

ESTUDO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULADOR DOS EXTRATOS METANÓLICO E HEXÂNICO DAS ENTRECASCAS DE *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (MALVACEAE)

STUDY OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY POTENTIAL OF THE METHANOLIC AND HEXANE EXTRACTS OF THE INNER BARKS OF *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (MALVACEAE)

Isis Oliveira Menezes¹
Valéria Christina Romualdo Calou²
Raimundo Luiz Silva Pereira³
Cristina Rodrigues dos Santos Barbosa⁴
Débora Feitosa Muniz⁵
Saulo Relison Tintino⁶
Henrique Douglas Melo Coutinho⁷
João Tavares Calixto Júnior⁸
Aracélio Viana Colares⁹

RESUMO

A resistência microbiana é um dos mais relevantes problemas de saúde pública a nível global, que estimula a pesquisa por novas alternativas farmacológicas. *Luehea paniculata* Mart. & Zucc, também conhecida como açoita-cavalo é uma planta amplamente utilizada no combate a diversas enfermidades, dentre elas, acometimentos por cepas fúngicas e/ou bacterianas. O presente estudo visou determinar as atividades antibacteriana e modulatória dos extratos metanólicos e hexânicos da entrecasca de *L. paniculata* frente a bactérias gram positiva e negativas de cepas padrões e multirresistentes pelo método de microdiluição em caldo para determinação de Concentração Inibitória Mínima e modulação de aminoglicosídeos: gentamicina e amicacina. Observou-se que os extratos das entrecascas de *L. paniculata* isolados não evidenciaram atividade antibacteriana, entretanto, na atividade nos testes de modulação o extrato metanólico, foi capaz de causar danos as cepas multirresistentes de: *S. aureus* quando associado com amicacina e *E. coli* e *P. aeruginosa* com gentamicina. Quanto ao extrato hexânico, associado com a amicacina mostrou-se sinergismo com cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, e com a gentamicina mostrou-se efetividade contra *P. aeruginosa*. Diante dos resultados obtidos, concluímos que os extratos isoladamente não demonstraram atividades antibacterianas significativas. O mesmo não ocorrendo quando combinados com antibióticos sintéticos e em especial na *S. aureus*, que devido ao efeito sinérgico já citado, promoveu inibição melhor evidenciada. Portanto, estudos futuros são necessários para o aumento de informações sobre a *Luehea paniculata*, além de testes de citotoxicidade celular e seus fracionamentos por mostrar-se promissora como agente potencializador de antimicrobianos.

Palavras-chave: Agentes Antibacterianos. *Luehea paniculata*. Modulação

ABSTRACT

¹ Centro Universitário de Juazeiro do Norte – UNIJUAZEIRO e Programa de Pós-Graduação em Química Biológica – Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE. E-mail: isiso.menezes@outlook.com

² Laboratório de Microbiologia/ Centro Universitário de Juazeiro do Norte – UNIJUAZEIRO, Juazeiro do Norte-CE.

⁴ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular/ Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato-CE.

⁵ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular/ Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato-CE.

⁶ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular/ Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato-CE.

⁷ Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular/ Universidade Regional do Cariri - URCA, Crato-CE.

⁸ Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato-CE.

⁹ Centro Universitário de Juazeiro do Norte – UNIJUAZEIRO, Juazeiro do Norte-CE.

Microbial resistance is one of the most relevant public health problems globally, which stimulates research for new pharmacological alternatives. *Luehea paniculata* Mart. & Zucc, also known as açoita-cavalo is a plant widely used to combat various diseases, among them, those caused by fungal and/or bacterial strains. The present study aimed to determine the antibacterial and modulatory activities of methanolic and hexane extracts of inner barks of *L. paniculata* against gram positive and negative bacteria of standard and multidrug-resistant strains by the broth microdilution method for determination of Minimum Inhibitory Concentration and modulation of aminoglycosides: gentamicin and amikacin. The inner-barks extracts of *L. paniculata* isolated showed no antibacterial activity; however, in the activity in the modulation tests, the methanolic extract was able to cause damage to the multidrug-resistant strains of: *S. aureus* when associated with amikacin and *E. coli* and *P. aeruginosa* with gentamicin. As for the hexane extract, associated with amikacin, synergism was shown with strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, and with gentamicin, was shown to be effective against *P. aeruginosa*. In view of the results obtained, the extracts alone did not demonstrate significant antibacterial activities. The same does not occur when combined with synthetic antibiotics and especially in *S. aureus*, which, due to the synergistic effect already mentioned, promoted better evidenced inhibition. Therefore, future studies are needed to increase information on *Luehea paniculata*, in addition to cellular cytotoxicity tests and its fractionations for showing promise as an antimicrobial potentiating agent.

Keywords: Antibacterial Action. *Luehea paniculate*. modulation.

INTRODUÇÃO

A resistência de microrganismos a antimicrobianos é um dos mais relevantes problemas de saúde pública a nível global, pois, mesmo sendo um fenômeno natural, vem sofrendo expansão exacerbada por contribuição de utilização inadequada de medicamentos convencionais na antibioticoterapia, enquanto que antigamente estes mesmos medicamentos eram capazes de curar infecções que tinham 100% de mortalidade. Aliada ao agravamento, a ANVISA criou em maio de 2017 o Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos, motivada pelo desafio da saúde pública^{1,2,3,4,5}.

O Brasil possui rica biodiversidade, assim, o uso de plantas medicinais é amplamente difundido para o tratamento de enfermidades através de conhecimento etnobotânico, clínico e farmacológico, adquiridos através de estudos específicos para cada planta e suas finalidades terapêuticas e tóxicas^{6,7,8}.

A espécie *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae), é popularmente conhecida como açoita-cavalo, cacueti, estriveira. As cascas do açoita-cavalo são usadas como adstringente, antipirético, antidiarreico e estomacal, assim como para danos gastrointestinais e hepáticos; as folhas para combater processos inflamatórios, afecções do aparelho respiratório como bronquites e como atividade diurética. A utilização das raízes é para atividade anti-inflamatória^{9, 10}.

Infecções bacterianas com recidivas cada vez mais frequentes vêm estimulando a pesquisa contínua de novas drogas como estratégia para o alcance de uma terapia antimicrobiana mais econômica no combate a doenças para países em desenvolvimento^{11, 12}.

Nesse sentido, o presente trabalho avaliou a atividade antibacteriana e moduladora dos extratos metanólico e hexânico das entrecascas de *Luehea paniculata* obtida no município Lavras da Mangabeira – Ce frente bactérias gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) como forma de contribuir na obtenção de informações científicas a respeito de atividades promovidas por produtos naturais em associação com drogas antimicrobianas comerciais.

MÉTODO

Local da pesquisa

A preparação dos extratos e sua prospecção fitoquímica foram realizadas nos Laboratórios de Tecnologia de Alimentos e Microbiologia do Centro Universitário de Juazeiro do Norte (UNIJUAZEIRO).

Os testes de atividade antibacteriana (CIM) e modulação foram feitos no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA).

Material vegetal

A entrecasca de *Luehea paniculata* Mart e Zucc foi coletada em 18 de janeiro de 2018 no município de Lavras da Mangabeira, mesorregião do Centro-Sul do Ceará, Nordeste do

Brasil sob as seguintes coordenadas geográficas: (06° 72' 2432" S e 38° 97' 7396" W).

Foi coletado o material botânico e confeccionadas exsicatas que foram depositadas no Herbário Prisco Bezerra, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, conforme numeração descrita na tabela 1.

Tabela 1: Espécies vegetais e partes utilizadas nos testes antiparasitário e citotóxico.

Espécie	Família	Parte utilizada	Exsicata
<i>Luehea paniculata</i> Mart. & Zucc.	Malvaceae	Entrecasca	54.641

Preparação dos extratos metanólicos e hexânico da entrecasca de *Luehea paniculata*

Na preparação dos extratos metanólico e hexânico, as entrecascas coletadas foram secas e trituradas para aumento da superfície de contato. Colocou-se 424g em recipiente de vidro com tampa submersas em 1L de solvente (volume suficiente para submergir todo o material vegetal) por 72h. O processo foi realizado para cada solvente separadamente. Após esse período, o efluente foi filtrado em algodão para separação dos resíduos sólidos e concentrados em condensador rotativo a vácuo e banho-maria obtendo-se 8,15g do extrato metanólico e 2,32g do hexânico. Para os testes foram utilizadas soluções preparadas a partir dos extratos sob uma concentração de 0,1 mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetil sulfoxido), em seguida diluídos com água destilada para uma concentração de 1024 µg/mL.

Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos foram utilizados com a finalidade de detectar a presença de metabólitos secundários como: heterosídeos, saponinas, taninos, flavonoides, esteróides, triterpenos, cumarinas, quinonas, ácidos orgânicos e de alcaloides, os quais se basearam na observação visual das mudanças de cor ou formação de precipitados após a adição de reagentes específicos¹³.

Material bacteriano

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram manuseadas as linhagens padrão de bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; multirresistentes das espécies *E. coli* EC06, *S. aureus* SA10 e *P. aeruginosa* PA24. Antes dos ensaios, as culturas de bactérias anteriormente mantidas a 4°C em *Heart Infusion Agar* – HIA foram repassadas para o meio HIA e incubadas a 35°C por 24 horas. As linhagens bacterianas foram ativadas e inoculadas em *Brain Heart Infusion* - BHI na concentração recomendada pelo fabricante, e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Suspensões com crescimento bacteriano foram diluídas em BHI em concentração de 10% até a obtenção de 10⁵céls/mL comparando-se com a escala de McFarland¹⁴.

Teste de atividade antibacteriana

A CIM (concentração inibitória mínima) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentou uma concentração de 10⁵ UFC/mL em placas de microdiluição com 96 poços, com diluições em série. Em cada poço foi adicionado 100µL de solução de cada extrato. As concentrações finais variaram entre 512 – 8 µg/mL. As placas preenchidas foram incubadas a 36°C por 24 horas com testes realizados em triplicata¹⁵.

Para evidenciar a CIM da solução frente as linhagens bacterianas, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, adicionou-se 20 µL da solução indicadora em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indica o crescimento bacteriano, portanto, a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano é evidenciada pela cor azul inalterada¹⁶.

Drogas

Os antimicrobianos utilizados foram Gentamicina e Amicacina obtidos pela Sigma ChemicalCo (St. Louis, EUA).

Modulação e leitura dos ensaios

A partir dos dados obtidos nos testes de microdiluição foi feito o teste de atividade moduladora por contato direto em que os extratos foram misturados em caldo BHI 10 % em concentrações subinibitórias com concentração da solução de

extrato reduzida 8 vezes (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril de forma a obter-se uma solução estoque de 1024 µg/mL. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura continha a suspensão bacteriana diluída (1:10). Para os controles foram utilizados os antibióticos padrões amicacina, e gentamicina cujas concentrações finais variaram entre 512 µg/mL – 8,0 µg/mL. Os testes foram efetuados em triplicata e as placas incubadas a 35°C durante 24 horas.^[17]

A leitura foi evidenciada pelo uso de Resazurina, como citado anteriormente no teste de determinação da CIM.

Análise Estatística

Os dados obtidos foram expressos pela média geométrica e o desvio padrão submetido à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de significância Bonferroni, considerando diferença significativa para quando $p < 0,001$, utilizando o software GraphPad Prism6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se 8,15g do extrato metanólico e 2,32g do hexânico através de 424g de entrecascas de *Luehea paniculata* utilizados para extração dos compostos.

Na prospecção fitoquímica detectou a presença de taninos flobabênicos, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, flavononas e alcaloides (Tabela 2).

Os extratos metanólicos e hexânico obtiveram o mesmo resultado de $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para as atividades antibacterianas frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 3).

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica de extratos metanólicos e hexânicos de *L. paniculata*

EXTRATOS	METABOLITES															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
EMLP	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
EHLF	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-

1 – Fenóis; 2 – Taninos Pirogálicos; 3 – Taninos Flobabênicos; 4 – Antocianinas; 5 – Antocianidinas; 6 – Flavonas; 7 – Flavonóis; 8 – Xantonas; 9 – Chalconas; 10 – Auronas; 11 – Flavononóis; 12 – eucoantocianidinas; 13 – Catequinas; 14 – Flavononas; 15 – Alcalóides; 16 – Terpenos; (+) presença; (-) ausência. EMLP – Extrato Metanólico de *Luehea paniculata*; EHLF – Extrato Hexânico de *Luehea paniculata*.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos metanólico e hexânico de *L. paniculata*.

Bactérias:	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EMLP	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$
EHLF	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$	$\geq 1024 \mu\text{g/mL}$

EMLP – Extrato Metanólico de *Luehea paniculata*; EHLF – Extrato Hexânico de *Luehea paniculata*.

Os extratos apresentaram resultados significativos na ação com antibióticos frente as bactérias, havendo principalmente modulações de perfil sinérgico. Com a *Staphylococcus aureus* verificou-se uma modulação sinérgica com amicacina para ambos extratos. Para a *Escherichia coli* obteve-se um resultado sinérgico para a gentamicina com o extrato metanólico. Na modulação com a *Pseudomonas aeruginosa* observou-se sinergismo tanto para o extrato metanólico e a gentamicina, como para o extrato hexânico com ambos antibióticos.

O estudo das atividades antibacterianas é de grande interesse científico pois configuram-se como uma alternativa relacionada a diminuição de resistência, uma vez que a nova

apresentação, assim como a variedade de insumos naturais é tão grande, que dificultaria a adaptabilidade bacteriana^{17, 18, 19}.

As plantas da espécie *Luehea* evidenciam a utilização popular para diversas finalidades e indicam potencial para o desenvolvimento de drogas antibacterianas pela presença de metabólitos secundários listados na literatura e expressos na prospecção fitoquímica: flavonoides, taninos e alcalóides.^[20]

A capacidade dos produtos naturais em modificar a ação de antimicrobianos pode ser comprovada a partir de estudos que demonstram a associação de drogas sintéticas e extratos de plantas. Amicacina e gentamicina, da classe dos aminoglicosídeos, atuam bloqueando a subunidade 30s do ribossomo, os metabólitos presentes nos extratos podem ter modulado a entrada desse antibiótico na bactéria auxiliando

na ligação do aminoglicosídeo à superfície da célula bacteriana, facilitando a entrada e ação contra a bactéria^{5, 20, 21, 22, 23}.

A presença de taninos indica que o produto possui capacidade de complexação com íons metálicos e outras moléculas; os flavonoides destacam-se na ação antimicrobiana

pela sua predisposição por formar complexos com proteínas solúveis que se vinculam a parede celular bacteriana sendo capazes de provocar rompimento na membrana plasmática dos microrganismos com consequência lise e morte; os alcaloides são potencializadores da função antibiótica por interagir com a parede celular e/ou DNA^{21, 22, 23, 24, 25, 26}.

Gráfico 1. Atividade moduladora do extrato metanólico de *L. paniculata* (EMLP) com antibióticos comerciais, amicacina e gentamicina, frente a cepas de bactérias multirresistentes.

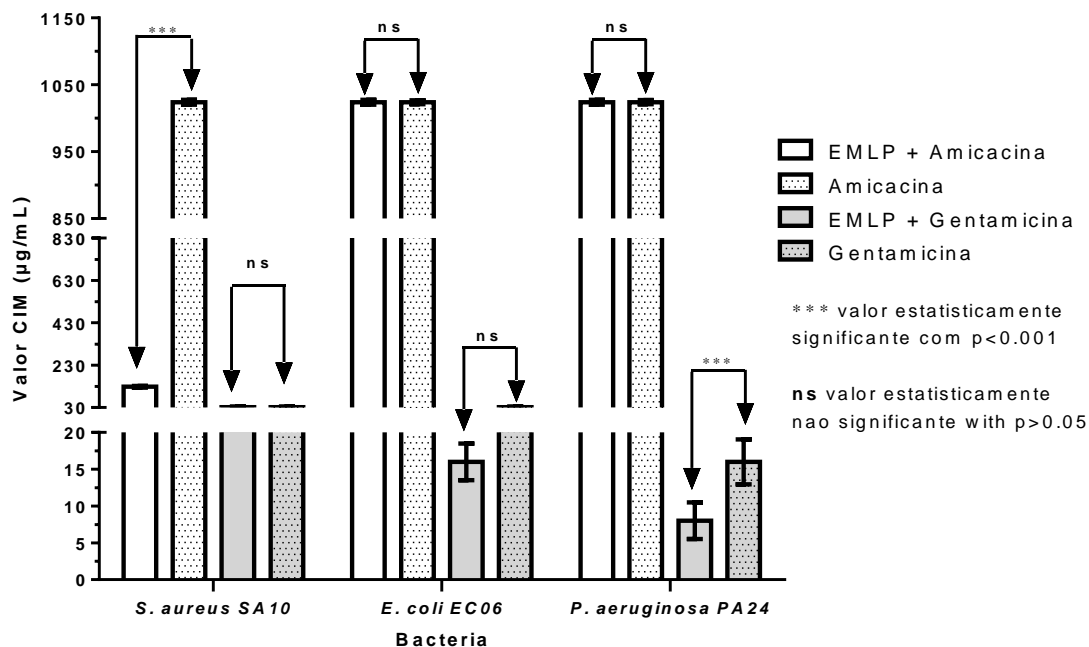
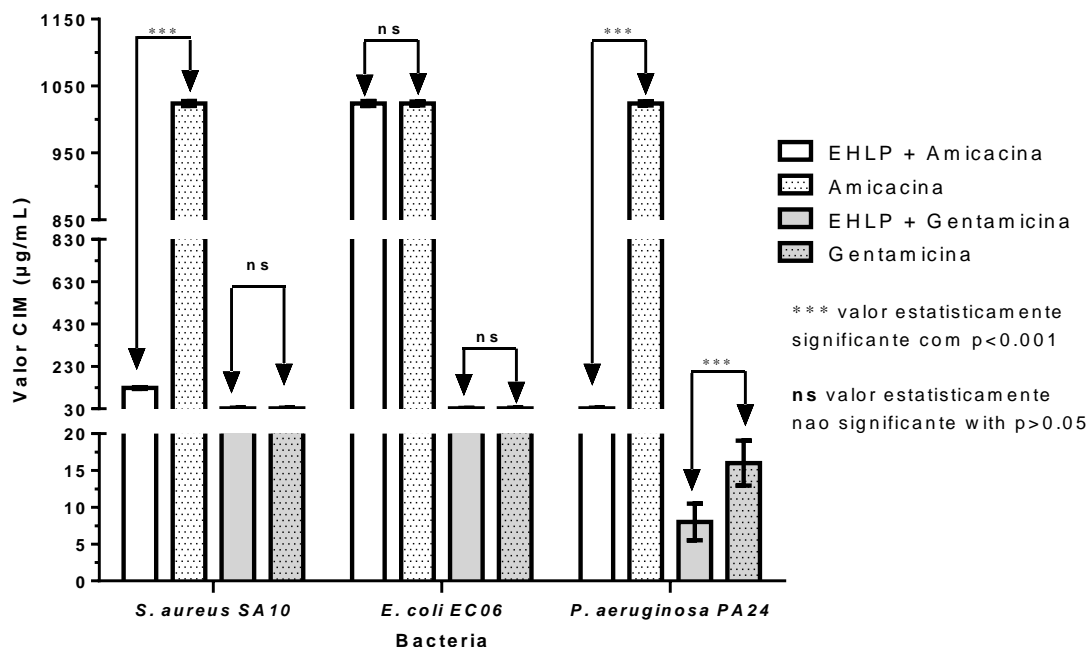


Gráfico 2. Atividade moduladora do extrato hexânico de *L. paniculata* (EHLP) com antibióticos comerciais, amicacina e gentamicina, frente a cepas de bactérias multirresistentes.



CONCLUSÃO

Os extratos das entrecasas de *L. paniculata* isolados não evidenciaram atividade antibacteriana nas concentrações testadas, entretanto, nos testes de modulação evidenciou-se

que ambos os extratos foram capazes de causar danos a maioria das cepas multirresistentes testadas em especial a de *S. aureus*. Dessa forma, esses resultados são de grande relevância por proporcionar informações que podem subsidiar

futuras metodologias com relação à terapia de infecções frente às cepas bacterianas multirresistentes.

REFERÊNCIAS

- 1 Grillo VT, Gonçalves TG, Júnior JD, Paniágua NC, Teles CB. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 2013 Apr 13;34(1):117-23.
- 2 Alencar LC, Chaves TP, Santos JS, Nóbrega FP, Araújo RM, Santos VL, Felismino DC, Medeiros AC. Efeito modulador do extrato de plantas medicinais do gênero *Spondias* sobre a resistência de cepas de *Staphylococcus aureus* à Eritromicina. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2015 Sep 23;36(1).
- 3 Araújo S, Silva I, Tação M, Alves A, Henriques I. Resistência bacteriana a antibióticos em vegetais e águas de irrigação: um problema de saúde pública. *Revista Captar: Ciência e Ambiente para Todos*. 2016 Jan 14;6(1).
- 4 dos Santos Sales V, do Nascimento EP, Monteiro ÁB, da Costa MH, de Araújo Delmondes G, Soares TR, Tintino SR, Sobreira FR, de Souza Rodrigues CK, da Costa JG, Coutinho HD. Modulação in vitro da atividade antibiótica pelo óleo essencial dos frutos de *Piper tuberculatum* Jacq. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2017 Jan 31;22(1).
- 5 ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Plano de Ação da Vigilância Sanitária em Resistência aos Antimicrobianos. Brasil, 2017.
- 6 Matias EF. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana a aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (velame), *Ocimum gartissimum* (alfavaca) e *Cordia verbenacea* DC. (erva-baleeira). Crato, CE: Universidade Regional do Cariri-URCA. 2010.
- 7 Maciel MA, Gomes FE, Pinto AC, Cólus IM, Magalhães NS, Grynberg NF, Echevarria A. Aspectos sobre produtos naturais na descoberta de novos agentes antitumorais e antimutagênicos.
- 8 Simões CM, Schenkel EP, de Mello JC, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed Editora; 2016 Nov 1.
- 9 Tanaka JC, Silva CC, Dias Filho BP, Nakamura CV, Carvalho JE, Foglio MA. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). *Química Nova*. 2005 Oct 1.
- 10 Montovani PA, Júnior AC, Moraes A, Fiorentini F, Meinerz C. Atividade antimicrobiana do extrato de Açoiá-cavalo (*Luehea* sp.). *Cadernos de Agroecologia*. 2009 Dec 31;4(1).
- 11 Calixto Júnior JT, Morais SM, Martins CG, Vieira LG, Morais-Braga MF, Carneiro JN, Machado AJ, Menezes IR, Tintino SR, Coutinho HD. Phytochemical analysis and modulation of antibiotic activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in multiresistant clinical isolates of *Candida* spp. *BioMed research international*. 2015;2015.
- 12 Cunha SB. Investigação de componentes químicos da casca do caule de *Luehea divaricata* martius (malvaceae) e suas potenciais atividades biológicas. 2016
- 13 Matos F. J. D. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: edições UFC, 2009.
- 14 Wayne PA. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement. M100-S12 NCCL.2002. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-0711-3-1>
- 15 Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, McLaughlin ML. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of medicinal chemistry*. 1996 Aug 2;39(16):3107-13.
- 16 Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002 Aug 1;46(8):2720-2.
- 17 Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop protection*. 2003 Feb 1;22(1):39-44.
- 18 Gonçalves JM. Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano.
- 19 Coutinho HD, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Júnior JP. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC complementary and alternative medicine*. 2009 Dec;9(1):13.
- 20 Calixto Júnior JT, Morais SM, Colares AV, Coutinho HD. The Genus *Luehea* (Malvaceae-Tiliaceae): Review about Chemical and Pharmacological Aspects. *Journal of pharmaceuticals*. 2016;2016.
- 21 Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2001 May 1;53(5):583-600.
- 22 Ho KY, Tsai CC, Huang JS, Chen CP, Lin TC, Lin CC. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2001 Feb 1;53(2):187-91.

- 23 Jana S, Deb JK. Molecular targets for design of novel inhibitors to circumvent aminoglycoside resistance. *Current Drug Targets*. 2005 May 1;6(3):353-61.
- 24 Coutinho HD, Costa JG, Lima EO, Falcao-Silva VS, Siqueira-Junior JP. Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *in vivo*. 2009 Mar 1;23(2):287-9.b
- 25 Tintino SR, Sobra MA, de Sousa Andreza R, Alves EF, Cruz AJ, de Sousa AT, de Moraes Oliveira CD, Leandro LM, de Aquino PE, de Lima LF. Atividade antibacteriana e moduladora *in vitro* de extrato metanólico e hexânico de beta *vulgaris* spp.(Linnaeus). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2015 Oct 14;21(1).
- 26 Tintino SR, de Carvalho Neto AA, Menezes IR, Oliveira CD, Coutinho HD. Atividade antimicrobiana e efeito combinado sobre Drogas antifúngicas e antibacterianas do fruto de *Morindacitrifolia* L. *Acta Biológica Colombiana*. 2015 Sep 1;20(3):193-200.