**, 8 ed. Porto Alegre, Artmed, 2008.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia. *Staphylococcus aureus***. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRABULSI, L.R; RACHID, L. **Microbiologia**. 4 ed, São Paulo: Atheneu, 2004.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. C F.; BRANQUINHA, M. **Bacteriologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007, 582 p.

VERMELHO, A.B.; PEREIRA, F.P.; COELHO, R.R.R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 239 p, 2006.

VIEGAS, J.R.; BOLZANI, V.S. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Química Nova, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOGT, B. **Urate oxidase (rasburicase) for treatment of severe tophaceous gout**. Nefrology, Dyalysis, Transplantation, v. 20, n. 2, p. 431 – 433, 2005.

WEBSTER, G. L. **A provisional synopsis of the section of the genus *Croton* (Euphorbiaceae)**. Taxon, v. 42, p. 793-823, 1993.

WITTE, W. **Ecological impact of antibiotic use in animals on different complex microflora: environment**. International Journal of Antimicrobial Agents, Vol.14 (4), 321-325, 2000.

ANEXOS

----- Forwarded message -----

From: **Editorial Office EUJIM** <avalorenc@hotmail.com>

Date: 2014-03-05 5:12 GMT-03:00

Subject: Your Submission

To: hdmcoutinho@gmail.com, hdouglas@zipmail.com.br

Ms. Ref. No.: EUJIM-D-13-00200R2

Title: Association Between Drugs and Herbal Products: In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)

European Journal of Integrative Medicine

Dear Prof. Henrique Coutinho,

I am pleased to inform you that your paper "Association Between Drugs and Herbal Products: In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae)" has been accepted for publication in European Journal of Integrative Medicine.

Below are comments from the editor and reviewers.

Thank you for submitting your work to European Journal of Integrative Medicine.

Yours sincerely,

Prof. Nicola Robinson, PhD

Editor-in-Chief

European Journal of Integrative Medicine

Comments from the editors and reviewers:



Henrique Douglas Coutinho <hdmcoutinho@gmail.com>

JONM: A manuscript number has been assigned to In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of Croton campestris A. (Euphorbiaceae)

Journal of Natural Medicines (JONM) <arun.sundar@springer.com>

31 de outubro de 2013 12:36

Para: Henrique Coutinho <hdmcoutinho@gmail.com>

Dear Dr. Coutinho,

Your submission entitled "In vitro Enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of Croton campestris A. (Euphorbiaceae)" has been assigned the following manuscript number: JONM-D-13-00491.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jonm.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,
Arun Sundar
Springer Journals Editorial Office
Journal of Natural Medicines

**ASOCIACION
TOXICOLOGICA
ARGENTINA**

ASOCIACIÓN CIVIL
(Adherida a la IUTOX)

**ASOCIACION
TOXICOLOGICA
ARGENTINA
PRESIDENTE**

**ASOCIACIÓN CIVIL
(Adherida a la IUTOX)
VICE-PRESIDENTE**

Adriana Ridolfi

SECRETARIO

Gerardo D. Castro

TESORERO

Marta L. Oneto

VOCALES

Marcela M. López Nigro
Patricia Quiroga
Mónica C. Napolí

VOCALES SUPLENTE

Maria C. Travella
Gabriela Florenza
Marta D. Mudry

COMITÉ CIENTÍFICO

Nelson Albarran
José A. Castro
Lucrecia Ferrari
Mirtha Nasotto
Marta M. Salcedo

TRIBUNAL DE HONOR

Susana I. Garcia
Irma Giolito
Augusto Piazza

ORGANO DE FISCALIZACIÓN

Milena E. Ryzak
Claudia V. Vasena
Virginia V. Crapanzano

DIRECCIÓN POSTAL

A. ALSINA 1441 - Of. 302
C1088AAK BUENOS AIRES
REPÚBLICA ARGENTINA

TEL/FAX
(54 11) 4381-6919

e-mail: ata@dd.com.ar

Internet

www.ataonline.org.ar

Buenos Aires, 9 de novembro de 2013.

Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular,
Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri – URCA,
Crato-CE, Brasil.
Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pimenta, 63105-000.
Fone: +55(88)31021212; Fax +55(88) 31021291.
E-mail: hdmcoutinho@gmail.com

Estimado Dr. Henrique Coutinho

A presente carta tem por objetivo comunicar que o manuscrito "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E POTENCIAL ANTIPARASITÁRIO *IN VITRO* DO a-PINENO E CARVACROL. " foi aceito para publicação como artigo na Acta Toxicológica Argentina.

Agradecemos por haver confiado seus resultados à revista.



Dr. Adolfo Rafael de Roodt
Diretor
Acta Toxicológica Argentina

ARTÍCULO ORIGINAL

Atividade antiparasitária *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*

Actividad antiparasitaria *in vitro* citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*

In vitro* cytotoxic and antiparasitic activity of caryophyllene and eugenol against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania brasiliensis

MSc. Nadghia F. Leite, MSc. Celestina E. Sobral-Souza, BSc. Rosimeire S. Albuquerque, MSc. Dara I. V. Brito, MSc. Anne K. L. S. Lavor, BSc. Liscássia B. B. Alencar, BSc. Saulo R. Tintino, BSc. João V. A. Ferreira, MSc. Fernando G. Figueredo, MSc. Luciene F. Lima, PhD. Francisco A. B. Cunha, PhD. Antônio I. Pinho, PhD. Henrique D. M. Coutinho

Universidade Regional do Cariri. Crato-CE, Brasil.

Research Article

Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage

Ednardo Fagner Ferreira Mattias,^{1,2,3} Ertvânia Ferreira Alves,³
Beatriz Sousa Santos,³ Celestina Elba Sobral de Souza,⁴
João Victor de Alencar Ferreira,⁴ Anne Karyzia Lima Santos de Lavor,⁴
Fernando Gomes Figueredo,⁴ Luciene Ferreira de Lima,⁴
Francisco Antônio Vieira dos Santos,³ Florido Sampaio das Neves Petxoto,³
Aracélio Viana Colares,^{2,3,5} Aline Augusti Boligon,⁶ Rogério de Aquino Saraiva,⁶
Margareth Linde Athayde,⁶ João Batista Teixeira da Rocha,⁶ Irwin Rose Alencar Menezes,⁴
Henrique Douglas Melo Coutinho,⁷ and José Galberto Martins da Costa^{2,3,4}

¹ Universidade Estadual do Ceará-UECE-60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

² Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO-60740-000, Fortaleza, CE, Brazil

³ Faculdade Leão Sampaio-CE-FALS-63180-000, Juazeiro do Norte, CE, Brazil

⁴ Universidade Regional do Cariri-URCA-63100-000, Crato, CE, Brazil

⁵ Universidade Federal do Maranhão-UFMA-65085-580, São Luís, MA, Brazil

⁶ Universidade Federal de Santa Maria-UFSM-97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

⁷ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato-CE, Brazil. Rua Cel. Antonio Luis 1161, Pterenia 63105-000, Brazil

Correspondence should be addressed to Henrique Douglas Melo Coutinho; hdmcoutinho@gmail.com

Received 5 April 2013; Revised 1 May 2013; Accepted 4 May 2013

Academic Editor: Ulysses Paulino de Albuquerque

Copyright © 2013 Ednardo Fagner Ferreira Mattias et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Knowledge of medicinal plants is often the only therapeutic resource of many communities and ethnic groups. "Erva-baleeira," *Cordia verbenacea* DC., is one of the species of plants currently exploited for the purpose of producing a phytotherapeutic product extracted from its leaves. In Brazil, its major distribution is in the region of the Atlantic Forest and similar vegetation. The crude extract is utilized in popular cultures in the form of hydroalcoholic, decoctions, and infusions, mainly as antimicrobial, anti-inflammatory, and analgesic agents. The aim of the present study was to establish a chemical and comparative profile of the experimental antibacterial activity and resistance modifying activity with ethnopharmacological reports. Phytochemical prospecting and HPLC analysis of the extract and fractions were in agreement with the literature with regard to the presence of secondary metabolites (tannins and flavonoids). The extract and fraction tested did not show clinically relevant antibacterial activity, but a synergistic effect was observed when combined with antibiotic, potentiating the antibacterial effect of aminoglycosides. We conclude that tests of antibacterial activity and modulating the resistance presented in this work results confirm the ethnobotanical and ethnopharmacological information, serving as a parameter in the search for new alternatives for the treatment of diseases.

1. Introduction

In many developing countries, various communities do not have sufficient resources to meet their needs with regard to obtaining medicine to treat various diseases [1]. Thus, these

communities often depend on natural resources, including native plant species to fulfill or complement their therapeutic resources [2–4].

Popular observations on the use of medicinal plants contribute in a relevant way to spread awareness of the

Chapter 3

**USE OF NATURAL PRODUCTS TO ENHANCE
THE ANTIBIOTIC ACTIVITY OF GENTAMICIN
AND OTHER AMINOGLYCOSIDES:
THE FUTURE OF ANTIBIOTIC THERAPY**

*Cícera Natalia Figueirêdo Leite Gondim¹,
Nadghia Figueiredo Leite¹, Jacqueline Cosmo Andrade¹,
Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga¹,
Glaucia Morgana de Melo Guedes¹,
Saulo Relison Tintino¹, Cícera Cislânia Araújo Tavares¹,
Maria Audilene de Freitas¹,
Liscássia Beatriz Batista Alencar¹,
Celestina Elba Sobral de Souza¹,
Rosimeire Sabino Albuquerque¹,
Edinardo Fagner Ferreira Matias¹,
Francisco Assis Bezerra da Cunha¹,
Dara Isabel Vieira de Brito¹,
Anne Karyzia Lima Santos de Lavor¹,
João Victor de Alencar Ferreira¹,
Fernando Gomes Figueredo¹, Luciene Ferreira de Lima¹
and Henrique Douglas Melo Coutinho²*

¹Departamento de Ciências Biológicas, ²Departamento de Química
Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, CE, Brasil

Complimentary Contributor Copy

APÊNDICE

Tabela 1: Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos do extrato etanólico de *Croton campestris* A.

<i>S. aureus</i>								
A	A+EECC	%	G	G+EECC	%	N	N+EECC	%
124,0	31,00	75	49,22	7,751	84	496,1	78,13	84
<i>E. coli</i>								
A	A+EECC	%	G	G+EECC	%	N	N+EECC	%
393,7	62,01	84	248	31,00	87,5	496,1	78,13	84
<i>P. aeruginosa</i>								
A	A+EECC	%	G	G+EECC	%	N	N+EECC	%
248,0	196,9	21	156,3	19,53	87,5	496,1	98,43	80

EECC = Extrato Etanólico de *Croton campestris* A.; A= Amicacina, G= Gentamicina e N= Neomicina.

Tabela 2: Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos da fração hexânica obtida do extrato etanólico de *Croton campestris* A.

<i>S. aureus</i>								
A	A+FHEECC	%	G	G+FHEECC	%	N	N+FHEECC	%
124,0	62,01	50	49,22	15,50	68,5	496,1	145,15	71
<i>E. coli</i>								
A	A+FHEECC	%	G	G+FHEECC	%	N	N+FHEECC	%
393,7	78,13	80	248,0	9,77	96	496,1	196,9	60
<i>P. aeruginosa</i>								
A	A+FHEECC	%	G	G+FHEECC	%	N	N+FHEECC	%
248,0	124,0	50	156,3	15,50	90	496,1	124,0	75

FHEECC = Fração Hexânica do Extrato Etanólico de *Croton Campestris* A.; A= Amicacina, G= Gentamicina e N= Neomicina.

Tabela 3: Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos da fração diclorometano obtida do extrato etanólico de *Croton campestris* A.

<i>S. aureus</i>								
A	A+FDEECC	%	G	G+FDEECC	%	N	N+FDEECC	%
124,0	98,43	21	49,22	19,53	60	496,1	196,9	60
<i>E. coli</i>								
A	A+FDEECC	%	G	G+FDEECC	%	N	N+FDEECC	%
393,7	248,0	37	248,0	39,06	84	496,1	196,9	60
<i>P. aeruginosa</i>								
A	A+FDEECC	%	G	G+FDEECC	%	N	N+FDEECC	%
248,0	49,22	80	156,3	19,53	87,5	496,1	156,3	68,5

FDEECC = Fração Diclorometano do Extrato Etanólico de *Croton campestris* A.; A = Amicacina, G = Gentamicina e N = Neomicina.

Tabela 4: Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos da fração acetato de etila obtida do extrato etanólico de *Croton campestris* A.

<i>S. aureus</i>								
A	A+FAEECC	%	G	G+FAEECC	%	N	N+FAEECC	%
124,0	62,01	50	49,22	62,01	26	496,1	496,1	0
<i>E. coli</i>								
A	A+FAEECC	%	G	G+FAEECC	%	N	N+FAEECC	%
393,7	496,1	26	248,0	496,1	100	496,1	496,1	0
<i>P. aeruginosa</i>								
A	A+FAEECC	%	G	G+FAEECC	%	N	N+FAEECC	%
248,0	124,0	50	156,3	78,13	50	496,1	625,0	2 6

FAEECC = Fração Acetato de Etila do Extrato Etanólico de *Croton campestris* A.; A= Amicacina, G= Gentamicina e N= Neomicina.

Tabela 5: Atividade moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos da fração metanólica obtida do extrato etanólico de *Croton campestris* A.

<i>S. aureus</i>								
A	A+FMEECC	%	G	G+FMEECC	%	N	N+FMEECC	%
124,0	124,0	0	49,22	13,30	73	496,1	196,9	60
<i>E. coli</i>								
A	A+FMEECC	%	G	G+FMEECC	%	N	N+FMEECC	%
393,7	312,5	20,6	248,0	19,53	92	496,1	98,43	81
<i>P. aeruginosa</i>								
A	A+FMEECC	%	G	G+FMEECC	%	N	N+FMEECC	%
248,0	393,7	58,7	156,3	124,0	20,7	496,1	312,5	37

FMEECC = Fração Metanólica do Extrato Etanólico de *Croton campestris*; A= Amicacina, G= Gentamicina e N= Neomicina.