

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
CORVINA *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) FRENTE A  
ANTIMICROBIANOS COMERCIAIS E NATURAIS**

**JOADSON DOS SANTOS REIS  
Bacharel em Biologia**

**CRUZ DAS ALMAS  
BAHIA - BRASIL  
2019**

**JOADSON DOS SANTOS REIS**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE  
CORVINA *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) FRENTE A  
ANTIMICROBIANOS COMERCIAIS E NATURAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal  
do Recôncavo da Bahia, como parte  
das exigências do Curso de  
Graduação de Bacharelado em  
Biologia, para obtenção do título de  
Bacharel em Biologia.

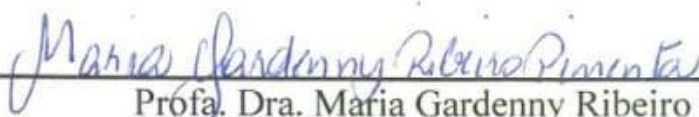
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria  
Gardenny Ribeiro Pimenta.  
Coorientador: Prof. Dr. Robson  
Bahia Cerqueira.

CRUZ DAS ALMAS  
BAHIA - BRASIL  
2019

Joadson dos Santos Reis

“Perfil de resistência de cepas de *Escherichia coli* isoladas de corvina *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) frente a antimicrobianos comerciais e naturais”

BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dra. Maria Gardenny Ribeiro Pimenta  
(orientadora)

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



---

Prof. Dra. Franceli da Silva  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)



---

Prof. Dra. Márcia Luciana Cazetta  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

CRUZ DAS ALMAS

DEZEMBRO-2019

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Nildaci Máximo e Joselino Reis, por me dar todo amor e apoio necessário para chegar até aqui e ir além, e por colocarem a minha vida e sonhos em primeiro lugar em suas próprias vidas.

Agradeço aos meus avós por estarem sempre presente em cada momento que precisei, pelos conselhos e guiamentos, pelas orações e por todo apoio dado. E aos meus tios e primos que me apoiaram e que acreditam no meu potencial e me incentivam sempre.

Agradeço aos meus amigos que me acompanham desde os tempos do IFBA, Allef, Amanda e Jean, por estarem comigo a todo o tempo, pelos almoços em família e pelas picuinhas também (risos). A Alana, Bruna, Dayala, Eduarda, Lucas Nascimento, Pedro e Robert, Jhones, Thais, por todo companheirismo e aventuras que vivemos em todos esses anos.

A meu orientador, professor Robson Bahia por todo o conhecimento compartilhado e por ter me dado a oportunidade de iniciar minha experiência científica no Laboratório de Doenças Infecciosas, onde aprendi boa parte do que forma o meu conhecimento sobre a área que escolhi seguir.

A todos os amigos que encontrei no LDI, pessoas incríveis que me acolheram com muito amor: Kayck, Sarah, Luana, Ana Flavia, Breno, Ana Alice, Herika, e Vinicius que é como um mentor para todos nós, compartilhando todo o seu conhecimento, agradeço por todos os conselhos e incentivos.

Agradeço imensamente a melhor orientadora Maria Gardenny Pimenta, por todo conhecimento compartilhado, por ser tão carinhosa com seus orientandos, por sua generosidade, disponibilidade e por acreditar no meu potencial.

A Michele, Tainá e Luane pela parceria no LABIOM. A todos os professores que compartilharam suas experiências e contribuíram para a minha formação.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <b>Rendimento dos extratos etanólicos preparados em repouso</b> .....	19
Tabela 2 - <b>Rendimento dos extratos etanólicos preparados sob agitação</b> .....	20
Tabela 3 - <b>Valores de EC<sub>50</sub> dos extratos do Mastruz no teste de DPPH</b> .....	21
Tabela 4 - <b>Valores de EC<sub>50</sub> dos extratos da Aroeira no teste de DPPH</b> .....	22
Tabela 5 - <b>Comportamento das cepas no antibiograma frente aos antimicrobianos</b> .....	24

## RESUMO

REIS, JOADSON DOS SANTOS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECONCAVO DA BAHIA, DEZ/2019. **PERFIL DE RESISTÊNCIA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE CORVINA *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) FRENTE A ANTIMICROBIANOS COMERCIAIS E NATURAIS.** Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Gardenny Ribeiro Pimenta. Coorientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira.

O controle de infecções, especialmente hospitalares e intoxicação alimentar, se tornam mais difíceis de tratar quando os patógenos responsáveis por causar tais infecções são resistentes aos antimicrobianos existentes, este fato está associado ao uso indiscriminado de antimicrobianos que causa pressão seletiva nos microrganismos. O objetivo deste trabalho foi verificar a susceptibilidade de 17 cepas de *Escherichia coli* isoladas de peixes frente a antimicrobianos comerciais, antimicrobianos de origem natural e investigar os possíveis mecanismos de resistência utilizados por estas bactérias. Foi utilizado o antibiograma para selecionar as cepas resistentes aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, além de ser verificada também a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases pelas cepas utilizando testes fenotípicos. Foi avaliada também a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos etanólicos da aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e do mastruz (*Dysphania ambrosioides*) frente às cepas de *Escherichia coli*. Os isolados apresentaram taxas consideráveis de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos: Cefotaxima (64,7%) e Ampicilina (52,9%), e resistência intermediária para Ceftriaxona (47%). Dos isolados analisados 15 reagiram positivos para a produção de enzima  $\beta$ -lactamase. Os extratos etanólicos da Aroeira e do Mastruz apresentaram atividade antioxidante no teste de DPPH. Os extratos da aroeira não foram eficazes em inibir o crescimento das cepas de *E. coli*, os extratos do mastruz apresentou formação de halos, porém inferiores ao tamanho mínimo preconizado pela NCCLS para ser considerado como atividade inibitória. Os isolados de *E. coli* apresentaram resistência aos antimicrobianos comerciais e naturais utilizados nos testes, apresentando mecanismos de resistência como a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -lactamases, Extratos vegetais, Antioxidante.

## ABSTRACT

REIS, JOADSON DOS SANTOS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECONCAVO DA BAHIA, DEZ/2019. **RESISTANCE PROFILE OF *Escherichia coli* ISOLATED FROM CORVINE *Micropogonias furnieri* (DESMAREST, 1823) AGAINST COMMERCIAL AND NATURAL ANTIMICROBIANS.** Advisor: Prof. Dr. Maria Gardenny Ribeiro Pimenta. Co-advisor: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira.

Infection control, especially hospital infections and food poisoning, becomes more difficult to treat when the pathogens responsible for causing such infections are resistant to existing antimicrobials, this fact is associated with the indiscriminate use of antimicrobials that causes selective pressure on microorganisms. In the present study was intent to verify the susceptibility of 17 strains of *Escherichia coli* isolated from fish to commercial and naturally antimicrobials, and to investigate the possible resistance mechanisms used by them. It was used the antibiogram test to select the resistant isolates to antimicrobial  $\beta$ -lactams, it was also verified the production of  $\beta$ -lactamases enzymes by the microorganisms using phenotypic tests. Was also evaluated the antioxidant and antimicrobial activity of the ethanolic extracts of aroeira (*Schinus terebinthifolius*) and mastruz (*Dysphania ambrosioides*) against *E. coli* strains. The isolates showed considerable rates of  $\beta$ -lactam resistance: Cefotaxime (64.7%) and Ampicillin (52.9%), and intermediate resistance to Ceftriaxone (47%). Among the isolates analyzed 15 reacted positive for the production of  $\beta$ -lactamase enzyme. The ethanolic extracts of aroeira and mastruz show antioxidant activity in the DPPH test, the aroeira extracts were not effective in inhibiting the growth of *E. coli* isolates. The extracts of the mastruz presented halo formation, but smaller than the minimum size recommended by the NCCLS to be considered as inhibitory activity. The isolates of *E. coli* showed resistance to commercial and natural antimicrobials used in the tests, presenting resistance mechanisms such as the production of  $\beta$ -lactamases enzymes.

**Keywords:**  $\beta$ -lactamases, Plant extracts, Antioxidant.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Geral: .....	14
2.2 Específicos:.....	14
3. METODOLOGIA.....	15
3.1. Coleta do material biológico.....	15
3.2. Obtenção dos extratos.....	15
3.2.1. Preparo do material vegetal e elaboração dos extratos .....	15
3.2.2. Rendimento do extrato total.....	16
3.2.3. Atividade antioxidante.....	16
3.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	17
3.3.1. Antimicrobianos comerciais e naturais .....	17
3.3.1.1. Método sinérgico do duplo disco .....	18
3.3.1.2. Teste de susceptibilidade a cefoxitina.....	18
3.4. Análise dos dados .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Extratos etanólicos .....	19
4.1.1. Triagem fitoquímica.....	19
4.1.2. Atividade antioxidante (DPPH).....	21
4.2. Atividade antimicrobiana.....	23
4.2.1. Antimicrobianos comerciais .....	23
4.2.1.1. Teste de sinergismo com os antimicrobianos comercias.....	25
4.2.1.2. Produção de AmpC cromossomal.....	26
4.2.2. Antimicrobianos naturais .....	26
5. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS .....	29
APÊNDICES.....	38



## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da antibioticoterapia revolucionou o tratamento dos quadros de infecções, permitiu avanços nas técnicas cirúrgicas e o desenvolvimento de novos fármacos (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2015). No entanto, a utilização indevida desses fármacos potencializa a ocorrência de bactérias resistentes, pois estes causam pressão seletiva na microbiota do organismo e conseqüentemente dificulta o tratamento de infecções (SANTOS, 2004).

Os inúmeros relatos de isolamento de bactérias multirresistentes em hospitais e o crescente número de pacientes vítimas de infecções sem tratamento eficaz apontam a resistência microbiana como um dos maiores problemas de saúde pública atual (O'NEIL, 2016).

O impacto econômico causado por infecções bacterianas chega a cerca de € 24 bilhões anuais gastos em hospitais da Europa e US\$ 33 bilhões ao ano nos Estados Unidos (IDSA, 2011; OECD, 2019). Esses valores se elevam ainda mais quando se leva em conta o tempo de internação prolongado, devido à dificuldade em se tratar as infecções por conta da resistência do agente causal (LARA, 2017). No Brasil, o tempo médio de internação de um paciente com infecção hospitalar é de 17 a 18 dias, os custos anuais com antimicrobianos é de US\$ 33 bilhões (AGUIAR, 2002).

Blair (2015) cita que a resistência aos antimicrobianos é norteadada por genes, no entanto as cepas resistentes não estão restritas a ambientes hospitalares (CAUMO, 2010). Tendo em vista outras aplicações dos antimicrobianos, os microrganismos resistentes podem ganhar mobilidade pelo contato entre pessoas, fômites, alimentos, produtos agropecuários, efluentes domésticos, industriais e agroindustriais. A produção animal vem contribuindo diretamente para o aparecimento de microrganismos resistentes, tanto pela utilização dos antimicrobianos quanto pela liberação de resíduos no ambiente e nos produtos derivados (MARTIN, 2011).

As características de resistência microbiana são mediadas por genes adquiridos por meio de mutações ou por processos de transferência de material genético, entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes (FROST et al., 2005). Esses mecanismos podem ser classificados em três grupos: inativação enzimática, alteração do sítio de ação do antimicrobiano e alteração do transporte da droga através de bombas de efluxo. Há ainda, um mecanismo caso específico de resistência às sulfonamidas e trimetropim, relacionado à capacidade da célula bacteriana de evitar a rota metabólica inibida por estes fármacos (SOUSA et al., 2004).

As enzimas  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) constituem um grupo heterogêneo de enzimas capazes de inativar as penicilinas, cefalosporinas e, por vezes, os monobactâmicos, conferindo resistência aos microrganismos. Estas enzimas são frequentemente produzidas por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e atuam lisando o anel  $\beta$ -lactâmico por hidroxilação irreversível da ligação amida (OLIVEIRA et al., 2009).

Uma característica fenotípica importante dessas enzimas é a sensibilidade à ação de inibidores enzimáticos como, sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam. Na maioria dos casos essas enzimas são codificadas por genes localizados em plasmídeos, que carregam também genes de resistência a outros antimicrobianos, tais como aminoglicosídeos, trimetropim, sulfonamidas, tetraciclinas e cloranfenicol. Por isso cepas produtoras de ESBL geralmente são multirresistentes (SOUSA et al. 2004).

As ESBLs são comumente isoladas em algumas espécies de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Essas enzimas são mediadas por elementos móveis, portanto, possuem facilidade em se disseminar para outras enterobactérias como, por exemplo, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. e outras (THOMSON et al., 2002).

A bactéria *Escherichia coli* pertence ao grupo dos coliformes termotolerantes, sendo a principal causadora de doenças diarreicas via ingestão de água e alimentos

contaminados. As bactérias deste grupo colonizam o trato intestinal do homem e de outros animais, no entanto, cepas de *E. coli* são comumente isoladas de alimentos, permitindo-se suspeitar do contato destes com material contaminado por fezes em alguma etapa da sua produção e manipulação (SANTIAGO et al., 2013).

Inúmeros estudos reportam a resistência de *E.coli* para os grupos de antimicrobianos mais utilizados em casos de infecções graves, como quinolonas, carbapenêmicos e  $\beta$ -lactâmicos, restringindo cada vez mais as opções de tratamentos nestes casos (DINIZ; SANTOS, 2017; ESTRADA et al., 2016; FERREIRA et al., 2017; GUERRA et al., 2018).

As condições de conservação dos alimentos é um fator importante quando se trata de segurança alimentar, pois o método utilizado irá influenciar na qualidade do alimento e no processo de deterioração como, por exemplo, em pescados que necessitam ser mantidos em condições ideais de refrigeração, a fim de retardar o crescimento de microrganismos (SOARES et al., 2005).

O pescado acondicionado de forma incorreta propicia a formação de histaminas pela ação de bactérias presentes no alimento, estes microrganismos produzem a enzima histidina-descarboxilase que converte o aminoácido livre L-histidina em histamina (CARMO et al., 2010). *Escherichia coli* é uma das bactérias da família Enterobacteriaceae, comumente associada à produção da histamina (OLIVEIRA et al., 2004).

A histamina é um alergênico que intoxica o ser humano e em casos extremos pode levar a morte. Os sintomas da intoxicação podem se manifestar como diarreia, enrubescimento, sensação de calor, brotoejas, palpitação e dor contínua (CERIO; BORQUE; GARCÍA, 2016). A molécula é parcialmente inativa após 3 horas de aquecimento a 102° C, podendo assim, estar presente no pescado em qualquer uma das fases de produção ou até mesmo após o cozimento (IENISTEA, 1973).

Segundo o Ministério da Saúde, no Brasil as doenças transmitidas por alimentos são causadas, em sua maioria, por bactérias. Dentre essas doenças se destacam os casos de diarreias agudas, que chegaram a cerca de 5.000.000 de

casos no ano de 2018. *Escherichia coli* é um dos agentes etiológicos responsáveis por causar boa parte desses quadros de intoxicação alimentar (SANTIAGO et al., 2013).

Alguns sorotipos patogênicos de *Escherichia coli* produzem toxinas do tipo Shiga que causam desde quadros leves de diarreias até casos graves de diarreia sanguinolenta (MORA et al., 2005). As cepas podem ser diferenciadas quanto a seus fatores de virulência como fimbrias, adesinas e toxinas (NATARO; KAPER, 1998). Os microrganismos produtores de toxinas e que carregam genes de resistência são ainda mais perigosos à saúde humana e animal, devido à ineficácia dos fármacos.

Uma via de desenvolvimentos de novas tecnologias para obtenção de antibióticos é a bioprospecção de extratos vegetais, que visa obter compostos ativos presentes nos seus órgãos como: folhas, flores, cascas e frutos, concentrando esses compostos com possibilidade de uso para fins terapêuticos e industriais (MARQUES, 2005). Os compostos encontrados nestes extratos com funções farmacológicas, geralmente, são terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2003).

Esses compostos são produtos do metabolismo secundário dos vegetais, e desempenham funções adaptativas ao ambiente (HARBORNE, 1993). Uma das principais funções dessas moléculas é proteger a planta contra a infecção por patógenos, exercendo atividade biológica contra bactérias, fungos e vírus. Desta forma, estes compostos são alvos de estudos da indústria farmacêutica, utilizando-os como base para o desenvolvimento de fármacos (FUMAGALI, 2008).

As plantas são utilizadas para fins medicinais desde os primórdios da civilização humana por comunidades tradicionais. Estas plantas são nativas ou cultivadas nos domicílios para serem usadas em forma de chás, banhos e compressas devido à presença de substâncias biologicamente ativas, com potencial anti-inflamatório, sedativo, antimicrobiano e antioxidante (DUARTE, 2006; RAUT; KARUPPYAIL 2014).

Popularmente conhecida como aroeira, *Schinus terebinthifolius*, é uma planta medicinal que ocorre principalmente na América do Sul (GILBERT; FAVORETO, 2011). Pertencente à família Anacardiaceae é caracterizada por apresentar folhas compostas, imparipinadas, inflorescência em panículas com flores amarelas ou pálidas e os frutos globulosos e vermelhos que constituem uma característica marcante da espécie (GRANDI, 2014; LORENZI; MATOS, 2002). A atividade antibacteriana da espécie foi relatada para compostos presentes em suas folhas, cascas do caule, frutos e óleos essenciais (CARVALHO et al., 2003; DEGÁSPARI et al., 2005; ULIANA et al., 2016).

O mastruz, *Dysphania ambrosioides*, pertence à família Chenopodiaceae e encontra-se distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A planta possui folhas lanceoladas com borda dorsal serrilhada, inflorescência em glomérulos com flores pequenas e verdes. Sua aplicação na medicina popular é devido a sua atividade anti-helmíntica e antimicrobiana (ANJARWALLA, 2013; LORENZI; MATOS, 2002).

Diante deste cenário de resistência microbiana, há necessidade de produzir mais conhecimento sobre a ação antibacteriana de extratos vegetais, dos mecanismos de resistência desenvolvidos por estes microrganismos, a fim de desenvolver novas tecnologias para evitar a resistência bacteriana.

No presente estudo se propõe avaliar a susceptibilidade de cepas de *Escherichia coli* isoladas de corvinas (*Micropogonias furnieri*) comercializadas em feiras-livre de cidades do Recôncavo Baiano, frente a fármacos comerciais, utilizados na terapia antibacteriana, e extratos etanólicos de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e mastruz (*Dysphania ambrosioides*), a fim de determinar a atividade antimicrobiana dos extratos preparados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

Verificar a susceptibilidade das cepas de *Escherichia coli* frente a antimicrobianos comerciais, antimicrobianos de origem natural e investigar os possíveis mecanismos de resistência utilizados por estas bactérias.

### 2.2 Específicos:

- Analisar a resistência das bactérias frente a antimicrobianos comerciais;
- Identificar enzimas  $\beta$ -lactamases nas amostras;
- Identificar enzimas  $\beta$ -lactamases cromossomais induzidas, as ESBLs (AmpC);
- Coletar as amostras de aroeira e mastruz para elaboração dos extratos;
- Preparar os extratos etanólicos de aroeira e mastruz;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos utilizando cepas de *E. coli* isolada de corvina (*Micropogonias furnieri*).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Coleta do material biológico

O material vegetal para elaboração dos extratos de mastruz, *D. ambrosioides*, e aroeira, *S. terebinthifolius*, foram coletadas em domicílios e no Campus da UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA (UFRB), no município de Cruz das Almas, Bahia. As coletas foram realizadas sempre no período da manhã, em dias secos e sem chuva, o material foi embalado em folhas de jornal e encaminhado para o Laboratório de Biotecnologia Microbiana – LABIOM da UFRB, onde foram montadas exsicatas das duas espécies vegetais coletadas, identificadas com auxílio do botânico Grênivel Mota da Costa e armazenadas no Herbário do Recôncavo da Bahia, sob os números 22123 (*S. terebinthifolius*) e 22124 (*D. ambrosioides*).

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* do banco de cepas do Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da UFRB, isoladas de corvina (*Micropogonias furnieri*), comercializadas em feiras livres dos municípios de Cruz das Almas, Muritiba, Maragogipe, Cachoeira e Santo Amaro da Purificação, Bahia. Após o isolamento e identificação bioquímica das cepas, estas foram preservadas em meio Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI - KASVI) suplementado com glicerol e acondicionadas em freezer a -16° C.

Antes dos testes com os antimicrobianos comerciais e naturais, as cepas do meio estoque foram repicadas para o meio de cultura BHI, a fim de reativar as células. Após o crescimento no BHI, uma alíquota da cultura foi repicada para o meio seletivo e diferencial Eosina Azul de Metileno Blue Agar (EMB - KASVI).

#### 3.2. Obtenção dos extratos

##### 3.2.1. Preparo do material vegetal e elaboração dos extratos

As folhas de mastruz e as cascas da aroeira foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 45 °C, por um período de 7 dias (DUTRA et al., 2016;

TRENTIN et al., 2011). Em seguida, 50 g do material vegetal foram embebidos nos solventes etanólicos nas concentrações de 37% (bebida alcoólica comercial), 54% (álcool etílico de uso doméstico) e 70% (álcool etílico utilizado em práticas microbiológicas). Os extratos foram produzidos em dois tratamentos para cada espécie estudada, em um tratamento os extratos permaneceram em repouso durante o processo de maceração (T1), e outro tratamento em que os extratos foram submetidos à agitação em incubadora shaker (SOLAB) na fase de maceração, em temperatura ambiente e a 120 RPM (T2). O processo de maceração durou um período de dez dias, posteriormente, os extratos foram evaporados sob pressão reduzida com o auxílio de um rotaevaporador.

### 3.2.2. Rendimento do extrato total

Para determinar o rendimento dos extratos, o valor total de cada extrato obtido foi calculado utilizando a fórmula aplicada por Pansera e colaboradores (2003):

$$\text{TEA (\%)} = M_f / M_i \times 100$$

Sendo TEA = teor de extrato total (%);  $M_i$  = massa inicial da amostra (g);  $M_f$  = massa final do extrato seco (g).

### 3.2.3. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada utilizando o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), foi utilizada a metodologia adaptada de Hatano et al., (1988). As concentrações dos extratos foram preparadas a partir da solução estoque utilizando a fórmula ( $C_1V_1=C_2V_2$ ), resultando em um volume de 1 ml com concentração de 100 mg/ml. O solvente e a solução de DPPH foram utilizados concomitantemente para confecção do branco. Para determinação do potencial antioxidante foram adicionados 300  $\mu$ l da diluição do extrato a 2,7 ml de DPPH em



triplicata. A leitura no espectrofotômetro foi realizada no comprimento de onda de 517nm.

A equação para análise da atividade antioxidante total (SINGH et al., 2002):

$$\%AA = (ABS_{amostra} - ABS_{branco}) \times 100 / ABS_{branco}.$$

### 3.3. Teste de sensibilidade a antimicrobianos

#### 3.3.1. Antimicrobianos comerciais e naturais

A suscetibilidade aos antimicrobianos comerciais foi avaliada pelo método descrito por Bauer e Kirby (1976), padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). O inóculo foi preparado em Solução Salina 0,85% a fim de obter uma turbidez correspondente ao nº 1 da escala de McFarland ( $3,8 \times 10^8$  microrganismos por mililitro). A turbidez do inóculo foi ajustada por espectrofotometria em comprimento de onda de 620 nm.

As placas de Petri foram confeccionadas com Ágar Mueller-Hinton (ACUMEDIA) e semeadas com o auxílio de um *swab* estéril umedecido com a cultura. O procedimento foi repetido três vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Após a semeadura, os discos foram aplicados com o auxílio de uma pinça estéril e pressionados na superfície do ágar para a completa aderência do disco ao meio de cultura. Os discos de antimicrobianos utilizados foram Ampicilina (10µg), Ceftriaxona (30µg), Cefotaxima (30µg), Amicacina (20µg), Sulfametoxazol + Trimetopim (30µg), Tetraciclina (30µg). Após adição dos discos, as placas foram incubadas a  $37 \pm 2$  °C por 18-24 horas, sendo realizada a medição dos tamanhos dos halos de inibição quando presentes.

Para verificar a susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos naturais seguiu-se o procedimento semelhante ao supracitado com algumas modificações.

Os discos foram confeccionados a partir de papel filtro, tendo diâmetro de 6 mm, em seguida foram esterilizados. Para solubilizar os extratos foram utilizados dois solventes, o Dimetilsulfóxido (DMSO) e a Solução salina, após a solubilização os discos foram impregnados com 15 µl dos extratos.

Os discos impregnados com os extratos etanólicos foram aplicados com o auxílio de uma pinça estéril e pressionados na superfície do ágar para a completa aderência do disco ao meio de cultura. Os discos foram dispostos nas placas em pontos equidistantes e as placas incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 18-24 horas. Nos testes foram utilizadas cepas padrões de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além de controle positivo e negativo dos extratos e dos solubilizantes utilizados.

#### 3.3.1.1. Método sinérgico do duplo disco

Conforme metodologia proposta por Dalmarco et al. (2006), foi realizado o teste fenotípico confirmatório para presença da enzima  $\beta$ -lactamase, conhecido como “*Double-Disc Synergism*”.

Para o teste foi utilizado o meio de cultura Ágar Mueller-Hinton (ACUMEDIA), os inóculos foram ajustados para a escala 0.5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  células/ml). No centro da placa foi adicionado um disco de Amoxicilina (30µg) e Ácido Clavulânico (30µg), e ao redor deste os antimicrobianos marcadores: Cefoxitina (30µg), Aztreonam (30µg), Ceftazidima (30µg) e Cefotaxima (30µg), na distância de 30 mm de centro a centro, em relação ao disco central. Após incubação de 33-35°C por 20-24 horas, foi realizada a medição e avaliada a deformação dos halos (NCCLS, 2004).

#### 3.3.1.2. Teste de susceptibilidade a cefoxitina

As amostras que foram negativas no teste do duplo disco tiveram sua capacidade de produzir ESBLs Cromossomais induzidas por Cefoxitina (30µg). Foi adicionado um disco de Cefoxitina (30µg), próximo a um disco de Aztreonam (30µg) (podendo este ser substituído por outro beta-lactâmico) com distância de 15 mm de centro a centro (DALMARCO et al., 2006).

### 3.4. Análise dos dados

Os resultados foram analisados e expressos em médias e percentuais utilizando o programa Excel do sistema operacional Windows.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Extratos etanólicos

#### 4.1.1. Triagem fitoquímica

Após a elaboração dos extratos, estes foram pesados a fim de calcular o seu rendimento, conforme descrito na Tabela 1. Ao analisar os valores de rendimento dos extratos da aroeira preparados em repouso, o álcool a 70% foi o melhor para a extração dos compostos, com rendimento cerca de 27% maior do que a extração com o álcool a 39% e 63,5% maior que com o álcool a 54%.

Para as folhas do mastruz, o rendimento foi o mesmo tanto para os extratos com álcool a 54 quanto 70%. O álcool a 39% foi o menos eficiente, com rendimento duas vezes menor.

**Tabela 1. Rendimento dos extratos etanólicos preparados em repouso**

<b>Tratamento</b>	<b>Aroeira</b>	<b>Mastruz</b>
<b>Álcool 39%</b>	24,4%	4,6%
<b>Álcool 54%</b>	12,2%	10,2%
<b>Álcool 70%</b>	33,4%	10,1%

O rendimento dos extratos pode variar conforme época de colheita, clima, características do solo, tempo e temperatura de secagem do material. Os fatores abióticos podem acarretar alterações no teor e composição química dos metabólitos

secundários das plantas, além disso, a parte da planta utilizada também influencia no rendimento (CECHINEL, 1998).

**Tabela 2. Rendimento dos extratos etanólicos preparados sob agitação**

<b>Tratamento</b>	<b>Aroeira</b>	<b>Mastruz</b>
<b>Álcool 39%</b>	63,8	46,8
<b>Álcool 54%</b>	61,6	42,8
<b>Álcool 70%</b>	43,7	37,9

Entre os extratos produzidos sob agitação, os que apresentaram maior rendimento foram os preparados utilizando o álcool a 39% (Tabela 2), tanto para a aroeira quanto para o mastruz. Estes extratos apresentaram valores mais altos do que aqueles preparados em repouso, o que pode ser associado ao aumento do contato entre o solvente e o material vegetal proporcionado pela agitação.

Boros (2007) analisou o rendimento dos extratos metanólicos e hexânicos das folhas de aroeira, o metanol obteve maior rendimento (16,20%) que o hexano (2,28%). Segundo Hayouni e colaboradores (2007), solventes com diferentes polaridades consequentemente extraem compostos diferentes, devido à polaridade destes compostos, o que influencia na composição e concentração das moléculas presentes nos extratos.

Ao analisar o extrato etanólico (70%) do mastruz, Valério (2014) obteve 6,43% de rendimento, valor menor que o encontrado no presente estudo utilizando essa planta e o solvente na mesma concentração, isso mostra que assim como o solvente, a metodologia aplicada também influencia no rendimento, o que pode explicar a diferença entre os valores de rendimento (MONTELONGO, 2010).

O extrato etanólico de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-preta) produzido por Silveira (2015) apresentou 5,6% de rendimento, e as suas frações metanólica e de acetato de etila obtiveram 33,8% e 15,9% respectivamente, mostrando que esses solventes podem ter maior eficácia. No entanto, o ótimo rendimento de extratos etanólicos é reportado por alguns autores (CUNHA et al., 2004; JAHALA;

ELMEHINA, 2016; SANTOS, 2018), assim como o que foi encontrado no presente trabalho.

#### 4.1.2. Atividade antioxidante (DPPH)

Os extratos das folhas de mastruz apresentaram capacidade redutora de radicais livres no teste do DPPH, que expressa a concentração mínima necessária para reduzir 50% dos radicais livres (Tabela 3). No Tratamento 1 (T1), o extrato preparado com a maior concentração do etanol (70%) apresentou maior potencial redutor, este fato pode ser explicado devido à obtenção em maior quantidade de compostos fenólicos com o extrator nessa concentração (BURATTO et al., 2011).

No Tratamento 2 (T2), para o extrato com álcool a 70% foi obtido um  $EC_{50}$  em uma concentração maior que no T1, contudo, os extratos com álcool a 39% e 54% deste tratamento apresentaram  $EC_{50}$  em concentrações menores, mostrando que o emprego da agitação, possivelmente, potencializou a extração dos compostos ativos, demonstrando ser o método mais eficaz para confecção dos extratos (ROSTAGNO et al., 2003).

**Tabela 3. Valores de  $EC_{50}$  dos extratos do Mastruz no teste de DPPH**

<b>Concentração do solvente</b>	<b>T1 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>T2 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
39%	15800	7740
54%	9620	3630
70%	1920	4370

T1 – Tratamento sem agitação, T2 Tratamento com agitação.

Nos estudos de Mothana e colaboradores (2009), o  $EC_{50}$  do extrato metanólico (absoluto) do mastruz foi de, aproximadamente, 500  $\mu\text{g/ml}$ . Este extrato metanólico apresentou uma capacidade redutora maior que a encontrada no

presente estudo, justificada, possivelmente, pelo solvente utilizado e a constituição dos metabólitos de presente no extrato produzido.

Em alguns casos o material vegetal utilizado não demonstra potencial redutor substancial. Abouzid e colaboradores (2008) citam que o extrato metanólico (80%) do mastruz atingiu apenas 20% de sequestro de radicais, e este resultado foi considerado insignificante pelos autores, tendo em vista que a porcentagem buscada no teste é de 50% de inibição dos radicais livres.

As flutuações nos valores de  $EC_{50}$  nos trabalhos podem ser atribuídas à composição dos compostos secundários da planta, pois estes podem variar conforme características ambientais (GOBBO; LOPES, 2007).

Os extratos da aroeira mostraram alto potencial em sequestrar os radicais livres, uma vez que, os valores de  $EC_{50}$  foram observados em concentrações muito baixas, denotando que o material vegetal em pequenas quantidades é capaz de atingir o potencial redutor esperado (Tabela 4). Segundo Rocha et al. (2019), os extratos da aroeira são constituídos em sua maioria por compostos fenólicos, a ação antioxidante dos extratos é atribuída a essas moléculas.

**Tabela 4. Valores de  $EC_{50}$  dos extratos da Aroeira no teste de DPPH**

<b>Concentração do solvente</b>	<b>T1 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>T2 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
39%	160	-
54%	60	100
70%	60	100

T1 – Tratamento sem agitação, T2 Tratamento com agitação.

No T1 os valores de  $EC_{50}$  foram iguais para os extratos nas concentrações de 54 e 70%, alcançando 50% de inibição com 60  $\mu\text{g/ml}$  dos extratos. O mesmo aconteceu para essas concentrações no T2, que atingiram o  $EC_{50}$  no valor de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Para esta planta a agitação não influenciou positivamente no processo de extração dos compostos com atividade antioxidante, pois houve um acréscimo no  $EC_{50}$  das amostras neste tratamento.

Na concentração de 39% do T1, o EC<sub>50</sub> foi encontrado no valor de 160 µg/ml, no tratamento 2 essa mesma concentração não teve resposta satisfatória no teste, pois, o extrato não solubilizou no metanol, o que pode ter ocorrido devido ao fato de que a polaridade dos compostos extraídos neste tratamento seja diferente da polaridade do reagente utilizado no teste. O solvente mais empregado na obtenção de extratos vegetais é o metanol, devido à sua polaridade, que possibilita a extração de uma grande variedade de compostos polares, principalmente os polifenóis (CECHINEL, 1998).

Entretanto, o metanol apresenta alta toxicidade para humanos, animais e ambiente, sua ingestão em pequenas quantidades pode causar cegueira ou morte (OOM et al., 2002). O etanol não é tóxico, apresentando risco apenas quando ingerido em grandes quantidades, e apresenta desempenho similar ao do metanol quando utilizado como solvente para extração desses compostos (BARBOSA et al., 2016).

## 4.2. Atividade antimicrobiana

### 4.2.1. Antimicrobianos comerciais

Das dezessete cepas de *E. coli* isoladas e analisadas no antibiograma foi observado que todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano β-lactâmico. Isto demonstra que as cepas possuem um mecanismo de resistência as drogas dessa classe.

As cepas apresentaram taxas consideráveis de resistência aos β-lactâmicos testados: Cefotaxima (64,7%) e Ampicilina (52,9%), e resistência intermediária para Ceftriaxona (47%) indicando que este não é tão eficaz em inibir o crescimento bacteriano. Entre os demais fármacos testados o que mais se mostrou eficiente na ação antimicrobiana foi o Sulfametoxazol + Trimetopim, uma sulfa, para o qual 58,8% das cepas se mostraram sensíveis (Tabela 5).

**Tabela 5. Comportamento das cepas no antibiograma frente aos antimicrobianos**

Antibióticos	Nº (%) Resistentes	Nº (%) Intermediários	Nº (%) Sensíveis
<b>CRO</b>	2 (11,7%)	8 (47,0%)	7 (41,1%)
<b>CTX</b>	11 (64,7%)	5 (29,4%)	1 (5,88%)
<b>AMP</b>	9 (52,9%)	3 (17,6%)	5 (29,4%)
<b>AKN</b>	10 (58,8%)	3 (17,6%)	4 (23,5%)
<b>SXT</b>	5 (29,4%)	2 (11,7%)	10 (58,8%)
<b>TET</b>	7 (41,1%)	3 (17,6%)	7 (41,1%)

CRO=Ceftriaxona; CTX=Cefotaxima; AMP=Ampicilina; AKN=Amicacina; SXT= Sulfametoxazol + Trimetopim; TET=Tetraciclina.

Almeida et al. (2017), analisaram enterobactérias isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e peixes (*Oreochromis niloticus*) obtidos na feira livre da cidade de Sobral, Ceará, Brasil. Foi observado que todos os 103 isolados foram resistentes a Penicilina e mais de 50% destes foram resistentes à Ampicilina e Cefalotina. No presente trabalho também foi verificada resistência acima de 50% para Ampicilina e as Cefalosporinas, Ceftriaxona e Cefotaxima (terceira geração), corroborando com o estudo supracitado.

Elhadi e Alsamman (2015) ao analisarem o perfil de susceptibilidade de cepas de *E. coli* isoladas de pescado, encontraram altas porcentagens de resistência para os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos como a Ceftriaxona (93,3%), Cefotaxima (93,3), Ampicilina (100%), confirmando o que foi encontrado no presente estudo. Percebe-se que os microrganismos que possuem essa característica estão amplamente disseminados nos alimentos e que o risco de contrai-los durante o consumo é iminente.

A multirresistência dos isolados de *E. coli* para os grupos de antimicrobianos mais utilizados pela medicina é um fator preocupante, pois as opções de tratamento se tornam limitadas. Alguns trabalhos expõem valores altos de resistência de microrganismos isolados de pescados aos grupos de antimicrobianos que até então eram os mais eficazes (MACHADO et al., 2015; AMARANTE et al., 2018).



#### 4.2.1.1. Teste de sinergismo com os antimicrobianos comerciais

Ao testar os 17 isolados de *E. coli* no teste do duplo disco, 11 (64,7%) amostras foram positivas, o que foi possível determinar pelo aumento da zona de inibição dos antibióticos em sinergismo da Amoxicilina combinada com o inibidor enzimático Ácido clavulânico.

Em seis amostras (35,2%) não ocorreu aumento dos halos no teste do duplo disco ou apresentaram resistência a Amoxicilina + Ácido Clavulânico, indicando que não ocorreu sinergismo entre os fármacos testados, e estas foram classificadas como negativas para a produção da enzima. Nestas cepas deve haver outros mecanismos de resistência, como por exemplo, bomba de efluxo ou alteração na permeabilidade da membrana (SOUSA et al. 2004).

Ngueyn et al. (2016), ao analisarem 164 amostras de peixes em abatedouros do sistema de distribuição de alimentos na cidade de Ho Chi Minh City, Vietnam, encontraram cepas de *E. coli* produtoras de ESBLs em 48 amostras (29,2%). Isso Corrobora com o que foi encontrado na presente pesquisa, e mostrando que a pressão seletiva nestes microrganismos ocorre por toda a parte do mundo. O que é alarmante uma vez que os peixes fazem parte da dieta da população mundial, aumentando assim a chance de se proliferação destes microrganismos.

Cepas de *E. coli* (4/26, 15,4%) produtoras de ESBL foram isoladas do intestino de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) por Moremi et al. (2016), oriundos do Lago Victoria em Mwanza, Tanzânia. Esses isolados apresentaram alta taxa de resistência no antibiograma para Co-trimoxazole 19 (73,1%), Ciprofloxacina 19 (73,1%), Gentamicina 19 (73,1%) e Tetraciclina 16 (61,5%), pode-se observar que os microrganismos produtores de ESBL geralmente são multirresistentes, apresentando resistência a inúmeros antimicrobianos.

Singh et al. (2017), a partir de frutos do mar frescos vendidos em feiras de Mumbai, Índia. Isolaram 66 cepas de *E. coli*, destas 53 reagiram positivas no teste de sinergismo para detecção de ESBL, reportando alta incidência de microrganismos produtores de  $\beta$ -lactamases e consequente múltipla resistência a diversos antimicrobianos desta classe no antibiograma.

Freitas et al. (2006) encontraram 6,8% de estirpes de *E. coli* produtoras de ESBL em uma pesquisa feita no Hospital S. Teotónio, Viseu, Portugal. A partir de amostras de uroculturas de 131 pacientes, mostrando que esta bactéria está

disseminada tanto em animais, quanto em humanos. Trabalhos como este relatam que está bactéria produtora de ESBL é muito comum em ambientes hospitalares.

#### 4.2.1.2. Produção de AmpC cromossomal

Os isolados que foram negativos no teste do duplo disco, foram testados para a produção de AmpC cromossomal. Neste teste apenas duas amostras apresentaram diminuição do halo de inibição, indicando que a Cefoxitina foi capaz em induzir a produção de enzima nas cepas, que hidrolisaram o anel  $\beta$ -lactâmico do Aztreonam.

As ESBLs do tipo AmpC são enzimas que não são inibidas por inibidores enzimáticos (Ácido Clavulânico, Sulbactam e Tazobactam) e assim podem acabar mascarando o resultado do teste para detecção de  $\beta$ -lactamases, apresentando resultando negativo. Estas enzimas podem ser cromossômicas ou plasmidiais (Brandão et al, 2013).

A confirmação da presença dessas enzimas tem grande importância epidemiológica e clínica, pois atribuem às bactérias a capacidade de hidrolisar a maioria dos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, como as cefalosporinas, penicilinas, cefamicinas e as combinações com inibidores de  $\beta$ -lactamases, diminuindo as opções para o tratamento de infecções causadas por estas bactérias (THOMSON et al., 2002).

#### 4.2.2. Antimicrobianos naturais

Os extratos foram testados frente aos isolados de *E. coli* e cepas padrão, conforme APÊNDICE C. Os extratos inibiram o crescimento da cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, em ambos os tratamentos em que se utilizou solução salina e DMSO como solubilizantes. Apesar de Sturion e colaboradores (1999) reportarem a atividade antimicrobiana do DMSO em concentrações de 5 a 50%, no controle com os discos contendo apenas o solubilizante, não foi observado a inibição do crescimento das cepas padrão.

As bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* são mais suscetíveis à ação de certos antimicrobianos que as bactérias Gram-negativas, pois

as gram-negativas possuem uma estrutura de parede celular mais complexa, o que dificulta a ação de antimicrobianos (BURT, 2004). Fato evidenciado com a cepa padrão *Escherichia coli* CDC EDL 933 utilizado neste estudo.

Os extratos etanólicos da aroeira não apresentaram atividade antibacteriana significativa frente aos isolados de *E. coli*, em nenhum dos tratamentos testados. Entretanto, no tratamento em que foi utilizado DMSO como solubilizante, observaram-se pequenos halos, mas com crescimento muito próximo aos discos, o que não foi considerado como inibição.

Provavelmente, o composto que possibilitou a formação dos halos estava em baixa concentração nos extratos, o que não propiciou um efeito de inibição significativo. A atividade antimicrobiana da aroeira é atribuída a compostos fenólicos como, ácido caféico, ácido sirínico, ácido p-cumárico, ácido elágico, ácido gálico, além de flavonoides, presentes em extratos etanólicos da planta (ULIANA et al., 2016).

Os extratos do mastruz apresentaram um resultado mais promissor quando solubilizados em DMSO. O extrato obtido com álcool a 39% sem agitação apresentou halos com 1,5 mm de diâmetro para mais de uma cepa, o tratamento com o álcool a 70% obteve halo de 2,2 mm para uma cepa. No tratamento em que foi utilizada a solução salina como solubilizante os halos formados foram menores que 1 mm, se mostrando, neste caso, um veículo menos eficaz que o DMSO.

Segundo Ronen e Galun (1984) citam que as características químicas do DMSO conseguem penetrar facilmente em membranas semipermeáveis e carrear junto com ele outras moléculas como, por exemplo, proteínas. Por ser uma molécula anfipática solubiliza-se tanto em meio aquoso e orgânico, o que provavelmente influenciou no desempenho do extrato nos tratamentos em que foi utilizado.

Supõe-se que os compostos que causaram inibição estavam em baixas concentrações, o que explica a pouca atividade antibacteriana notada. Isto pode ter ocorrido devido a essas moléculas não terem a mesma polaridade do extrator utilizado, e terem sido extraídas em pouca quantidade, ou ainda, a planta pode produzir o referido composto ativo em baixa concentração (CECHINEL, 1998).

A aroeira apresentou atividade frente à cepa Gram-positiva padrão, quanto que o mastruz apresentou atividade contra alguns dos isolados Gram-negativos resistentes a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Contudo, o fato de algumas plantas não apresentarem atividade sobre uma bactéria em específico, não a desqualifica quanto

a seu potencial antimicrobiano ou bacteriostático frente a outras espécies ou grupos de microrganismos (SILVA et al., 2018).

Frações menos polares do extrato etanólico das cascas da aroeira inibiram o crescimento de cepas de *S. aureus*, mas não inibiu *E. coli* (LIMA et al., 2006). Soares e colaboradores (2007) citam a eficiente atividade do extrato etanólico de aroeira a 20% frente à bactéria gram-positiva *Streptococcus mutans*.

A presença e concentração de compostos com possíveis efeitos farmacológicos presentes em um extrato, pode variar de acordo com fatores como: a origem geográfica da planta, a época da coleta, a parte do vegetal utilizada e os fatores genéticos (FDIL et al., 2017). Desta forma, a mesma espécie vegetal que passou por diferentes avaliações de seu potencial antibacteriano, pode apresentar resultados diferentes.

Segundo Pereira et al., (2015), no mastruz são encontradas moléculas como as flavonas e taninos que garantem à espécie atividade antimicrobiana. Azevedo et al. (2011), encontraram ação antibacteriana moderada no extrato do mastruz no qual se utilizou álcool etílico como solvente, resultado semelhante ao presente trabalho, o que pode ser explicado devido ao etanol ter pouca afinidade com as moléculas da planta que possuem atividade antibacteriana, extraíndo esses compostos em baixas concentrações.

Os extratos da aroeira e do mastruz preparados por Souza et al. (2015), obtiveram resultados semelhantes ao do presente trabalho, uma vez que a aroeira foi capaz de inibir a *S. aureus* e não inibiu *E. coli*, enquanto que o mastruz inibiu o crescimento de *E. coli* e não apresentou efeito contra *S. aureus*. Neste caso não foi utilizado nenhum composto químico como solvente, os extratos foram obtidos com maceração mecânica.

## 5. CONCLUSÃO

Os isolados de *Escherichia coli* apresentaram resistência aos antimicrobianos comerciais, apresentando mecanismos como a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases. Os extratos etanólicos da aroeira e mastruz não foram eficazes em inibir o crescimento das cepas de *E. coli*.

## REFERÊNCIAS

- ABOUZID, S.; ELSHAHAAT, A.; ALI, S.; CHOUDHARY, M.I. Antioxidant activity of wild plants collected in Beni-Sueif governorate, Upper Egypt. Tokyo: **Drug Discoveries & Therapeutics**, Vol.2 (5), 286-288p, 2008.
- AGUIAR, L.; SILVA, G.; MACEDO, J. G.; CORRÊA, J.; MARTINI, N.; FERRARI, M. Infecções hospitalares e seus impactos financeiros. Santa Catarina: **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Vol.32 (1), 51p, 2002.
- ALMEIDA, M.V.A. et al. Drug resistance, AmpC- $\beta$ -lactamase and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from fish and shrimp. São Paulo: **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, V.59 (70), 1-7p, 2017.
- AMARANTE, J. F.; KOLLING, L.; FERRONATO, A. I.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M.; AMARANTE, T. A. B. Resistência aos antimicrobianos de bactérias obtidas de carpas (*Cyprinus carpio*) cultivadas em sistema semi-intensivo. Goiânia: **Ciência Animal Brasileira**, Vol.19, 1-7p, 2018.
- ANJARWALLA, P.; OFORI, D.A.; JAMNADASS, R.; STEVENSON, P.C.; SMITH, P. Pesticidal plant leaflet *Dysphania ambrosioides* L. Nairóbi: **World Agroforestry centre**, 1-2p, 2013.
- AZEVEDO, R. R. S.; ALMEIDA, V. G. A.; SILVA, E. M. F.; SILVA, A. L.; SILVA GOMES, N. R. S.; MATIAS, T. M. S.; SOUZA, L. I. O.; SANTOS, A. F. Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás. Maceió: **Revista Semente**, Vol.6 (6), 240-249p, 2011.
- BARBOSA, N. A.; PAES, M. C. D.; PEREIRA, J. Influencia da temperatura e do solvente na obtenção de extrato de milho de grãos pretos. In : Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Sete Lagoas: **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. Vol.31, 1841-1844p, 2016.
- BAUER, A.W., KIRBY W.M.M., SCHERRIS J.C. & TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Oxford: **American Journal of Clinical Pathology**, Vol.45, 493-496p, 1976.
- BLAIR, J.M.A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, A.J.; OGBOLU, D.O.; PIDDOCK, L.J.V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Reino Unido: **Nature Reviews Microbiology**, Vol.13, 42-51p, 2015.
- BOROS, L.F. **Ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folhas da *Schinus terebenthifolius* Raddi (AROEIRA)**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Curitiba: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 85p, 2007.

- BRANDÃO, C.S.C. **Evaluation of phenotypic methods to detect AmpC-producing Enterobacteriaceae, in Aveiro, Portugal.** (Publicação online no Euro. Soc. Clin. Micro. Infec. Disea.): [http://www.escmid.org/escmid\\_library/online\\_lecture\\_library/?search=1&current\\_page=1&search\\_term=&author%5B%5D=7054&entrytype%5B%5D=19&entrytitle%5B%5D=6615](http://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1&current_page=1&search_term=&author%5B%5D=7054&entrytype%5B%5D=19&entrytitle%5B%5D=6615)), 2013.
- BRASIL. MINISTERIO DA SAÚDE. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção.** Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>>
- BURATTO, A.P.; CARPES, S.T.; VECCHIA, P.D.; LOSS, E.M.S.; APPELT, P. Determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana em castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*). Campo Mourão – PR: **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Vol.2 (01), 60-65p, 2011.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Amsterdã, **International Journal of Food Microbiology**, Vol.94, 223– 253p, 2004.
- CARMO, F. B.T.; MÁRSICO, E. T.; SÃO CLEMENTE, S. C.; CARMO, R. P.; FREITAS, M. Q. Histamina em conservas de sardinha. Goiânia: **Ciência Animal Brasileira**, Vol.11 (01), 174-180p, 2010.
- CARVALHO, M. C. R. D.; BARCA, F. N. T. V.; LIMA, L. F. A.; MEDEIROS, S. R. B. Evaluation of mutagenic activity in na extract of pepper tree stem bark (*schinus terebinthifolius* Raddi). Texas: **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Vol.42, 185-191p, 2003.
- CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B.; TASCIA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. Nova Hamburgo: **Revista Liberato**, Vol.11 (16), 183-190p, 2010.
- CECHINEL, V. F. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. São Paulo: **Química Nova**, Vol.21, 99-105p, 1998.
- CERIO, O. G. D.; BORQUE, A. B.; GARCÍA, J. G. Escorbroidosis: abordaje práctico. Espanha: **Actas Dermo-sifiliograficas**, Vol.107, 567-571p, 2016.
- CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, F.M.; SHIMIZU, M.T.; MARCUCCI, M.C.; DREZZA, F.T.; POVIA, G.S.; CARVALHO, P.O. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. Campinas: **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol.15 (06), 964-970p, 2004.

DALMARCO, E.M.; BLATT, S.L.; CÓRDOVA, C.M.M. Identificação laboratorial de  $\beta$ -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. Blumenau-SC: **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Vol. 38 (03): 171-177p, 2006.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.; PRADO, M. R. M. Atividade antimicrobiana de *Schinus terebenthifolius* Raddi. Lavras: **Ciência e Agrotecnologia**, Vol.29 (03), 617-622p, 2005.

DINIZ, A. M. M.; SANTOS, R. M. C. *Escherichia coli* resistente a ciprofloxacina em pacientes internados em hospital universitário de Manaus, 2015. Santa Cruz do Sul: **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Vol.7 (01), 2017.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Campinas - SP: **Multiciência**, Vol.7 (01), 1-16p, 2006.

DUTRA, F.S.G.; CARLOS, A.L.; MOTTA, O.V.; VIANNA, A.P.; PEREIRA, S.M.F. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente à Bactérias de importância médica. Campos dos Goytacazes: Perspectivas online - **Ciências biológicas e da saúde**, Vol.20 (06), 1-13p, 2016.

ELHADI, N.; ALSAMMAN, K. Incidence and antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from retail imported mackerel fish. Nigeria: **African Journal of Biotechnology**, Vol. 14(23), 1954-1960p, 2015.

ESTRADA, L. I. M.; ROSAS, M. R.; LÓPEZ, J. M.; ROJAS, I. P.; VILLALOBOS, E. G.; ALARCÓN, N. C. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógenos en las localidades de México. Espanha: **Infermedades infecciosas y microbiología clínica**, Vol.35, 426-433, 2016.

FDIL, R.; DERHALI, S.; EL MALIKI, S.; FILALI-ANSARI, N.; ZEFZOUFI, M.; EL ABOUYI, A.; EL KHYARI, S.; SRAIDI, K.; MOUZDAHIR, A. Comparative analysis, antibacterial and antiradical activities of essential oils in leaves and fruits of *Chenopodium ambrosioides* of Morocco. India: **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, Vol.8 (04), 1038-1045p, 2017.

FERREIRA, V. M.; ROSSITER, L. N. V.; ARAGÃO, N. F. F.; PINTO, O. A.; SANTOS, P. M.; CARDOSO, P. H. A.; CERQUEIRA, T. B.; FERNANDINO, D. M.; ROCHA, G. M. Infecções comunitárias do trato urinário em Divinópolis, MG: avaliação do perfil de resistência bacteriana e do manejo clínico. Rio de Janeiro: **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, Vol.12(39), 1-13p, 2017.

- FREITAS, F.; RIBEIRO, J. M.; QUEIRÓS, A. M.; SILVA, M. Isolados clínicos de *Escherichia coli* produtores de  $\beta$ -Lactamases de largo espectro. Viseu: **Bioanálise**, Vol.3 (01), 35p, 2006.
- FRIEDMAN, N.D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. Londres: **Clinical Microbiology and Infection**, Vol.22 (05), 416-422p, 2015.
- FROST, L.S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, O. A.; TOUSSAINT, A. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. Reino Unido: **Nature Reviews in Microbiology**, Vol.3, 722-732p, 2005.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. Curitiba: **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol.18 (04), 627-641p, 2008.
- GILBERT, B.; FAVORETO, R. *Schinus terebinthifolius* Raddi. Jacarepaguá: **Revista Fitos**, Vol.6 (01), 44p, 2011.
- GOBBO, L. N.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. São Paulo: **Química Nova**, Vol.30 (2), 374-381p, 2007.
- GRANDI, T.S.M. **Tratados das plantas medicinais mineiras, nativas e cultivadas**. Belo Horizonte: Adaequatio estúdio, 1.ed, 134p, 2014.
- GUERRA, G. J.; CAÑAS, V. H.; MOLINA, L. C. B.; PUERTO, A. S.; MARÍ, J. M. N.; FERNÁNDEZ, J. G. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasade espectro extendido en infecciones de vías urinarias: evolución de laresistencia antibiótica y opciones terapéuticas. Espanha: **Medicina Clínica**, Vol.150, 262-265p, 2018.
- HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**.4<sup>o</sup> ed. London: Academic Press, 318p, 1993.
- HATANO, T; KAGAWA, H.; YASUHARA, T.; OKUDA, T. Two new flavonoides and other constituents in licore root: their relative and astringency and scavenging effects. Japan: **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Vol.36, 2090-2097p, 1988.
- HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDI, M. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Amsterdã: **Food Chemistry**, Vol.105, 1126–1134p, 2007.
- IENISTEA, C. Significance and detection of histamine. Londres: **Academic Press**, 327-343p, 1973.



IDSA - INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Combating antimicrobial resistance: Policy recommendations to save lives. Oxford: **Clinical Infectious Diseases**, Vol.52(5), 397–428p, 2011.

JAHALA, O.A.M.; DARIEN OMER ELMEHINA, D.O. Determination of the yield of ethanolic, chloroformic extracts and saponins, flavonoids contents in *Fagonia cretica* Linn, India: **World Journal of Biology and Medical Sciences**, Vol.3(3), 1-4p, 2016.

LARA, F. L. O.; ANTUNES, A. V.; RODRIGUES, C. M.; FELICE, I. O. Custos da antibioticoterapia em pacientes adultos com infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva. Piauí: **Revista Prevenção de Infecção e saúde**, Vol.3(4), 14p, 2017.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; ANDRADE, M. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; GENET, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. Amsterdã: **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.105, 137–147p, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 512p, 2002.

MACHADO, A. L.; ARAÚJO, R. L.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, R. H. S. F. Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de pescado marinho comercializado na feira livre do Mucuripe - Fortaleza-CE, Brasil. São Paulo: **Boletim do Instituto de Pesca**, Vol.41 (04), 931 – 943p, 2015.

MARQUES, L.C. Preparação de extratos vegetais. [S.l.]: **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, Vol.3 (02), 74-76p, 2005.

MARTIN, J. G. P. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. Campinas: **Segurança Alimentar e Nutricional**, Vol.18 (2): 80-87p, 2011.

MORA, A.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, A.I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. Amsterdã: **Research in Microbiology**, Vol.156, 793–806p, 2005.

MOREMI, N.; MANDA, E.V.; FALGENHAUER, L.; GHOSH, H.; IMIRZALIOGLU, C.; MATEE, M.; CHAKRABORTY, T.; MSHANA, S.E. Predominance of CTX-M-15 among ESBL producers from environment and fish gut from the shores of lake Victoria in Mwanza, Tanzania: **Frontiers in Microbiology**, Vol.7, 1-11p, 2016.

MONTELONGO, R.G.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M. Antioxidant activity in banana peel extracts: Testing extraction conditions and related bioactive compounds. Amsterdã: **Food Chemistry**, Vol.119, 1030–1039p, 2010.

MOTHANA, R. A. A.; GRUENERT, R.; BEDNARSKI, P. J.; LINDEQUIST, U. Evaluation of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant activities of some Yemeni plants used in folk medicine. **Pharmazie**, Vol.64, 260–268p, 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. Minnessota: **Clinical Microbiology Reviews**, Vol.11, 142–201p, 1998.

NCCLS – **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Four. Inf. Supp. M100-S14, Wayne, Pa. NCCLS, 2004.

NGUEYN, D. P. et al. Dissemination of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam. **BioMed Research International**, Vol.2016, 1-9p, 2016.

OECD - ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÓMICO. **Antimicrobial Resistance. Tackling the Burden in the European Union**. Paris: 2019. Disponível em: <<https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Tackling-the-Burden-in-the-EU-OECD-ECDC-Briefing-Note-2019.pdf>>

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes. Ribeirão Preto: **Holos**, 64p, 2003.

OLIVEIRA, H.A.C.; SILVA, H.C.M.; SAMPAIO, A.H.; VIANNA, F.A.; SAMPAIO, S. Determinação de histamina por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em atum e sardinha enlatados. Fortaleza: **Revista Ciência Agronômica**, Vol.35, 179-188p, 2004.

OLIVEIRA, C.F. et al. Prevalence of the TEM, SHV and CTX-M families of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp at the University Hospital of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Vol.42 (5), 556-560, 2009.

O'NIELL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Londres: **Review on antimicrobial resistance**, Vol. 1, 1-2p, 2014.

OOM, P.; PEREIRA, P.; SANTOS, E.; CARVALHO, A.; CORREIA, M.; RODRIGUES, G.; SEQUEIRA, J. S. Intoxicação com metanol e carbamatos. Portugal: **Acta Medica Portuguesa**, Vol.15, 45-48p, 2002.

PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L.D.; PAULETTI, G.F.; SERAFINI, L.A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. Curitiba: **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol.13 (01), 17-22p, 2003.

PEREIRA, N. L. F.; AQUINO, P. E. A.; SILVA, M. R.; NASCIMENTO, E. M.; GRANGEIRO, A. R. S.; OLIVEIRA, C. D. M.; TINTINO, S. R.; FIGUEIREDO, F. G.;

VERAS, H. N. H.; MENEZES, I. R. A. Efeito antibacteriano e anti-inflamatório tópico do extrato metanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. Rio de Janeiro: **Revista Fitos**, Vol.9 (2), 73-159p, 2015.

RAUT, J.S; KARUPPAYIL, S.M.; A status review on the medicinal properties of essential oils. Amsterdã: **Industrial Crops and Products**, Vol.62, 250-264p, 2014.

ROCHA, P.S.; BOLETI, A.P.A.; VIEIRA, A.C.; CAROLLO, C.A.; SILVA, D.B.; ESTEVINHO, L. M.; SANTOS, E. L.; SOUZA, K. P. Microbiological quality, chemical profile as well as antioxidant and antidiabetic activities of *Schinus terebinthifolius* Raddi. Amsterdã: **Comparative Biochemistry and Physiology**, Vol.220, 36–46p, 2019.

RONEN, R.; GALUN, M. Pigment extraction from lichens with Dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. Grã-Betanha: **Environmental and Experimental Botany**, Vol. 24, (03), 23-245p, 1984.

ROSTAGNO, M.A.; PALMA, M.; BARROSO, C.G. Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones, Amsterdã: **Journal of chromatography A**, Vol.1012, 119-128p, 2003.

SANTIAGO, J.A.S. et al. Bactérias patogênicas relacionadas à ingestão de pescados - Revisão. Fortaleza: **Arquivos de Ciências do Mar**, Vol.46(2), 92-103p, 2013.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Santa Catarina: **Texto & Contexto Enfermagem**, Vol.13, 64-70p, 2004.

SANTOS, T. A. **Avaliação de diferentes métodos e solventes de extração sobre a composição fenólica e centesimal, atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos dos frutos da *Momordica charantia* L.** Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Lagarto: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, 83p, 2018.

SILVA, D. R.; FERREIRA, S. A. M.; SILVA, T. S.; SOUZA, P. H. S.; SILVA, A. C. B. Atividade antimicrobiana do extrato de *Chenopodium ambrosioides* e *Ruta graveolens* sobre *Streptococcus mutans*. São Paulo: **Archives Of Health Investigation**, Vol.7 (04), 120-122p, 2018.

SILVEIRA, G. B. **Investigação do potencial fitotóxico de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Allemão).** Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Viçosa: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 73p, 2015.

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punicagranatum*) peel and seed extracts

using in vitro models. **Journal of agricultural and food chemistry**, Vol.50 (1), 81-86p, 2002.

SINGH, A. S. et al. Multiple antibiotic-resistant, extended spectrum- $\beta$ -lactamase (esbl)-producing enterobacteria in fresh seafood. **Microorganisms**. Vol.5 (53). p 1-10, 2017.

SOARES, P. C. M.; MÁRSICO, E. T.; FRANCO, R. M.; SOBREIRO, L. G. Teor de histamina na musculatura branca e vermelha da sardinha verdadeira (*Sardinella brasiliensis*). Niterói: **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Vol.12 (1/3), 131-136p, 2005.

SOARES, D. G. S.; OLIVEIRA, C. B.; LEAL, C.; DRUMOND, M. R. S.; PADILHA, W. W. N. Atividade antibacteriana in vitro da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. João Pessoa: **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, Vol.7(3), 253-257p, 2007.

SOUSA, M. A. J. et al. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. Salvador-BA: **NewsLab** – Vol.63, 152-174p, 2004.

SOUZA, A. P. O.; OLIVEIRA, R. M.; OLIVEIRA, S. F.; FORTUNA, J. L. Atividade antimicrobiana dos sumos de alecrim, aroeira, guiné e mastruz sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Sergipe: **Scientia Plena**, Vol.11, N07, 1-9p, 2015.

STURION, D. J.; PINHEIRO E. R.; PARDO E.; TANAKA, N. M. Efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos do dimetil sulfóxido em aplicações tópicas em cães. Londrina: **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, Vol.1 (01), 41-47p, 1999.

THOMSON, K.S.; MOLAND, E.S. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. **Microbes and Infection**, Vol.2(10), 1225-1235p, 2002.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; ZIMMER, K.R.; SILVA, A.G.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S.; BAUMVOL, I.J.R.; MACEDO, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. Amsterdã: **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.137, 327– 335p, 2011.

ULIANA, M. P.; FRONZA, M.; SILVA, A. G.; VARGAS, T. S.; ANDRADE, T. U.; SCHERER, R. Composition and biological activity of Brazilian rose pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) leaves. Amsterdã: **Industrial Crops and Products**, Vol.83, 235-240p, 2016.

VALÉRIO, E. S. **Avaliação da atividade dos extratos hidroetanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. e de *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, frente a cepas de *mycobacterium* sp.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Belém: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, 119p, 2014.

## APÊNDICES

APÊNDICE A - Halos de inibição dos extratos do Mastruz frente as cepas de *E. coli*

CEPAS	MASTRUZ 39%				MASTRUZ 54%				MASTRUZ 70%			
	COM AGITAÇÃO		SEM AGITAÇÃO		COM AGITAÇÃO		SEM AGITAÇÃO		COM AGITAÇÃO		SEM AGITAÇÃO	
	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	<	-	-	-	<	-	<	-	<	-
5	<	-	1,75	-	1	-	1	-	<	-	1	-
6	-	<	-	<	-	-	-	-	-	<	-	<
7	<	-	1,5	-	<	-	<	-	<	-	<	-
8	<	-	<	-	-	-	-	-	1	-	-	-
13	<	-	1,5	-	<	-	1	-	<	-	1	-
15	<	<	1	<	<	<	1	<	<	<	<	<
16	<	<	<	<	-	<	-	<	<	<	-	<
17	<	<	1	<	1	<	1	<	-	<	2,2	<
18	<	-	1	-	1	-	1	-	<	-	1	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	1	<	1	<	-	-	<	-	-	-	-	-
25	<	-	<	-	<	-	<	-	<	-	<	-
28	-	<	-	<	-	-	-	-	-	-	<	-
29	<	-	1,5	-	<	-	1	-	<	-	1	-

APÊNDICE B - Halos de inibição dos extratos da aroeira frente as cepas de *E. coli*

CEPAS	AROEIRA 39%				AROEIRA 54%				AROEIRA 70%			
	COM AGITAÇÃO		SEM AGITAÇÃO		COM AGITAÇÃO		SEM AGITAÇÃO		COM AGITAÇÃO		SEM AGITAÇÃO	
	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

APÊNDICE C - Valores dos halos de inibição das análises com as cepas controle

Tratamento	<i>Escherichia coli</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>			
	COM AGITAÇÃO		SEM AGITAÇÃO		COM AGITAÇÃO		SEM AGITAÇÃO	
	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl	DMSO	NaCl
Aroeira 39%	-	-	-	-	3,5 mm	4,5 mm <sup>*</sup>	8,5 mm	4,7 mm
Aroeira 54%	-	-	-	-	7,5 mm	9,5 mm <sup>*</sup>	8,5 mm	5 mm
Aroeira 70%	-	-	-	-	9 mm	8,5 mm	8 mm	5,5 mm
Mastruz 39%	-	< 1mm	< 1mm	< 1mm	-	-	-	-
Mastruz 54%	< 1mm	-	< 1mm	< 1mm	-	-	-	-
Mastruz 70%	< 1mm	-	< 1mm	< 1mm	-	-	-	-
<b>Clorafenicol</b>	21 mm				11 mm			
<b>DMSO</b>	-				-			
<b>Solução Salina</b>	-				-			

\* Crescimento dentro do halo de inibição



