



ESTUDO FITOQUÍMICO, AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE HEMOLÍTICA E ANTIMICROBIANA DE UM EXTRATO BRUTO DA CASCA DO CAULE DE *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae).

*Ian Jhemes Oliveira Sousa**, *Maria Candida Pessoa Silva*,
Gabriel Lacerda Leopoldino, *Lucas Silva Agostinho*

Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, Brasil

*Corresponding author. E-mail address: ianjhemes@gmail.com

RESUMO

O *Ziziphus joazeiro* Mart., popularmente conhecido como juazeiro, é uma planta típica do semiárido brasileiro sendo utilizada pela comunidade para diversas finalidades, dentre elas, como anti-inflamatório e antimicrobiano. Dessa forma, objetivo deste estudo é realizar um *screening* fitoquímico do extrato hidroalcoólico das cascas de *Ziziphus joazeiro* Mart. e avaliar seu potencial hemolítico e sua atividade antimicrobiana devido a seu amplo uso com esta finalidade. Para a realização deste estudo foram obtidas cascas de caule de *Ziziphus joazeiro* Mart a qual foram submetidas à decoção hidroalcoólica (70%) seguido de rotaevaporação do solvente para obtenção do extrato seco. O extrato obtido foi utilizado primeiramente para a realização do *screening* fitoquímico qualitativo, quando foram realizados testes para a determinação da ausência ou presença de taninos, saponinas, flavonoides, antocianidinas, alcaloides e cumarinas. Além disso, foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato, através do método de microdiluição, frente a cepas padrão e também foi avaliado o potencial de dano às membranas pele teste de avaliação da atividade hemolítica. A análise fitoquímica revelou resultado positivo para os seguintes metabólitos secundários: saponinas, taninos e cumarinas. Já a análise hemolítica quantitativa mostrou dano hemolítico significativo para a concentração do extrato de $400\mu\text{g.mL}^{-1}$, já em relação as análises microbiológicas, eles mostraram uma concentração inibitória mínima de $>4096;4096$ e $>4096\ \mu\text{g mL}^{-1}$ para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, respectivamente. Sendo assim, apesar do estudo fitoquímico ter revelado presença de saponinas, taninos e cumarinas, o extrato não se mostrou promissor em relação a sua atividade antimicrobiana, além de ter apresentado um potencial dano as membranas para concentrações acima de $400\ \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que limita o seu uso.

Palavras Chave: Juá. Avaliação Fitoquímica. Avaliação Microbiológica.

SCREEANING PHYTOCHEMICAL AND EVALUATION OF THE HEMOLYTIC AND ANTIMICROBIAL CAPACITY OF A EXTRACT OF CRUDE BARK OF *Ziziphus joazeiro* Mart STEM. (Rhamnaceae).

ABSTRACT

Ziziphus joazeiro Mart., Popularly known as juazeiro, is a typical Brazilian semi-arid plant and is used by the community for several purposes, including anti-inflammatory and



antimicrobial. Thus, the objective of this study is to perform a phytochemical screening of the hydroalcoholic extract of the barks of *Ziziphus joazeiro* Mart. and to evaluate its hemolytic potential and its antimicrobial activity due to its wide use for this purpose. This study was added stalks in *Ziziphus joazeiro* Mart which were submitted to hydroalcoholic decoction (70%) followed by rotaevaporation of the solvent to obtain the dry extract. The extract was first used for the qualitative phytochemical screening, where a test was carried out to determine the absence or presence of tannins, saponins, flavonoids, anthocyanidins, alkaloids and coumarins. In addition, we evaluated the antimicrobial activity of the extract, through the microdilution method, against standard strains and also evaluated the potential damage to membrane skin test evaluation of hemolytic activity. Phytochemical analysis revealed positive results for the following secondary metabolites: saponins, tannins and coumarins. The quantitative hemolytic analysis showed significant hemolytic damage for the concentration of the extract of $400\mu\text{g.mL}^{-1}$, and in relation to the microbiological analyzes they showed a minimum inhibitory concentration of > 4096 , 4096 and $> 4096 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, respectively. Although the phytochemical study revealed the presence of saponins, tannins and coumarins, the extract did not show promise in relation to its antimicrobial activity, in addition to presenting potential damage to the membranes at concentrations above $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, which limits its use.

Key-words: Juá. Hidroalcoholic. Hemolysis. Antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Ziziphus* possui cerca de 100 espécies, sendo *Ziziphus joazeiro* Mart., conhecida por juazeiro ou laranjeira-do-vaqueiro, o representante típico da região semiárida brasileira, sendo encontrado frequentemente na região do cerrado (LORENZI; MATOS, 2002; SILVA et al., 2017). *Z. joazeiro* é largamente distribuída em todo o Nordeste brasileiro e em todas as zonas ecológicas, sendo mais abundante no sertão, na caatinga e no agreste (SILVA; MATOS, 1998). Por se tratar de uma espécie típica dessa região, o juazeiro é capaz de resistir a grandes secas conservando-se sempre verde e nunca perdendo toda a sua folhagem; as folhas e os frutos constituem um dos mais valiosos recursos alimentares para animais, nos períodos de seca (SILVA; MATOS, 1998; SILVA et al., 2016;).

O estudo intensivo de plantas medicinais, quanto aos seus aspectos fitoquímicos, fornece informações úteis na detecção de produtos fitoterápicos de qualidade, possibilitando a identificação de compostos com possibilidade terapêutica (SILVA, 2008).

Em laboratórios, o teste de avaliação de danos a membranas biológicas utilizando o modelo de hemólise *in vitro* vem sendo empregado rotineiramente em estudos de toxicidade de plantas medicinais e de interesse pecuário mostrando-se positivo, sobretudo, nas espécies que apresentam saponinas em sua constituição (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006). A atividade hemolítica das saponinas é atribuída ao sistema de proteção do vegetal contra predação por diversos agentes (insetos, vírus, fungos e bactérias)



(BRUNETON, 1999). A ação antimicrobiana atribuída a várias plantas, muitas vezes, está relacionada à presença de tais compostos (LACAILLE-DUBOIS; WAGNER, 1996).

O aumento na prevalência de doenças infecciosas ocasionadas por cepas multirresistentes é um fenômeno preocupante, uma vez que ela tem resultado em maiores taxas de morbimortalidade (GELATTI et al., 2009; MORAR; WRIGHT, 2010; STROMMINGER et al., 2014; LÓPEZ-CAMACHO et al., 2014). O principal motivo apontado para este aumento é a utilização cada vez mais intensiva de antibióticos para fins terapêuticos na clínica médica humana (OTTO, 2010) e veterinária (COHN; MIDDLETON, 2010; CHANTZIARAS et al., 2014), em muitos casos de forma não criteriosa. Como consequência, as bactérias patogênicas têm acumulado vários genes de resistência, que lhes permitem sobreviver nos tecidos de animais e seres humanos frequentemente tratados com antibióticos. Portanto, o desenvolvimento do fenótipo de multirresistência, é uma resposta adaptativa à presença contínua de antibióticos no meio em que elas se encontram (HARADA; ASAI, 2010).

Em virtude da elevada prevalência de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos convencionais, muitas pesquisas têm sido realizadas visando à descoberta de novos agentes antimicrobianos (KUMAR; CHOPRA, 2013; FABBRETTI, GUALERZI; BRANDI, 2011). Nesta perspectiva, a atividade antimicrobiana de várias espécies de plantas medicinais tem sido investigada de forma intensiva, com alguns resultados promissores contra bactérias multirresistentes. (GIBBONS, 2008; AYRES et al., 2008; BENKO-ISEPPON; CROVELLA, 2010; ZHANG et al., 2013).

O presente trabalho realizou um *screening* fitoquímico do extrato hidroalcoólico das cascas de *Ziziphus joazeiro* Mart, delineando seus limites toxicológicos para efeito hemolítico e a atividade antimicrobiana.

2 METODOLOGIA

2.1 Obtenção do Extrato

Para obtenção do extrato hidroalcoólico seco, o farmacógeno vegetal pulverizada (cascas do caule) foi obtido por compra direta em forma de pó no mercado central de Teresina-PI.

Após tamização, o material utilizado na obtenção dos extratos foi pesado em balança semi-analítica, (50 g da droga vegetal). As cascas foram colocadas em um béquer e submetidas a decocção em uma solução hidroalcoólica a 70%, 400 mL de Álcool etílico P.A. (Vetec-QF.LTDA) + 170 ml de água destilada, por um período de 10 minutos.

Após isso, submeteu-se o material a filtração e o filtrado obtido foi depositado em um evaporador rotativo à temperatura de 50°C para a evaporação completa do solvente. O processo de secagem à vácuo no rotaevaporador (50°C e pressão reduzida de -500mmHg ± -100mmHg) que durou cerca de 5h e 30 minutos. Em sequência, o balão contendo o

extrato seco foi submetido a resfriamento até atingir o equilíbrio térmico com o ambiente, sendo posteriormente o pesado em balança analítica, conferindo 280,30 g, e consequentemente 5,95 g (11,9% de rendimento) do extrato bruto hidroalcoólico (EBH).

2.2 Testes Fitoquímicos

O extrato hidroalcoólico da casca do juazeiro foi submetido a testes fitoquímicos baseados em reações colorimétricas e físico-químicas segundo Simões (2004). No entanto, algumas alterações foram realizadas visando adequações as condições do laboratório utilizado para realização dos testes.

2.2.1. Teste Para Saponinas

Reação da Espuma:

Em um tubo de ensaio colocou-se 3 mg do extrato seco e dissolveu-se em 5mL de água destilada. Em seguida, a solução foi agitada permanentemente por 3 minutos para a observação da formação de espuma, persistente e abundante durante um tempo mínimo de 30 minutos.

2.2.2. Teste Para Taninos

Reação com Cloreto Férrico:

Preparou-se 2 mL do extrato (100 mg.mL^{-1}) e adicionou-se 2 a 5 gotas de FeCl_3 a 5% em metanol. A mudança de coloração indica que o extrato contém o metabólito (Cor: azul – tanino hidrolisável ou Cor: verde – tanino condensado).

Reação de Gelatina:

Preparou-se 2 mL do extrato (100 mg.mL^{-1}) e adicionou-se 2 gotas de HCl diluído e solução de gelatina a 10% gota a gota (sem agitar). A mudança de coloração ou turvação com formação de precipitado indica que a reação é positiva para taninos.

2.2.3. Teste Para Flavonoides:

Reação com NaOH:

Em um tubo de ensaio adicionou-se aproximadamente 2 mg de extrato seco e acrescentou-se 1 mL de solução de NaOH 10%. Sendo a presença de coloração amarela sob iluminação ultravioleta, indicativa de flavonoides no extrato.

Reação de Shinoda:

Preparou-se 2 mL (100 mg.mL^{-1}) do extrato hidroalcoólico em um tubo de ensaio e acrescentou-se 2 fragmentos de magnésio metálico e 1 mL de HCl concentrado. Após repouso, aguardou-se o aparecimento ou não de uma coloração de rósea a vermelha.

2.2.4. Teste Cumarina:

Adicionou-se 3 mg do extrato seco a um beque e submeteu-se a aquecimento direto até a formação de um sublimado. Depois disso, dissolveu-se o sublimado em 0,5 mL



de metanol P.A e realizou-se a aplicação de 5 gotas sobrepostas em um papel. Feito isso, acrescentou-se 1 gota de solução alcoólica de KOH a 5% e aguardou-se a secagem. Depois de seco, gotejou-se na mesma mancha 1 gota de solução alcoólica de KOH a 5% e observou-se o resultado em uma câmara de UV.

2.2.5. Teste de Alcaloides:

Em um tubo de ensaio, solubilizou-se aproximadamente 2 mg do extrato seco em 1 mL de solução de ácido clorídrico 2%. A solução preparada foi transferida para um vidro de relógio, e adicionou-se duas gotas do reativo de precipitação para alcaloides (RGA) e aguardou-se a formação de precipitado.

2.2.6. Teste para Antocianidinas:

Foram adicionados 3 mL de solução extrativa em 6 tubos de ensaio, cada um com 3 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de HCl concentrado ao tubo 1, 1 mL de HCl a 5% no tubo 2, não adicionou-se nada no tubo 3, adicionou-se 1 mL de NaCl no tubo 4, 1 mL de NaOH a 50% no tubo 5 e 1 mL de NaOH a 5% ao tubo 6 e observou-se se ocorreu alteração na coloração dos tubos, sempre comparando com a cor do tubo 3.

2.3- Avaliação quantitativa da capacidade hemolítica

Esta metodologia permite avaliar o potencial da substância teste em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total. O extrato seco foi solubilizado em Dimetilsulfóxido P.A (DMSO) na proporção de 10 mg.mL⁻¹ e, em seguida foi realizada diluição seriada nas seguintes concentrações 5; 2,5 ; 1,25 mg.mL⁻¹. A solução de Hemácias foi cedida gentilmente pelo Laboratório de Cancerologia Experimental em solução isotônica. As hemácias foram diluídas para a proporção de 0,5% em solução isotônica de NaCl 0,85% + CaCl₂ 10mM, lavadas 3 vezes em centrífuga a 1500 rpm por 5 minutos. Após a última lavagem as hemácias foram novamente suspensas cuidadosamente para obter a solução eritrocítica de 2%. A incubação foi realizada em triplicata em tubos do tipo eppendorf® usando 100 µL de solução de eritrócitos + 92 µL de Solução isotônica + 8 µL do extrato dissolvido em DMSO. Como controle negativo foi utilizado o DMSO e como controle positivo o TRITON X-100. Após 1 hora de incubação sobre agitação permanente a 300 ciclos por minuto (26 ± 2°C), as soluções foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante recolhido e colocado em uma microplaca de 96 poços, sendo a leitura realizada em leitora de microplacas Polaris® utilizando filtro de 450 nm. Os resultados foram apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M.) e avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste multiparamétrico de Tukey utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (Intuitive Software for Science, San Diego, CA) considerando p <0,05.



2.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

2.4.1 Linhagens bacterianas testadas

Foram utilizadas cepas padrões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (NEW31).

2.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A solução estoque do extrato de *Z. joazeiro* foi preparada por dissolução de 29,7 mg do produto em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), portanto, iniciando com uma concentração inicial de 29.700 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (29,7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). A solução resultante foi diluída em água destilada esterilizada em uma quantidade suficiente para atingir uma concentração de 8.192 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) do extrato foram determinadas pelo ensaio de microdiluição em caldo BHI a 10% (JAVADPOUR et al., 1996). Um inóculo do crescimento bacteriano em placas de Petri contendo ágar nutriente (NA) foi transferido para um tubo falcon contendo 3,0 mL de Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Índia), o qual foi incubado a 37°C por 24 horas. A partir desta cultura em BHI, preparou-se uma suspensão bacteriana padronizada para uma densidade equivalente a 0,5 na escala Mac Farland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Soluções contendo 900 μL de BHI 10% foram colocadas em Eppendorfs de 1,5 mL e, em seguida, colocou-se 100 μL do inóculo preparado anteriormente. Essas soluções foram homogêneas e 100 μL dessas foram distribuídos nos poços de uma placa de 96 poços. Em seguida, foi realizada a microdiluição de 100 μL do produto-teste a 8.192 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, nos poços de A a G (concentrações 4,096 a 32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), tomando-se o cuidado de homogeneizar a solução por 3 vezes antes da transferência para o poço seguinte. No penúltimo poço (H) não foi adicionado o produto-teste, servindo este como controle positivo de crescimento bacteriano e no último apenas o meio de controle, servindo este como controle da esterilidade do meio (controle negativo). Em seguida as placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Para determinação da CIM, adicionou-se em todos os poços 20 μL de uma solução aquosa de resazurina sódica a 0,01% (m/v). As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e após este período procedeu-se a leitura, levando-se em consideração que a mudança de coloração de azul para rosa indicava a ocorrência de crescimento bacteriano devido à redução da resazurina (PALOMINO et al., 2002; MANN e MARKHAN, 1998).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise fitoquímica do EHB de *Z. joazeiro* encontram-se expressos na **Tabela 1.0**. Ao observar os dados contidos nessa tabela, observa-se a

presença de saponinas, taninos e cumarinas no extrato, que também foram relatados por Melo (2010).

TABELA 1.0 – Identificação fitoquímica de extrato hidroalcólico de *Ziziphus juazeiro* Mart.

Metabólito Secundário	Reação Encontrada
Saponinas	+++
Taninos	+++
Flavonoides	-
Cumarinas	+++
Alcaloides	+
Antocianidina	-

Legenda: (-) Ausência; (+) Fraca presença, (++) Presença moderada, (+++) Forte Presença

Fonte: Autoria própria

Utilizando a metodologia supracitada, os testes para determinação de saponinas foram realizados, e pode-se confirmar a presença delas através da formação de espuma persistente (> 30 min), além da intensa atividade hemolítica apresentada no teste de hemólise.

Segundo Manetti et al. (2010) normalmente, as saponinas se dissolvem em água dando origem a soluções afrógenas (espumantes), devido à sua ação tensoativa. Essa ação faz com que a porção polar das saponinas interajam com a água, enquanto a parte apolar tenta se afastar, dando origem as micelas persistentes. Tal ação também é responsável pela atividade hemolítica das saponinas, pois elas interagem com os esteróis constituintes da membrana dos eritrócitos, levando a formação de poros na membrana, o que provoca o aumento de sua permeabilidade (KARABALIEV; KOICHEV, 2003). Desta forma, esse processo provoca a lise dos eritrócitos e permite a saída da hemoglobina para o meio externo.

Em um estudo fitoquímico, Mendes (2010) comprovou que as saponinas triterpênicas são mais frequentes nos caules de *Z. juazeiro*. Tal fato leva a pressupor que o extrato obtido neste estudo deve conter uma concentração maior de saponinas triterpênicas do que as esteroidais, uma vez que o mesmo foi obtido a partir dos fragmentos de caule do juazeiro.

Ao analisar o resultado positivo para taninos encontrado na **Tabela 1.0**, após realização dos testes de reação do extrato com cloreto férrico e com gelatina, e os resultados de Nascimento (2012), pode-se observar uma consonância entre eles, uma vez que ambos apresentaram reação positiva para taninos nas amostras dos extratos testados. Somando-se a esse fato e contribuindo para a caracterização fitoquímica do *Z. juazeiro*.



Melo et al. (2012) encontrou frações de taninos presentes também em extratos obtidos dos frutos verdes e folhas desta árvore. Desta forma, pode-se perceber a ampla distribuição desses constituintes nas partes do juazeiro.

Os taninos podem ser divididos em duas categorias: derivados de esqueletos (C6-C1)_n, chamados de taninos hidrossolúveis, e derivados de esqueletos (C6-C3-C6)_n, chamados de taninos condensados ou proantocianidinas (MARIOT; BARBIERI, 2007). Os taninos apresentam solubilidade em água e peso molecular compreendido entre 500 e 300 Dalton, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides (MONTEIRO, 2005).

Devido a essa propriedade de formar complexos com proteínas e outras substâncias, os taninos têm sido alvo de grande estudo e emprego terapêutico devido sua capacidade de serem anti-inflamatórios e de ser antimicrobianos. Esta última ação pode ser explicada segundo Scalbet (1991), pela capacidade dos taninos de inibirem enzimas extracelulares desses microrganismos ou pela sua capacidade de interagir diretamente no metabolismo desses seres, interferindo na fosforilação oxidativa, levando-os a morte ou ainda pela sua capacidade de complexar com íon ferro privando a sua utilização. Essa capacidade de formar complexos com substâncias essenciais para o metabolismo dos micro-organismo, leva-os a morte por falta de substrato.

Em relação a presença de flavonoides, o extrato testado não apresentou resultado positivo (**Tabela 1.0**) para nenhuma das reações de identificação de flavonoides testadas, diferindo dos resultados encontrados por Silva (2009), onde os testes fitoquímicos mostraram a presença de alcaloides, antraquinonas, cumarinas agliconas, flavonoides, terpenoides e saponinas na casca e folha de *Z. joazeiro*. Este último resultado difere também de Melo (2010), que detectou a presença de flavonoides somente nos frutos.

Tais variações podem ser resultado das variações regionais, climáticas, estresse aplicado à planta, dentre outros fatores, que acabem gerando uma diferença quantitativa da produção de metabólitos secundários dentre as plantas do mesmo gênero. Segundo Kutchan (2001), os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais. Essa interação desses metabólitos com o ambiente pode ser explicada porque segundo Gomes e Lima (2014), alguns metabólitos estão envolvido em processos fisiológicos das plantas, principalmente, nos que respondem ao estímulo ambiental. Por isso, são afetados pelas condições do ambiente em que a planta se encontra.

Além disso, como os flavonoides estão relacionados com coloração de flores, folhas e frutos, e tem na planta uma função de defesa pela sua característica de apresentar um sabor adstringente. Por esse motivo, sua ausência no extrato testado não é de causar surpresa, pois o mesmo foi obtido a partir da casca de *Z. joazeiro*. Outro fator que pode ter contribuído para a ausência dos flavonoides, tendo em vista que eles foram encontrados em



alguns estudos, é o fato das cascas utilizadas para extração estarem há muito tempo armazenadas, o que pode ter provocado a perda de alguns constituintes com o tempo.

Outro teste fitoquímico realizado com o extrato obtido foi o de identificação da presença de cumarina, o que pode ser confirmada pela presença de fluorescência verde, devido ao rompimento do núcleo característico da cumarina e formação do ácido cis-o-hidroxicinâmico, que é o responsável pela fluorescência apresentada, caracterizando a reação como positiva para cumarinas (**Tabela 1.0**).

Ao analisar os resultados encontrados na literatura, pode-se observar o resultado também positivo encontrado por Silva (2008) que encontrou presença de cumarinas nas plantas adultas de *Z. joazeiro*. Tal resultado pode ser justificado pelos efeitos alelopáticos que podem ser mediados pela presença das cumarinas apontadas como inibidoras potentes tanto do crescimento de plantas como da germinação de sementes (OLIVEIRA, 2014) e por isso ocorre a ausência das cumarinas em plantas jovens.

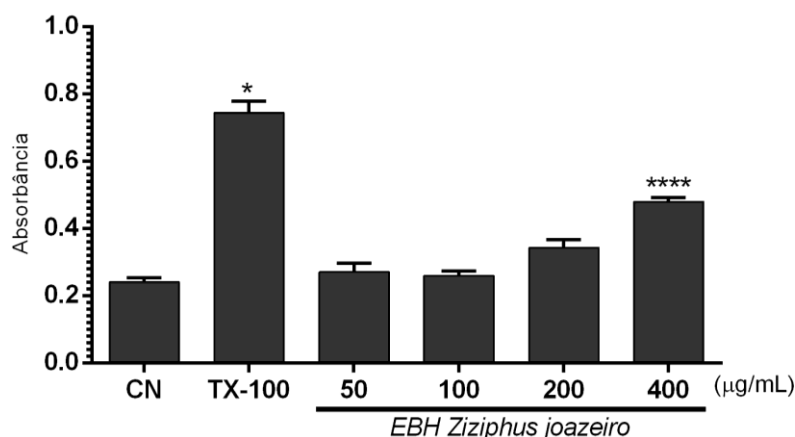
O teste para alcaloide apresentou um resultado que é indicativo de baixas concentrações do mesmo no extrato, pois ao realizar os procedimentos de início formou-se um precipitado de cor vermelho tijolo, mas logo em seguida a reação diminuiu de intensidade, portanto pode-se inferir que existam baixas concentrações de alcaloides no extrato.

Após fazer a análise fotoquímica dos extratos de várias partes da planta de *Z. joazeiro*, Sousa (2007) encontrou presença de alcaloides somente nos extratos das folhas do juazeiro. Tal resultado dá um indicativo da possibilidade de haver concentrações muito baixas do alcaloide no extrato testado neste trabalho, no entanto, como as amostras são diferentes e como os alcaloides são um grupo de metabólitos com maior variação entre plantas do mesmo gênero, então não se pode fazer nenhuma afirmação sobre esse resultado.

Em relação ao resultado apresentado na **Tabela 1.0** sobre a ausência das antocianinas, este pode ser justificado pelo fato de segundo Bruneton (2001), as antocianidinas serem produto do metabolismo geral dos flavonoides. Devido a isso, como não foram encontrados flavonoides no extrato, então não poderão ser formadas as antocianidinas, pois estas dependem da presença dos flavonoides para sua síntese.

No estudo quantitativo da capacidade hemolítica, para a proporção de extrato em cada amostra, foi utilizada uma concentração de 4% (8 μ L) do solvente orgânico aprótico DMSO, pois uma quantidade maior que 4% (8 μ L) na amostra iria provocar dano à membrana pelo próprio efeito do solvente, desta forma a porcentagem de 4% da concentração inicial do extrato é que representa a quantidade de extrato testada, sendo respectivamente (400;200;100;50 μ g.mL⁻¹). A análise estatística mostra que apenas a partir da maior concentração testada (400 μ g.mL⁻¹) é que o efeito hemolítico foi significativo, efeito este que desencadeou aproximadamente 63,88 \pm 2 % de hemólise (Figura 1).

Figura 1 – Resultado da leitura espectofotométrica dos sobrenadantes dos testes hemolíticos. Os resultados estão expressos pela média do Erro Padrão Médio (E.P.M) com avaliação de análise de variância ANOVA seguido de teste de Tukey considerando * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$



Fonte: Autoria própria

As saponinas são um grupo de compostos naturais associado a toxicidade através de sua capacidade de causar danos a membranas celulares especialmente a membranas dos eritrócitos. Esse efeito é resultante da sua capacidade de interagir com os componentes da membrana celular, principalmente com as moléculas de esteróis como o colesterol, induzindo uma deformação na membrana com consequente extravasamento do conteúdo intracelular (CRUZ et al., 2002; GLAUERT et al., 1962; KARABALIEV; KOICHEV, 2003; NUNES, 2015). Esse efeito foi observado com significância na maior concentração do extrato ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o que demarca que a partir dessa concentração o efeito biológico sobre membranas é influenciado pelo efeito tensoativo das saponinas presentes (CARVALHO; OLIVIERA; VALÉRIO, 2012), desta forma o teste forneceu um limite toxicológico para a utilização deste extrato, visto que efeitos biológicos com concentrações menores que a faixa capaz de provocar hemólise podem ser atribuídos a mecanismos independentes da ação de agressão de membranas e efeitos biológicos EHB em concentrações maiores podem ser devido ao stress de membrana provocado por tais compostos (PRETE, 2006).

Quanto à atividade antimicrobiana, os resultados dos ensaios para determinação da concentração inibitória mínima do de *Z. joazeiro* contra as linhagens testadas podem ser verificados na **Tabela 2**.

Os produtos naturais são considerados como tendo uma boa atividade inibitória quando apresentam $\text{CIM} \leq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, uma atividade inibitória moderada quando eles apresentam CIM variando de 100 a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e atividade inibitória considerada fraca quando eles apresentam CIMs de $500-1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e sem nenhuma atividade inibitória se apresentam CIMs $>1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (HOLETZ et al., 2002). De acordo com os critérios



utilizados no presente estudo (HOLETZ et al., 2002), o extrato não apresentou atividade inibitória contra as cepas testadas.

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) do EHB de *Ziziphus joazeiro* Mart. contra as linhagens testadas

CEPAS	CIM ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)			MÉDIA
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4096	4096	4096	4096
<i>C. albicans</i> NEWP31	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096	≥ 4096

A atividade antimicrobiana pode variar de acordo com a espécie, os diferentes métodos extrativos e a parte da planta utilizada, visto que a composição e concentração dos princípios ativos podem variar devido a esses fatores (JUSTO, 2008). Além disso, diferentes locais de coleta podem ter levado a resultados distintos dos encontrados na literatura, como também os diferentes métodos usados para detectar a atividade antimicrobiana. (SILVA et al., 2011; JUSTO, 2008; KUMAR et al., 2006)

Outras espécies de *Ziziphus* já tiveram sua atividade antimicrobiana estudada. AliShtayeh et al. (1998) observaram que *Ziziphus spina-christi* L. apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans*. Em estudo desenvolvido por Adamu et al. (2005), extratos aquosos de quatro espécies de *Ziziphus* (*Ziziphus abyssinica* Hochst., *Z. spina-christi*, *Ziziphus mauritiana* Lam. e *Ziziphus mucronata* Willd.), coletadas na Nigéria, mostraram atividade contra cepas de *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *E. coli*.

Em estudos realizados com o extrato aquoso das entrecascas e cascas de *Z. joazeiro*, observou-se atividade contra bactérias da microbiota oral associadas a doenças peridentais (ALVIANO et al., 2008) e inibição de 100% dos fungos testados, dentre eles *C. albicans* (CRUZ et al., 2007).

Schühly et al. (1999, 2000) realizaram testes antimicrobianos utilizando extrato diclorometano, para o qual se observou atividade apenas frente a bactérias Gram positivas, com destaque para *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*.

Lima (2008) observou que o extrato hexânico e extrato etanólico das partes aéreas de *Z. joazeiro* apresentaram atividade antimicrobiana significativa contra *S. aureus* e *E. coli*. Entretanto, o mesmo autor relata que o extrato aquoso das folhas não inibiu o crescimento dos microorganismos utilizados. A polaridade de substâncias antimicrobianas, segundo Silva (2008), é um fator importante, sendo que extratos mais apolares geralmente apresentam maior atividade contra um número maior de microorganismos.



Em outro estudo realizado, Kato et al. (1998) utilizaram a droga pulverizada, o extrato fluído e a fração saponínica das raspas-de-juá para teste de atividade antimicrobiana pela técnica de diluição seriada frente a *S. aureus*, *E. coli* e *Pityrosporum ovale*. A atividade antimicrobiana dessas amostras mostrou-se muito baixa.

Mendes (2010) realizou estudo da avaliação da atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Z. joazeiro* expostos a altas taxas de doses de radiação gama de ^{60}Co e observou que este não apresentou atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. coli* e nem antifúngica frente a *C. albicans*.

Em pesquisas similares, o extrato hidroalcoólico das folhas de *Z. joazeiro* reduziu a carga bacteriana de *S. aureus* mostrando ser eficiente contra o mesmo (LIMA, 2008). Já o extrato do fruto verde utilizado por Melo et al. (2012) apresentou atividade contra *S. aureus*, entretanto o fruto maduro não foi efetivo contra nenhuma das cepas testadas. Ainda referente ao mesmo estudo o extrato da casca apresentou atividade contra *C. albicans*, porém não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*, e o extrato obtido das folhas não apresentou atividade contra nenhuma das cepas testadas.

4.0 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico das cascas de *Ziziphus joazeiro* Mart. possui em sua composição fitoquímica saponinas, taninos e cumarinas. Atribui-se que em decorrência da possível presença de saponinas foi observada uma alta atividade hemolítica do EHB. Entretanto, não foi observada atividade antimicrobiana contra as cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

ADAMU, H. M.; ABAYEH, O. J.; AGHO, M. O.; ABDULLAHI, A. L.; UBA, A.; DUKKU, H. U.; WUFEM, B. M. An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 1-4, 2005.

ALISHTAYEH, M. S.; YAGHMOUR, R. M. R.; FAIDI, Y. R.; SALEM, K.; AL-NURI, M. A. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian área. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 3, p. 265-71, 1998.

ALVIANO, W. S.; ALVIANO, D. S.; DINIZ, C. G.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, C. S.; FARIAS, L. M.; CARVALHO, M. A.; SOUZA, M. M.; BOLOGNESE, A. M. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Arch Oral Biol**, v. 53, n. 6, p. 545-52, 2008.



AYRES, M.C.C.; BRANDÃO. M.S.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BENKO-ISEPPON, A.M.; CROVELLA, S. Ethnobotanical bioprospection of candidates for potential antimicrobial drugs from Brazilian plants: state of art and Perspectives. **Current Protein and Peptide Science**, v. 11, n. 3, p. 189-194, 2010.

BRUNETON, J.. Triterpenes and Steroids. In: BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry**, Medicinal Plants. Londres: Intercept Ltd, v.2, cap. X, p. 661-719, 1999.

BRUNETON, J. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2001.

CARVALHO, M. S.; OLIVIERA, D. A.; VALÉRIO, H. M. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon Urundeuva* Allemão. **Revista de Biologia e Farmácia**, Minas Gerais, v. 1, n. 1, p.1-8, set. 2012.

CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B.; DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, V. 69, n.3, P 827-834, 2014.

COHN, L. A.; MIDDLETON, J. R. A veterinary perspective on methicillin-resistant staphylococci. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 31-45, 2010.

CRUZ, M. C.; SANTOS, P. O.; BARBOSA, A. M. J.; MÉLO, D. L.; ALVIANO, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALVIANO, D. S.; TRINDADE, R. C. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409-412, 2007.

FABBRETTI, A.; GUALERZI, C. O.; BRANDI, L. How to cope with quest for new antibiotics. **FEBS Letters**, v. 585, p. 1673-1681, 2011.



GELATTI, L. C. et al. Sepse por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 458-460, 2009.

GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weakness and opportunities. **Planta Medica**, v. 74, n. 6, p. 594-602, 2008.

GLAUERT, A. M.; DINGLE, J. T.; LUCY, J. A. Action of saponin on biological cell membranes. **Nature**, v.196, p.952-955, 1962.

GOMES, A. D.; LIMA, R. A. Identificação de classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos de *Solanum acanthodes* hook e seu potencial fungicida sobre *Candida albicans* in vitro. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 2, p.736-744, 2014.

HARADA, K.; ASAI, T. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1-12, 2010.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, N.R.S.; SANCHES,N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS-FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

JAVADPOUR, M. M.; JUBAN, M. M; LO, W.C, et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

JUSTO, O.R.; MORAES, A.M.; BARRETO, G.P.M.; MERCADANTE, A.Z.; ROSA, P.T.V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.

KARABALIEV, M.; KOCHEV, V. Interaction of solid supported thin lipid films with saponin. **Sensors and Actuators B**, v.88, n. 1, p.101-105, 2003.

KATO, E. T. M.; OHARA, M. T.; NISHITAMI, M. Estudo da atividade antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Martius/Evaluation of antimicrobial property of *Ziziphus joazeiro* Martius. **Lecta- USF**, v. 16, n. 2, p. 75-84, 1998.



KUMAR, K.; CHOPRA, S. New drugs for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1465-1470, 2013.

KUMAR, V. P.; CHAUHAN, N. S.; PADH, H.; RAJANI, M. Search for antibacterial and antifungal agentes from selected Indian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 107, n. 2, p. 182-188, 2006.

KUTCHAN, T. M. **Alkaloid biosynthesis in plants**: Biochemistry, Cell Biology, Molecular Regulation, and Metabolic Engineerin Applications Plant Physiol. 2001, 125, 58.

LACAILLE-DUBOIS, M.A.; WAGNER, H. . H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, v.2, n. 4, p. 363-386, 1996.

LIMA, P. M. **Avaliação da atividade de extratos de folhas de *Momordica charantia*, *Auxemma oncocalyx* e *Ziziphus joazeiro* sobre bactérias e larvas de *Culex quinquefasciatus***. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2008.

LÓPEZ -CAMACHO,L.E.; GOMEZ, G.R.; TOBES, R.; MANRIQUE, M.; LORENZO, M.; GALVAN, B.; SALVARELLI, E.; MOATASSIM, Y.; E. et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumonia* outbreak including carbapenem and colistin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 632-636, 2014.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.

MANETTI, L.M.; TURRA, A.F.; TAKEMURA, O.S.; LAVERDE-JUNIOR, A.L. Avaliação da Atividade Hemolítica de *Bromelia Antiacantha* Bertol. (Bromeliaceae). **Arquivo de Ciências da Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 14, n. 1, p.43-47, 2010.

MANN, C. M.; MARKHAN, J. L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p.89-99, 2007.



MELO, M. S. F.; ROCHA, C. Q.; SANTOS, M. H.; CHAVASCO, J. M.; CHAVASCO, J. K. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* Mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 2, p. 43-51, 2012.

MELO, M. S. F. et al. Pesquisa de bioativos com atividade antimicrobiana nos extratos hidroetanólicos do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus joazeiro* mart. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 10, n. 2, p.43-51, out. 12.

MELO, M.S.F.; ROCHA, C.Q.; CHAVASCO, J.M.; CHAVASCO, J.M.; CHAVASCO, J.K. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de extrato do fruto, folha e casca de caule do *Zizyphus Joazeiro* Mart.** 2010. 49 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2010.

MENDES, F. O. **Avaliação da ação moluscicida e antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Zizyphus joazeiro* Mart. expostos a altas taxas de doses de radiação Gama de ⁶⁰Co.** 98 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p.892-896, out. 2005.

MORAR, M.; WRIGHT, G. D. The genomic enzymology of antibiotic resistance. **Annu Rev Genet**, v. 44, p. 25-51, 2010.

NASCIMENTO, A. M.; MARQUES, C. A.; TORRES, J. C. **ANÁLISE FITOQUÍMICA DE AMOSTRAS DE RASPA-DE-JUÁ (*Zizyphus joazeiro* Mart. – RHAMNACEAE).** Vi Jit, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p.13-15, dez. 2012.

NUNES, C. R. **Estudo Químico e avaliação antineoplásica de *Anona muricata* L.** 2015. 221 f. Tese (Doutorado) - Curso de Produção Vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2015.

OLIVEIRA, A.K.M.; PEREIRA, K.C.L.; MULLER, J.A.I.; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 32, n. 1, p.41-47, 2014.



OTTO, M. Basis of virulence in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Annual Review Microbiology**, v. 64, p. 143-162, 2010.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientia e Veterinariae**, v.34, n.1, p.45-48, 2006.

PRETE, P. S. C. **Solubilização de membranas eritrocitárias: análise quantitativa do efeito hemolítico induzido por surfatantes**. 2006. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, Campinas, 2006.

SCALBERT, Augustin. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 30, n. 12, p.3875-3883, 1991.

SCHÜHLY, W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O. New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*. **Planta Med**, v. 65, n. 8, p. 740-3, 1999.

SCHÜHLY, W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O. Novel Triterpene Saponins from *Zizyphus joazeiro*. **Helv Chim Acta**, v. 83, n. 7, p. 1509-16, 2000.

SILVA, J. B.; MOURA, M. F. V.; SILVA, T. R. C.; ARAÚJO, N. G.; BARBOSA, I. M. Caracterização físico-química e composição centesimal e mineral do fruto do juazeiro (*Zizyphus joazeiro* MART.). **Enciclopédia Biosfera**, v. 14, n. 25, p.299-310, 2017.

SILVA, J. L; COSTA, F. B.; NASCIMENTO, A. M.; COSTA, R. R. V.; SANTIAGO, M. M. Avaliação física e físico-química de frutos de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.) em diferentes estádios de maturação. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 11, n. 5, p.177-181,2016.

SILVA, M. D. **Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco**. 2008. 74 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008



SILVA, T. C. L.; ALMEIDA, C. C. B. R.; VERAS FILHO, J.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; AMORIM, E. L. C.; COSTA, E. P.; ARAÚJO, J. M. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 193-199, 2011.

SILVA, T. C. L. **Avaliação Comparativa de Cascas e Folhas de *Ziziphus joazeiro* Mart. (RHAMNACEAE) Em Relação aos Perfis Fitoquímico e Toxicológico e as Atividades Antioxidante e Antimicrobiana.** 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

SILVA, L. M. M.; MATOS, V. P., **Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul. - Caesalpinaceae) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart. - Rhamnaceae).** Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v. 20, n. 2, p. 263-269, 1998

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.(org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

SOUSA, T. S. Análise fitoquímica e ação antioxidante de *zizyphus joazeiro* e *zizyphus undulata*. IN: **Semana Universitária, 7. Encontro de Iniciação Científica Ciências Exatas e da Terra**, 16., 2007, Fortaleza. Resumo ..., Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2007.

STROMMENGER, B. et al. Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* towards increasing resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 616-622, 2014.

ZHANG, Y.; WANG, J.F.; DONG, J.; WEI, J.Y.; WANG, Y.N.; DAI, X.H.; WANG, X.; LUO, M.J. et al. Inhibition of α -toxin production by subinhibitory concentrations of naringenin controls *Staphylococcus aureus* pneumonia. **Fitoterapia**, v. 86, p. 92-99, 2013.

Received: 13 February 2017

Accepted: 31 July 2018

Published: 30 October 2018