

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

DAS PLANTAS *Lundia cordata*

E *Dalbergia ecastophyllum*

Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza

Bióloga

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DAS PLANTAS *Lundia cordata*
E *Dalbergia ecastophyllum*

Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza

Orientador: Profa. Dra. Suzana Aparecida Costa de Araújo

Coorientador: Profa. Dra. Mércia Rodrigues Barros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

2014

Ficha Catalográfica Elaborada na Seção de Processos Técnicos da
Biblioteca Setorial do CCA, UFPB, campus II, Areia - PB

S729a Souza, Juliana Alves da Costa Ribeiro.

Avaliação da atividade antibacteriana das plantas *Lundia cordata* e *Dalbergia ecastophyllum* / Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza. – Areia - PB: CCA/UFPB, 2014.

33 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Centro de Ciências Agrárias.
Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2014.

Bibliografia.

Orientadora: Suzana Aparecida Costa de Araújo.

1. Plantas – Resistência bacteriana 2. *Lundia cordata* – Atividade antibacteriana 3. *Dalbergia ecastophyllum* – Atividade antibacteriana I. Araújo, Suzana Aparecida Costa de (Orientadora) II. Título.

UFPB/BSAR

CDU: 581(043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

JULIANA ALVES DA COSTA RIBEIRO SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

AVALIAÇÃO EM

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Suzana Aparecida Costa de Araújo
(Orientador)

Profª. Dra. Valeska Shelda Pessoa de Melo
(Examinadora)

Profª. Dra Valéria Veras Ribeiro
(Examinadora)

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA ALVES DA COSTA RIBEIRO SOUZA – Nascida em João Pessoa, Paraíba, no dia 8 de fevereiro de 1986. Possui graduação em bacharelado e licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba, Campus I e especialização em Ciências Biológicas pelas Faculdades Integradas de Jacarepaguá. É servidora técnico administrativo ocupando o cargo de técnico de laboratório/ área microbiologia no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário no Campus II da Universidade Federal da Paraíba, em Areia-PB desde 2010.

EPÍGRAFE

“Eu não sou quem eu gostaria de ser; eu não sou quem eu poderia ser, ainda, eu não sou quem eu deveria ser. Mas graças a Deus eu não sou mais quem eu era.”

Martin Luther King

DEDICATÓRIA

A Deus, a quem sempre entrego todos os meus caminhos, e que sempre dirige todos os meus passos. Ao meu esposo Thiago e minha filha Marina, que são meu incentivo para lutar por um futuro melhor. Aos meus pais, que sempre cuidaram da minha educação e serviram de exemplo para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que está presente em minha vida em todos os momentos, me abençoando e me guiando;

Ao meu esposo Thiago Siqueira Paiva de Souza, por todo apoio, e pelo auxílio na análise estatística do estudo;

A minha Filha Marina, que compreendeu a minha ausência em muitos momentos;

Aos meus pais Ribeiro e Zilah, e minha irmã Isadora, por terem contribuído nos cuidados com Marina, para que eu pudesse me dedicar ao trabalho;

À prof. Dra. Suzana Aparecida Costa de Araújo, pela orientação e por toda compreensão;

Às professoras Dra. Anne Evelyne Franco de Souza e Dra. Mércia Rodrigues Barros, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho;

A Vânia Vieira Reis que fez a coleta da planta *Lundia Cordata*, e George Luis Dias dos Santos e prof. Harley da Silva Alves, que prepararam o extrato da mesma;

Ao prof. Dr. Celso José Bruno de Oliveira, que me cedeu materiais importantes para a pesquisa, e a Candice, Denis e Guilherme que me ajudaram na elaboração da metodologia;

A Ma. Rafaela Soares dos Santos Maciel, e Prof. Dr, Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha por terem me cedido o extrato da planta *Dalbergia Ecastophyllum*;

Ao coordenador Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra, todos os docentes, técnicos administrativos e alunos do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, pelo apoio e conhecimento adquirido.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL	XII11
ABSTRACT	XIII12
CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
CAPÍTULO I	18
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAIS E MÉTODOS	22
a. Obtenção do material botânico	22
b. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EBB).....	23
c. Isolados bacterianos	23
d. Teste de suscetibilidade bacteriana	24
e. Concentração inibitória mínima (CIM)	24
f. Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)	24
g. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	25
h. Análise estatística	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS.....	29
REFERÊNCIAS.....	31

LISTA DE TABELAS**Página****Tabela 1.**

Valores dos testes de suscetibilidade (antibiograma e CIM) aos antibióticos controles das bactérias testadas	26
--	----

LISTA DE FIGURAS

Página

Gráfico 1.

Médias marginais estimadas do CIM das plantas *Lundia cordata* e *Dalbergia ecastophyllum* em relação às bactérias testadas.....24

Gráfico 2

Médias marginais estimadas do CMB das plantas *Lundia cordata* e *Dalbergia ecastophyllum* em relação às bactérias testadas.....25

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS PLANTAS *Lundia cordata* E *Dalbergia ecastophyllum*

RESUMO GERAL – A resistência bacteriana tem crescido em todo o mundo, e tem levado a tratamentos mal sucedidos, e ao aumento nos custos dos tratamentos e nas taxas de mortalidade. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, e os compostos produzidos pelas plantas podem ser explorados visando o desenvolvimento de novas drogas. Desta maneira, a atividade antibacteriana *in vitro* das plantas *Lundia cordata* e *Dalbergia ecastophyllum* foi avaliada contra as bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Os extratos etanólicos brutos das plantas foram diluídos no meio Caldo Mueller Hinton, e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo em uma microplaca de 96 poços. A CIM foi considerada a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento bacteriano (sem turvação). Em seguida, foi estabelecida a concentração bactericida mínima, que foi a menor concentração que inibiu 99% do crescimento bacteriano. A média da CIM dos extratos de *Lundia cordata* para as bactérias testadas variou de 5,62 a 50 mg/ml, e da CBM de 25 a 80 mg/ml. O extrato da planta *Dalbergia ecastophyllum* apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas de *Salmonella*, sendo o melhor resultado da CIM contra a *Salmonella enterica* sorovar Typhi ($0,187 \pm 0,01$ mg/ml) e da CBM foi contra a *Salmonella enterica enterica* ($1,5 \pm 0,01$ mg/ml). Estes resultados demonstram que o extrato etanólico bruto de *Dalbergia ecastophyllum* possui atividade antibacteriana, e pode ser explorado para o desenvolvimento de agentes antibacterianos.

Palavras Chave: *Escherichia coli*, Extrato etanólico, Resistência bacteriana, *Salmonella* sp.

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PLANTS *Lundia cordata* AND *Dalbergia ecastophyllum*

ABSTRACT - Bacterial resistance has increased worldwide, and has led to unsuccessful treatments and the raise in treatment costs and mortality rates. Therefore, it is necessary the development of new antimicrobial agents, and the compounds produced by plants can be exploited for the development of new drugs. Thus, we evaluated the in vitro antibacterial activity of plants *Dalbergia ecastophyllum* and *Lundia cordata* against bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. The crude ethanol extracts of the plants were diluted in Mueller Hinton Broth medium, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution method in a 96-well microplate. The MIC was considered the lowest concentration that visibly inhibited bacterial growth (no turbidity). After that, the minimal bactericidal concentration (MBC) was established, which was the lowest concentration that inhibited 99% of the bacterial growth. The mean MIC of the *Lundia cordata* extract against the bacteria tested ranged from 5.62 to 50 mg/ml, and the MBC from 25 to 80 mg/ml. The *Dalbergia ecastophyllum* extract showed antimicrobial activity against the strains of *Salmonella*, and the best result of MIC was against *Salmonella enterica* serovar Typhi (0.187 ± 0.01 mg / ml) and of the MBC was against *Salmonella enterica enterica* (1.5 ± 0.01 mg / ml). These results demonstrate that the crude ethanolic extract of *Dalbergia ecastophyllum* has antibacterial activity and can be exploited for the development of antibacterial agents. These results showed that the crude ethanolic extract of *Dalbergia ecastophyllum* has antibacterial activity and it can be exploited for the development of antibacterial agents.

Keywords: Bacterial resistance, *Escherichia coli*, Ethanolic extracts, *Salmonella* sp.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As doenças transmitidas por alimentos causam grande impacto econômico para a sociedade (LITRUP et al., 2010). Os principais patógenos envolvidos com os casos de contaminação alimentar são *Salmonella* e *Escherichia coli* patogênica (SANT'ANA; FRANCO; SCHAFFNER, 2014). As cepas resistentes podem ser transferidas dos animais para os humanos através da carne contaminada, e acredita-se que estas cepas podem causar infecções mais severas do que as suscetíveis, por causa da presença de fatores de virulência presentes nos elementos genéticos móveis associados à resistência (ASLAM et al., 2012).

As *E. coli* possuem grande capacidade de desenvolverem resistência aos agentes antimicrobianos, e de transferir o material genético intraespécie, ou até para outras espécies (RYU, 2012). Isto contribui para o aumento do risco à saúde, e dos custos dos tratamentos (ASLAM et al., 2014). Chen et al. (2014) monitoraram a resistência de isolados de *Escherichia coli* a 19 antibióticos, os quais representavam 11 classes de agentes antimicrobianos, pelo período de 20 anos, e para a maioria das drogas houve um aumento da resistência bacteriana, e no geral, mais de 96,7% foram resistentes a pelo menos um antibiótico, e 87,2% a múltiplas drogas (5 a 6 classes).

O controle das infecções causadas pelas bactérias do gênero *Samonella* torna-se difícil devido à alta tolerância desta bactéria a estresses ambientais, rápida disseminação e resistência a múltiplas drogas (CHEN et al., 2013). Além disso, a capacidade de produção de biofilmes contribui para o aumento da resistência e persistência no hospedeiro (RAZA et al., 2011). Sallam et al. (2014) analisaram a prevalência e resistência de *Salmonella* em amostras de carnes, e todos os sorovares foram resistentes a múltiplas drogas (>3 antibióticos), o que constitui um risco à saúde dos consumidores destes alimentos.

As bactérias podem ser naturalmente resistentes a uma ou mais classes de antibióticos, o que é denominado resistência intrínseca ou inata (SALISBURY et al., 2002). A resistência mais preocupante, entretanto, é a adquirida (TENOVER, 2006), a qual ocorre por mutações do DNA (IBARGUÉN-MONDRAGÓN et al., 2014) e/ou por transferência horizontal de plasmídeos, transposons ou integrons

(DEVIRGILIIS; BARILE; PEROZZI, 2011). Bactérias inicialmente suscetíveis, quando expostas a terapias superficiais, incompletas ou indiscriminadas podem sofrer mutações que lhes conferem resistência (WALLMANN, 2006). Quando isso ocorre, o agente antimicrobiano pode eliminar as bactérias suscetíveis, mas permitir que as cepas resistentes se proliferem (GIEDRAITIENÉ et al., 2011). Além disso, a população resistente pode sofrer transformações genéticas que as tornam resistentes a múltiplas drogas, sendo assim, a terapia tornou as bactérias mais difíceis de serem erradicadas (BLÁZQUEZ, 2003).

A resistência bacteriana leva a tratamentos malsucedidos, aumento da presença de bactérias clinicamente importantes no ambiente, aumento da morbidade e mortalidade das doenças, e, conseqüentemente, ao aumento dos custos dos tratamentos, causando um grande impacto econômico para a sociedade (TENOVER, 2006). Sendo assim, ela é considerada atualmente um dos maiores desafios médicos pelas maiores organizações mundiais de saúde do século 21 (THEURETZBACHER, 2013).

Uma vez que as bactérias podem adquirir resistência a qualquer antibiótico (KOLÁR; URBÁNEK; LÁTAL, 2001), é extremamente necessário o desenvolvimento de novas alternativas às drogas existentes (CARS; HEDIN; HEDDINI, 2011). A modificação química dos medicamentos já utilizados é uma maneira eficiente de produzir novas drogas, porém, as bactérias logo desenvolverão mecanismos contra elas também, sendo assim, é urgente o desenvolvimento de agentes antibacterianos com novos mecanismos de ação (FENEbro, 2011).

Os produtos naturais têm sido utilizados pelo homem para prevenir e curar doenças há milhares de anos: os primeiros registros do uso de plantas como medicamentos pelos homens datam de 2600 A.C (FAKIM, 2006). Os tratamentos com plantas medicinais foram transmitidos de geração em geração (SHANG et al., 2012). Atualmente, principalmente nos países desenvolvidos, estas informações estão sendo perdidas, pelo processo de aculturação acelerada e pela diminuição da população rural (BONET; VALLÈS, 2007). Entretanto, tem crescido o interesse dos pesquisadores sobre as plantas medicinais (ALBUQUERQUE et al., 2007), e tem se buscado dar bases científicas para a aplicação apropriada na medicina

(VITALINI; TOMÈ; GELSOMINA, 2009). Sendo assim, plantas, animais, microrganismos e minerais são vistos pela ciência médica como fontes de drogas humanas e veterinárias (DHAMI, 2013). Os produtos de origem natural têm sido considerados superiores aos sintéticos no que diz respeito à função biológica, diversidade (GUERRA; NODARI; 2007) e complexidade molecular, e por possuírem atividades altamente específicas e seletivas (CRAGG; NEWMAN, 2013).

As plantas produzem compostos chamados metabólitos secundários, que não são essenciais para seu crescimento e desenvolvimento, mas conferem vantagens para sua sobrevivência no ambiente (SANTOS, 2007). Dentre as funções dos metabólitos secundários estão a proteção contra microrganismos, luz ultravioleta e animais herbívoros como inseto e gado, e estas suas atividades biológicas são o que podem dar às plantas características medicinais (BOUGARD et al., 2001).

Lundia cordata DC. é uma planta que pertence ao gênero *Lundia*, e à família Bignoniaceae (LOPES et al., 2002). Os poucos estudos disponíveis em que ela é mencionada, referem-se principalmente às características botânicas e levantamento florístico (AMAZONAS; BARBOSA, 2011; KIMMEL et al., 2010; LOPES; VOGEL; MACHADO, 2002). Albuquerque et al (2007) relata o uso desta planta, que é popularmente conhecida como cipó de vaqueiro, no tratamento contra doenças sexualmente transmissíveis em comunidades rurais e indígenas no Nordeste do Brasil.

Dalbergia ecastophyllum (Fabaceae) é considerada a origem botânica da própolis vermelha brasileira (DAUGSCH et al., 2007), a qual possui atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, anti-ulcerativa, antioxidante e antitumoral (FROZZA et al., 2013). A própolis possui alto valor terapêutico, e desta própolis vermelha já foram identificados isoflavonóides, nafitoquinonas e benzofenonas (KASOTE et al., 2014). Uma vez que a composição química da própolis é influenciada pelas plantas pelas quais ela é preparada (LIO et al., 2010), acredita-se que *Dalbergia ecastophyllum* também contém compostos com valores farmacêuticos.

Com base nestas informações, percebemos o quanto é necessário o combate às infecções causadas por estas bactérias, e que as plantas podem ser fontes de substâncias com ação antimicrobiana, que poderão ser utilizadas no desafio contra

estes microrganismos. Sendo assim, objetivou-se avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de *Lundia cordata* e *Dalgergia ecastophyllum* contra cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*.

CAPÍTULO I

Atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais

Atividade antibacteriana de extratos de plantas medicinais

Juliana Alves da Costa Ribeiro Souza ⁽¹⁾, Anne Evelyne Franco de Souza ⁽¹⁾, George Luís Dias dos Santos ⁽²⁾, Harley da Silva Alves ⁽²⁾, Rafaela dos Santos Soares Maciel ⁽³⁾, Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha ⁽³⁾ Mércia Rodrigues Barros ⁽⁴⁾ e Suzana Aparecida Costa de Araújo ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, CEP 58397-000, Areia, PB, Brasil. Email: julianaacrs@hotmail.com; anneevy8@hotmail.com, suzanaaraujo@gmail.com; ⁽²⁾ Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Rua Baraúnas, 351, Bairro Universitário, CEP 58429-500, Campina Grande, PB, Brasil. Email: geobio5@uol.com.br, harley.alves@hotmail.com ⁽³⁾ Laboratório de Fitoquímica, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, Cidade Universitária, CEP 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil. Email: rafaela_ssoares@hotmail.com, emidio@lft.ufpb.br ⁽⁴⁾ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois irmãos, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. Email merciarbpe@dmv.ufrpe.br

Resumo - Os extratos etanólicos brutos das plantas *Lundia cordata* e *Dalbergia ecastophyllum* foram avaliados quanto à ação antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subespécie enterica e *Salmonella enterica* sorovares Enteritidis e Typhi. A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos foi estabelecida pela técnica de microdiluição em caldo em uma microplaca de 96 poços. Foi retirada uma alíquota dos poços que não apresentaram crescimento e o primeiro poço turvo, e semeada no meio Ágar Mueller Hinton para o teste da concentração bactericida mínima dos extratos (CBM). *Dalbergia ecastophyllum* apresentou atividade antimicrobiana para as cepas de *Salmonella* testadas. *Salmonella enterica* sorovar Typhi foi a mais suscetível em relação à CIM ($0,187 \pm 0,01$ mg/ml), e *Salmonella enterica* enterica em relação à CBM ($0,375 \pm 0,01$ mg/ml). Estes resultados demonstram que *Dalbergia ecastophyllum* pode contribuir para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra bactérias do gênero *Salmonella*.

Termos para indexação: Planta medicinal, *Escherichia coli*, *Salmonella*, Resistência bacteriana, *Dalbergia ecastophyllum*, *Lundia cordata*

Bacterial activity of medicinal plants extracts

Abstract – The antibacterial activity of the crude ethanol extracts of the plants *Lundia cordata* and *Dalbergia ecastophyllum* was performed against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subspecies enterica and *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and Typhi. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the extracts was determined by broth microdilution method in a 96-well microplate. From the wells with no visible growth and the first cloudy well, an aliquote was removed and subcultured onto a Mueller Hinton Agar plate for testing the minimal bactericidal concentration (MBC) of the extracts. The *Dalbergia ecastophyllum* showed better antibacterial activity against the tested strain of *Salmonella*. The best MIC value was against *Salmonella enterica* serovar Typhi ($0,187 \pm 0,01$ mg/ml), and the best MBC was against *Salmonella enterica* enterica ($0,375 \pm 0,01$ mg/ml). These results demonstrate that *Dalbergia ecastophyllum* may contribute to the development of new antimicrobial agents against bacteria of the genus *Salmonella*.

Index terms: Medicinal plant, *Escherichia coli*, *Salmonella*, Bacterial resistance, *Dalbergia ecastophyllum*, *Lundia cordata*

Introdução

Salmonella sp. e *Escherichia coli* são os patógenos bacterianos mais transmitidos por alimentos (Sant'ana et al., 2014). O uso indiscriminado dos antibióticos para tratar as infecções causadas por estas bactérias tem levado ao desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas: Singh et al (2013) isolou salmonelas de ovos, fezes, água, comida e cloaca de galinhas de produção, e dentre os isolados, aproximadamente 100% apresentaram resistência à clindamicina, oxacilina, penicilina e vancomicina, que são antibióticos

frequentemente administrados na medicina veterinária. Lima-Filho et al (2013) investigou a suscetibilidade de cepas de *E. coli* isolada de aves a antibióticos de uso humano e aviário, e dentre os resultados encontrados, 100% das cepas foram resistentes à tetraciclina e à estreptomicina e 81,5% à ampicilina.

A resistência bacteriana tem aumentado em todo o mundo, e é considerada um dos maiores desafios médicos do século 21 pelas maiores organizações de saúde (Marshall e Levy, 2011). Por esta razão, torna-se necessária a busca por novos agentes antimicrobianos, com novos mecanismos de ação (Bag et al., 2012). Os produtos naturais podem ser fontes destas substâncias, e, dentre eles, as plantas medicinais são uma boa alternativa (Deepti et al., 2012), pois elas produzem uma série de metabólitos secundários para se protegerem do ataque de bactérias no ambiente, sendo assim, algumas destes compostos podem ter função antibacteriana (Shiu et al., 2013).

Diversas plantas têm sido testadas quanto ao seu potencial antibacteriano, e muitas delas têm mostrado resultados satisfatórios. É o caso, por exemplo, de *Hypericum laricifolium*, *Hura crepitans*, *Caesalpinia paipai*, *Cassia fistula*, *Hyptis sidifolia*, *Salvia* sp, *Banisteriopsis caapi*, *Miconia salicifolia*, *Polygonum hydropiperoides* (Bussmann et al., 2010), *Anoigeissus leiocarpus* (Muraina et al., 2009) e *Eucalyptus globulus* (Bachir e Benali; 2012).

Dalbergia ecastophyllum é uma planta pertencente à família Fabaceae, a qual é considerada a segunda maior família de plantas medicinais (Dzoyem et al., 2014). É a origem botânica da própolis vermelha brasileira, produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* (Daugusch et al., 2007). Este tipo de própolis tem chamado a atenção do mercado internacional (Silva et al., 2007), e já demonstrou possuir atividade antibacteriana (Alencar et al., 2007; Bueno-Silva et al., 2013). Sendo assim, a própolis tem sido o seu principal objeto de estudo,

mas é necessário que a planta seja estudada, para avaliar a presença de compostos importantes para o desenvolvimento de drogas.

Lundia cordata pertence à família Bignoniaceae (Lopes et al., 2002). Albuquerque et al (2007) relata seu uso como planta medicinal no tratamento de doenças venéreas. Entretanto, até o presente momento, não foram encontrados trabalhos científicos sobre suas propriedades antibacterianas. A família Bignoniaceae por sua vez, é bastante conhecida por seus poderes medicinais (Muñoz-Mingarro et al., 2003), amplamente estudada, e possui substâncias químicas com atividade farmacêutica comprovada (Arruda et al., 2009).

Tendo em base estes conhecimentos, o objetivo deste trabalho foi verificar a atividade *in vitro* dos extratos de *Lundia cordata* e *Dalbergia ecastophyllum* contra cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subespécie enterica, e *Salmonella enterica* sorovares Typhi e Enteritidis, visando a contribuição no desenvolvimento de drogas contra estes patógenos.

Materiais e Métodos

a. Obtenção do material botânico

As partes aéreas de *Dalbergia ecastophyllum* foram coletadas no município de Rio Tinto – PB. Sua identificação botânica foi realizada pela Profa. Dra. Evelise Marcia Locatelli (Botânica do CES/UFCG, Campus Cuité) e uma exsicata foi preparada e depositada no Herbário do Departamento de Sistemática e Ecologia (DSE) – UFPB, catalogada como 45738 (JPB).

As folhas frescas da planta *Lundia cordata* foram coletadas no Campus II da Universidade Federal da Paraíba, na cidade de Areia, PB. Uma exsicata foi identificada e

depositada no Herbário Professor Jaime Coelho de Moraes, e catalogada com o número 19743.

b. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EBB)

Os materiais botânicos frescos foram desidratados em estufa com ar circulante, durante 72 horas, a temperatura média de 40°C, sendo, em seguida, triturado em moinho mecânico. O pó das plantas foi macerado em etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) a 95 % por 72 horas, sendo tal processo repetido exaustivamente. Em seguida, a solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C.

O EBB de *Lundia cordata* foi preparado no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, e o de *Dalbergia ecastophyllum* no Laboratório de Fitoquímica do Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba.

Uma solução mãe dos extratos brutos foi preparada dissolvendo-os em água destilada estéril. Esta solução foi filtrada com filtro de 0,22 µm e diluída no meio Caldo Mueller Hinton em diferentes concentrações.

c. Isolados bacterianos

As bactérias utilizadas neste estudo foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* subespécie enterica e *Salmonella enterica* sorovar Typhi ATCC 14028 e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis.

d. Teste de suscetibilidade bacteriana

As bactérias (equivalentes a 0,5 McFarland) foram semeadas por toda a superfície do meio Ágar Mueller Hinton. O antibiograma foi realizado para verificar a suscetibilidade das bactérias aos antibióticos controles, ampicilina (10 µg) e gentamicina (10 µg), pelo método de disco difusão conforme recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2012). As placas foram cultivadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18h a 24h. Após este período, as zonas de inibição foram medidas em milímetros com o auxílio de um paquímetro.

e. Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada pelo método de microdiluição em caldo descrito pelo CLSI (NCCLS, 1999). Uma microplaca de 96 poços foi inoculada com 100 µl do meio Caldo Mueller Hinton. Em seguida, em seus respectivos poços, foram adicionados 100 µl das substâncias antibacterianas a serem testadas: os antibióticos controles gentamicina (32 µg/ml) e ampicilina (64 µg/ml), e as diluições dos EBB de *Lundia cordata* e de *Dalbergia ecastophyllum*. Sequencialmente, foram feitas diluições seriadas ao dobro destas substâncias. Foram adicionados em cada poço 10µl do inóculo (equivalente a 0,5 McFarland) diluído 1:20 em solução salina a 0,9% estéril. Foram utilizados controles de pureza das substâncias antibacterianas e de crescimento positivo. A CIM foi considerada a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento bacteriano.

f. Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC)

Imediatamente após a inoculação das bactérias para a CIM, foram retirados 10 µl do controle de crescimento positivo, e diluídos em 1:1000 em solução salina a 0,9% estéril.

Foram retirados 100 µl desta diluição e semeados no meio Ágar Plate. Após 24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C, foi realizada a contagem das colônias (NCCLS, 1999). Este processo foi necessário para a posterior interpretação dos resultados da concentração bactericida mínima.

g. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

Após a realização da prova da CIM, retirou-se 10 µl dos poços de cada diluição do extrato, que não apresentaram crescimento bacteriano visível, e do primeiro poço cuja diluição apresentou turbidez, e transferiu-se para placas de Petri contendo o meio ágar Mueller Hinton. As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, e foi realizada a contagem das colônias bacterianas. A CBM foi considerada a menor concentração dos extratos que inibiu 99,9% do crescimento bacteriano (NCCLS, 1999).

h. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o ANOVA-two way seguido do teste de Post Hoc de Tukey com o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

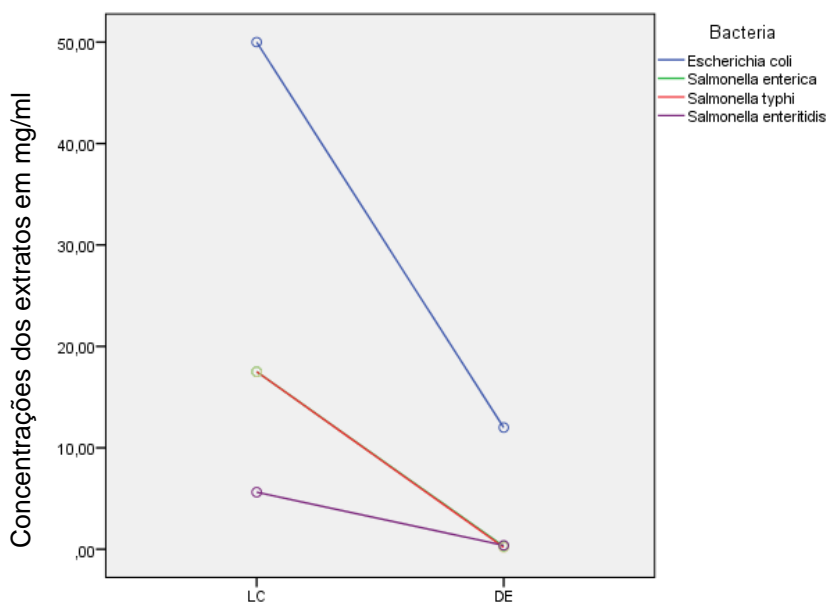
Resultados e Discussão

No presente estudo, as capacidades inibitória e bactericida das plantas *Dalbergia ecastophyllum* e *Lundia cordata* foram testadas contra bactérias consideradas patógenos importantes de seres humanos e animais, visando contribuir com o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos. Em relação à CIM, a *S. enterica* sorovar enteritidis foi a mais

suscetível ao extrato da *L. cordata* ($5,625 \pm 8,8$ mg/ml) e a *S. enterica* sorovar Typhi foi a mais suscetível ao extrato da *D. ecastophyllum* ($0,187 \pm 0,01$ mg/ml).

A análise estatística dos valores da CIM mostrou que houve diferença significativa entre as duas plantas testadas ($p=0,0001$). No gráfico 1, fica evidente que a *D. ecastophyllum* teve melhor atividade antimicrobiana do que a *L. cordata*, por ter apresentado concentrações menores e mais homogêneas. Podemos observar que para ambas as plantas, foram necessárias concentrações mais elevadas para inibir o crescimento de *E. coli*. Este dado foi confirmado no teste Post Hoc de Tukey, no qual, houve diferenças significativas entre os valores da CIM dos extratos para *E. coli* e as demais bactérias ($p=0,0001$).

Gráfico 1 - Médias marginais estimadas da CIM das plantas *Lundia cordata* e *Dalbergia ecastophyllum* em relação às bactérias testadas



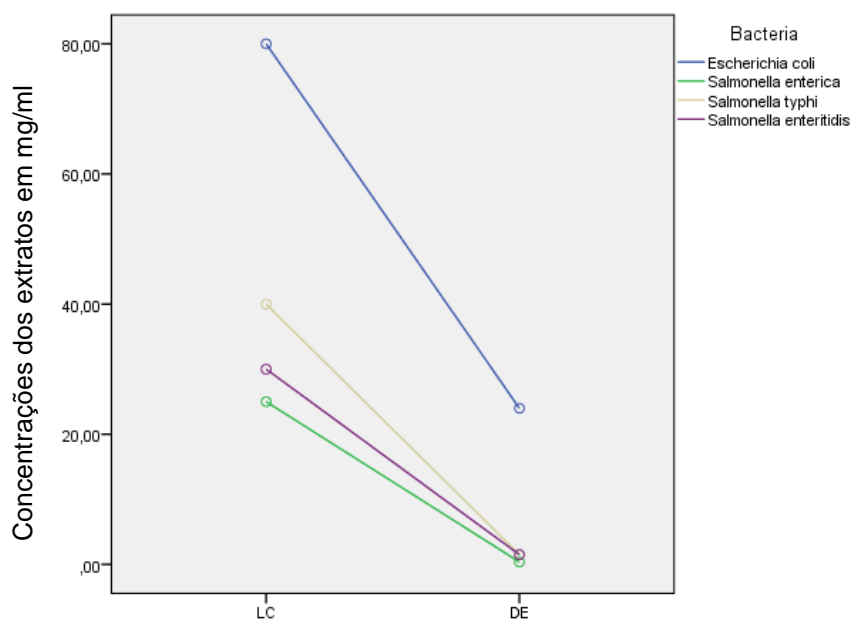
Os números indicam as médias dos valores da CIM encontrados nos testes realizados em duplicata.
LC= *Lundia cordata*. DE = *Dalbergia ecastophyllum*

As menores CBM foram contra a *Salmonella enterica* subesp. *enterica* em ambas as plantas (*Lundia cordata* - $25 \pm 1,41$ mg/ml; *Dalbergia ecastophyllum* - $0,375 \pm 0,01$ mg/ml). É interessante perceber que esta bactéria não foi a que apresentou menor CIM, ou seja, foram

necessárias maiores concentrações bacteriostáticas, porém, menores concentrações bactericidas, em relação às demais bactérias testadas.

A análise estatística destes dados mostrou que houve diferença significativa entre as CBM das plantas ($p = 0,0001$), e também entre todos os efeitos bactericidas das plantas sobre as bactérias testadas ($0,0001 < p < 0,02$). No gráfico 2, podemos observar que a *D. ecastophyllum* apresentou melhores resultados do que a *L. cordata*, uma vez que os valores obtidos são menores, e mais próximos entre si. Assim como a CIM, *E. coli* foi a bactéria que apresentou os níveis mais elevados da CBM dos extratos (confirmado pelo teste post hoc de Tukey – $p=0,0001$).

Gráfico 2 - Médias marginais estimadas do CBM das plantas *Lundia cordata* e *Dalbergia ecastophyllum* em relação às bactérias testadas



Os números indicam as médias dos valores da CBM encontrados nos testes realizados em duplicata.
LC= *Lundia cordata*. DE= *Dalbergia ecastophyllum*

Alguns autores consideram que os extratos de plantas possuem forte inibição quando apresentam CIM abaixo de 5 mg/ml (Bussman et al, 2010), 1 mg/ml (Laher et al, 2013) ou 100 µl/ml (Holetz et al, 2002), sendo assim, não existe ainda um consenso sobre o nível de atividade aceitável. O mesmo acontece com a CBM, ainda não foram estabelecidos os níveis

bactericidas considerados aceitáveis para os produtos naturais. Esta classificação torna-se difícil, pois muitos fatores podem influenciar os resultados destes testes com extratos: o tempo de armazenamento da planta, o solvente utilizado (Laher et al, 2013), a relação entre as bactérias testadas e os mecanismos de ação dos compostos (Dzoyem et al, 2014) e a parte da planta testada (Ullah et al, 2013).

No teste de suscetibilidade das bactérias aos antibióticos, nenhuma das quatro cepas testadas apresentou resistência aos antibióticos. Apesar disso, *E. coli* apresentou o menor halo de inibição e maior CIM em comparação com as demais bactérias (Tabela 1). Estes dados concordam com os resultados supracitados, nos quais esta bactéria foi menos suscetível aos extratos de ambas as plantas do que as demais bactérias (Gráficos 1 e 2). Provavelmente *E. coli* possui uma resistência intrínseca aos compostos presentes nas plantas testadas, uma vez que as lipoproteínas e os lipopolissacarídeos presentes na membrana externa das Gram negativas limitam a penetração dos compostos hidrofóbicos, conferindo a este grupo de bactérias maior resistência à atividade dos antibacterianos (Bachir e Benali, 2012; Ullah et al, 2013).

Tabela 1 - Valores dos testes de suscetibilidade (antibiograma e CIM) aos antibióticos controles das bactérias testadas

	Antibiograma (mm)		CIM (µg/ml)	
	Ampicilina	Gentamicina	Ampicilina	Gentamicina
<i>Escherichia coli</i>	22	19	12	<1
<i>Salmonella enterica</i>	24,5	44	<1	<1
<i>Salmonella typhi</i>	27	38,25	<1	<1
<i>Salmonella enteritidis</i>	24	39,75	<1	<1

Os números indicam as médias dos valores do antibiograma e do CIM encontrados nos testes realizados em duplicata

Os estudos envolvendo a descoberta de novos agentes antimicrobianos contra estas bactérias são de extrema importância, pois, todos os anos, milhões de pessoas são atingidas por infecções causadas pela *Salmonella* sp., sendo *Salmonella enterica* responsável por mais de 99% dos casos (Chen et al, 2013), e as doenças causadas por *Escherichia coli* possuem

altas taxas de morbidade e mortalidade, e são responsáveis por grandes perdas econômicas (Jakobsen et al, 2010).

Os compostos produzidos pelas plantas são boas fontes de substâncias antimicrobianas, pois a maioria é livre de efeitos adversos, são de baixo custo, e podem ter efeito sobre uma variedade de microrganismos (Bag et al, 2012), e a análise *in vitro* é o primeiro passo para o desenvolvimento de medicamentos baseados nestes compostos.

Conclusão

Os resultados obtidos nos testes de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima mostraram que o extrato etanólico bruto da planta *Dalbergia ecastophyllum* possui atividade antimicrobiana contra as cepas do gênero *Salmonella* testadas, por isso, ela deve ser explorada para o desenvolvimento de novos agentes contra as infecções causadas por estes microrganismos.

Referências

- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of the NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.
- ALENCAR, S. M. et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 278-283, 2007.
- ARRUDA, A. L. A. **Contribuição ao estudo da atividade biológica de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (BIGNONIACEAE)**. 2009. 136f. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2009.
- BACHIR RAHO, G.; BENALI, M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 9, p. 739-742, 2012.
- BAG, A.; BHATTACHARYYA, S. K.; PAL, N. K.; CHATTOPADHYAY, R. R. In vitro antibacterial potential of *Eugenia jambolana* seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, v. 167, n.6, p. 352-357, 2012.

BUENO-SILVA, B. et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from brazilian red propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61,n. 19, p. 4546-4550, 2013.

BUSSMANN, R. W. et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 101-108, 2010.

CHEN, H. M.et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features and antimicrobial therapy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, p. 147-152, 2013.

CLSI. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard, 9 ed. Estados Unidos, Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Advanced Access Publication**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.

DEEPTI, K. et al.. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Morinda tinctoria* Roxb. leaf extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n. 3, p. S1140-S1142, 2012.

DZOYEM, J. P.; MCGAW, L. J.; ELOFF, J. N. In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n.1, p. 147, 2014.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

JAKOBSEN, L.et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling human and UTI patients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n.1-2, p. 264-272, 2010.

LAHER, F.et al. Evaluating of storage on the biological activity and chemical composition of three South African medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 88, p. 414 – 418, 2013.

LIMA-FILHO, J. V.et al. Zoonotic potential of multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* obtained from healthy poultry carcasses in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 7, n. 1, p. 54-61, 2013.

LOPES, A. V.; VOGEL, S.; MACHADO, I. C. Secretory trichomes, a substitutive floral nectar source in *Lundia A. DC.* (Bignoniaceae), a genus lacking a functional disc. **Annals of Botany**, v. 90, n.2, p. 169-174, 2002.

MARSHALL, B. M.; LEVY, S. B. Food animals and antimicrobials: impact in human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, 2011.

MUÑOZ-MINGARRO, D. et al. Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 163-167, 2003.

MURAINA, I. A.; PICARD, J.; ELOFF, J. N. Development of a reproducible method to determine minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extract against a slow-growing mycoplasmas organism. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 262-264, 2009.

NCCLS. **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**: approved guideline. Documento M26-A, Estados Unidos, NCLSS, 1999.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogens* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 1-8, 2014.

SHIU, W.; et al. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. 6, p. 513-518, 2013.

SILVA, B. B.; et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis a new type of brazilian propolis. **Advanced Access Publication**, v. 8, n. 3, p. 313-316, 2007.

SINGH, R.; et al. Antimicrobial resistance profile of *Salmonella* presente in poutry and poultry environment in north India. **Food Control**, v. 33, n.2, p. 545-548, 2013.

ULLAH, M. O. et al. Anti-bacterial activity and brine shrimp lethality bioassay of methanolic extracts of fourteen different edible vegetables from Bangladesh. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, n. 3, v. 1, p. 1-7, 2013.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinals plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of the NE Brazil: a quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 325-354, 2007.

AMAZONAS, N. T.; BARBOSA, M. R. V. Levantamento florístico das angiospermas em um remanescente de floresta atlântica estacional na microbacia hidrográfica do rio Timbô, João Pessoa, Paraíba. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 20, n. 2, p. 67-78, 2011.

ASLAM, M. et al. Phenotypic and genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella* serovars isolated from retail meats in Alberta, Canada. **Food Microbiology**, v. 32, p. 110-117, 2012.

_____. et al. Caracterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from retail poultry meats from Alberta, Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v. 177, p. 49-56, 2014.

BLÁZQUEZ, J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n.9, p. 1201-1209, 2003.

BONET, M. A.; VALLÈS, J. Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian peninsula): plants used in veterinary medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 130-147, 2007.

BOUGARD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n.2001, p. 839-851, 2001.

CARS, O.; HEDIN, A.; HEDDINI, A. The global need for effective antibiotics: moving towards concerted action. **Drug Resistance Updates**, v. 14, n.2, p. 68-69 2011.

CHEN, H. M. et al. Nontyphoid *Salmonella* infection: Microbiology, clinical features and antimicrobial therapy. **Pediatrics and Neonatology**, v. 54, n. 3, p. 147-152, 2013.

CHEN, X. et al. Escherichia coli isolates from sick chickens in China: Changes in antimicrobial resistance between 1993 and 2013. **The Veterinary Journal**, v. 200, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Advanced Access Publication**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.

DEVIRGILIIS, C.; BARILE, S.; PEROZZI, G. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. **Genes & Nutrition**, v. 6, n.3, p. 275-284, 2011.

DHAMI, N.; Trends in pharmacognosy: a modern science of natural medicines. **Journal of Herbal Medicine**, v. 3, n. 4, p. 123-131, 2013.

FAKIM, A. G. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n.1, p. 1-93, 2006.

FENEBRO, J. Fighting bacterial infections: Future treatment options. **Drug Resistance Updates**, v. 14, p. 125-139, 2011.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidante and cytotoxic activities pf Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

GIEDRAITIENÉ, A.; et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 3, 2011.

GUERRA, M. P; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos *in* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed, Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

IBAGUEN-MONDRAGÓN, E. et al. Mathematical modeling on bacterial resistance to multiple antibiotics caused by spontaneous mutations. **Bio Systems**. V.117,n. 2014, p. 60-67, 2014.

IIO, A. et al. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. **Phytomedicine**, v. 17, p. 974-979, 2010.

KASOTE, D. et al. Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 156-163, 2014.

KIMMEL, T. M. et al. Pollination and seed dispersal modes of woody species of 12-year-old secondary forest in the Atlantic Forest region of Pernambuco, NE Brazil. **Flora - morphology, distribution, functional ecology of plants**, v. 205, n. 8, p. 540-547, 2010.

KOLÁR, M.; URBÁNEK, K.; LÁTAL, T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 5, p. 357-363, 2001.

LITRUP, E. et al. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n.7, p. 1132-1139, 2010.

LOPES, A. V.; VOGEL, S.; MACHADO, I. C. Secretory trichomes, a substitutive floral nectar source in *Lundia* A. DC. (Bignoniaceae), a genus lacking a functional disc. **Annals of Botany**, v. 90, n.2, p. 169-174, 2002.

RAZA, A. et al. Effect of biofilm formation on the excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhi in feces. **International Journal of Infectious Diseases**. V. 15, n.11, p. e747-e752, 2011.

RYU, S. H. et al. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n.3, p. 263-266, 2012.

SALLAM, K. I. et al. Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from retail beef products in Mansoura, Egypt. **Food Control**, v. 38, p. 209-214, 2014.

SALISBURY, J. G. et al. A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic use resistance in food-producing animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, n.3, p. 153-164, 2002.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M.; SCHAFFNER, D. W. Risk of infection with *Salmonella* and *Listeria monocytogens* due to consumption of ready-to-eat leafy vegetables in Brazil. **Food Control**, v. 42, p. 1-8, 2014.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed, Porto alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SHANG, X. et al. Ethno-veterinary survey of medicinal plants in Ruogai region Sichuan province, China. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 142, n.2, p. 300-400, 2012.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**. V. 119, n. 6 Suppl1, p. S3-10, 2006.

THEURETZBACHER, U. Global antibacterial resistance: the never-ending story. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 2, p. 63-69, 2013.

VITALINI, S.; TOMÈ, F. GELSOMINA, F. Traditional uses of medicinal plants in Valvestino (Italy). **Journal of Ethnopharmacology**. n.121, v.1, p 106-116, 2009.

WALLMANN, J. Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 296, Suppl 41, p. 81-86, 2006.