



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
CAMPUS I  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA SAÚDE  
CURSO DE ODONTOLOGIA**

**CIBELLE SOUSA SILVA ALEIXO**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE DO  
EXTRATO HIDRALCÓOLICO DA *Guapira graciliflora* (Mart.)**

**CAMPINA GRANDE  
2015**

**CIBELLE SOUSA SILVA ALEIXO**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE DO  
EXTRATO HIDRALCÓOLICO DA *Guapira graciliflora* (Mart.)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Programa de Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Odontologia.  
Área de concentração: Microbiologia.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edja Maria Melo de Brito Costa

**CAMPINA GRANDE  
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

A366a Aleixo, Cibelle Sousa Silva.

Avaliação do potencial antimicrobiano e toxicidade extrato hidroalcolólico da Guapira Graciliflora (Mart.) [manuscrito] / Cibelle Sousa Silva Aleixo. - 2015.

16 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Departamento de Odontologia".

1. Plantas medicinais. 2. Ação antimicrobiana. 3. Candida albicans. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

CIBELLE SOUSA SILVA ALEIXO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E TOXICIDADE DO EXTRATO  
HIDRALCÓOLICO DA *Guapira graciliflora* (Mart.)

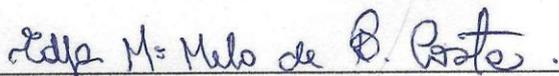
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Programa de Graduação em Odontologia da  
Universidade Estadual da Paraíba, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Odontologia.

Área de concentração: Microbiologia.

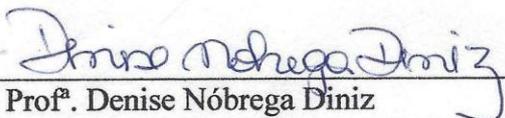
**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edja Maria Melo de  
Brito Costa

Aprovada em: 09/09/2015.

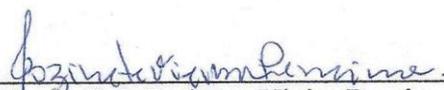
BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Edja Maria Melo de Brito Costa (Orientadora)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof<sup>a</sup>. Denise Nóbrega Diniz  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jozinete Vieira Pereira  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

*Aos meus pais, Lourival e Marluciete e minha irmã  
Laryssa , pelo nobre amor que nos une, DEDICO.*

## AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata à Deus, pelo dom da vida, por ser alicerce da minha história e permitir que eu alcance meus objetivos. Meu divino pai eterno, sou feliz por crer num Pai tão bondoso, que olha por mim como filha querida.

Aos meus amados pais Lourival Aleixo Fernandes e Marluciete de Sousa Silva Aleixo, por cada gota de suor derramado para que eu chegasse até aqui, por nunca medirem esforços pra nada que eu preciso, por abdicarem de seus sonhos e vontades para realizarem os meus, por serem mais que pai e mãe e serem também meus melhores amigos, confidentes e companheiros fiéis. Meu muito obrigada pelo amor sem limites que me faz sentir a filha mais amada do mundo, por tanta dedicação, por acreditarem em mim quando algumas vezes o mundo não acreditou. Vocês são donos de todas as minhas conquistas, tudo é por vocês e para vocês. Eu amo vocês!

A minha irmã Laryssa de Sousa Silva Aleixo, pelo companheirismo inigualável, por ser por mim até o fim e não medir esforços para me ajudar, esta vitória é nossa. Eu amo você!

Ao meu namorado Renan Caldeira de Andrade que esteve comigo durante esta caminhada, sempre com uma dedicação e amor sem limites, pela paciência nos momentos de estresse, pelas palavras de conforto e força, por ser além de namorado um grande amigo, companheiro fiel de todas as horas e trazer mais alegria para os meus dias.

A todos os meus familiares que sempre me deram força para perseverar e continuar, uns mais próximos, outros mais distantes, porém o mesmo desejo que eu vencesse sempre. Amo vocês.

As amigas que ganhei em Patos-PB durante o início da minha graduação na FIP, Sabrina, Elyssama, Rayanne, Hortência, Rayssa, Paloma e Ana Cláudia. Minha eterna gratidão por cada dia que passamos juntas, por nunca deixar que a distância quilométrica nos separasse, por terem sido tão boas, amáveis, pacientes comigo. E por me fazerem lembrar todos os dias o quanto somos importantes uma na vida da outra. Amo vocês.

Aos amigos que a UEPB me deu Thays, Rayane, Rayssa, Rafael, Lillian, Mateus, Renan, Kívia, Andrea, Neto e aos demais pelas tantas turmas que passei, obrigada pelo carinho com que me receberam, pela atenção, por dividirem suas histórias, problemas e alegrias. Por terem sido não só colegas de curso, mas uma família, onde nem todos os dias eram bons, mas foram mais fáceis com vocês do lado.

As minhas amigas que carrego por toda vida Rhyanne, Hilda, Flávia, Marília, Ariane, Jéssica e nossa princesa Maria Luiza, por sonharem comigo que este dia chegaria desde que

éramos crianças, por estarem sempre presente na minha vida, pela confiança, nossas tantas aventuras que tornam a vida mais leve e por todas as tristezas e alegrias compartilhadas, vocês são especiais.

A minha dupla Thiago Muniz, pela paciência, companheirismo, cuidado, caronas, confiança, amizade, pelos ensinamentos em tudo durante a graduação. Vou sentir saudades dos nossos cafés na praça de alimentação.

A minha querida orientadora Edja Maria, por acreditar em mim, por sua dedicação com tudo que faz, por puxar minha orelha quando as coisas não saiam muito bem, mas por sempre ter uma palavra amiga e que me motivasse a seguir e conseguir. Seus ensinamentos serão sempre guias para minha vida, muito obrigada.

As amigas que fiz na Iniciação Científica Larissa e Priscila, muito obrigada pelas caronas, pelas palavras, pelo companheirismo de sempre, por compartilharem comigo momentos de sufoco mas também de alegrias, o trabalho se tornava divertido quando estávamos juntas, vocês são dez! Eveline, por tudo que foi vivido e compartilhado. Erika e Carol, muito obrigada por cada ensinamento, pela paciência em explicar e se preocupar se eu entendia ou não, por confiarem e passar segurança em todas as tarefas, pela competência com que fazem tudo, nossas viagens e caronas, por fazerem as coisas parecerem mais fáceis, vocês são grandes exemplos!

Ao LABDEM, por contribuir com esta pesquisa, as pessoas que prontamente me ajudaram, esclarecendo as dúvidas e dividindo tarefas e experiências.

Aos professores que passaram por toda minha formação, sem vocês eu não teria chegado até aqui, obrigada pelos grandes ensinamentos, não só científicos, mas também para a vida.

Aos funcionários, obrigada pelo carinho e dedicação que tem pelos alunos.

Aos pacientes, por acreditarem na minha capacidade e contribuírem para minha formação.

*" E não importa como começa. O importante é como termina,  
e eis que aqui se inicia um novo capítulo de uma nova história."*  
**(Autor desconhecido)**

Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana e toxicidade do extrato da *Guapira graciliflora* (Mart.)

Cibelle Sousa Silva Aleixo\*

## RESUMO

As plantas medicinais constituem uma rica fonte para o desenvolvimento de novos medicamentos, especialmente de antimicrobianos, seja de uso tópico e/ou sistêmico. Dentre essas plantas utilizadas na medicina tradicional, destaca-se a *Guapira graciliflora* (Mart.), mais conhecida popularmente como João-mole, utilizado comumente agente como cicatrizante. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana e a toxicidade *in vitro* do extrato hidroalcolólico das folhas da *Guapira graciliflora* (Mart.); e determinou seu perfil fitoquímico. O extrato hidroalcolólico foi obtido pelo processo de maceração, por cinco dias, utilizando o álcool etílico 50% como solvente. O extrato foi submetido ao processo de evaporação à vácuo e liofilização. O potencial antimicrobiano foi analisado através da técnica da microdiluição em caldo, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida/Bactericida Mínima (CFM/CBM), frente às cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC11775 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. A toxicidade do extrato foi analisada pelo método da hemólise e a análise fitoquímica por cromatografia de camada delgada (CCD). O extrato da *G. graciliflora* apresentou alto potencial antifúngico (CIM=0,250 µg/mL) frente a *C. albicans*; inexpressiva atividade antibacteriana (CIM >2000 µg/mL); e não apresentou hemólise acima de 50% em nenhuma das concentrações testadas (1, 2, 4, 8, 16 mg/mL). A análise fitoquímica identificou grupos compostos por flavonóides, sendo a rutina o composto majoritário. A *G. graciliflora* apresentou atividade antimicrobiana apenas para a cepa de *C. albicans* e sua toxicidade frente às hemácias foi considerada baixa. Este biomonitoramento inicial sinaliza um possível potencial anti-candida do extrato da *G. graciliflora*, sendo necessários outros estudos, pré-clínicos e clínicos, para comprovação de sua eficácia e segurança, com vistas ao desenvolvimento de uma nova formulação para o combate ou tratamento da candidose.

**Palavras-Chave:** Plantas medicinais. Produtos com ação antimicrobiana, *Candida albicans*.

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas são causadas por microrganismos patogênicos ou oportunistas como bactérias, vírus, parasitas e fungos que podem ser transmitidos de forma direta ou indireta de um indivíduo para o outro (ARAÚJO, 2014). Várias patologias que afetam a saúde humana são de origem microbiana (MURRAY, 2000; TAUXE, 2002; ALVARENGA, 2007),

---

\*Aluna de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual da Paraíba – Campus I.  
Email: cibellessaleixo@gmail.com

especialmente, aquelas situadas na cavidade oral, consideradas grandes problemas de saúde pública (SILVA *et al.*, 2012).

Os grandes movimentos mundiais de combate e controle de doenças infecciosas através da higienização básica, campanhas de vacinação em massa e uso de antimicrobianos, que se popularizaram no século passado, culminaram com o aumento da sobrevida populacional. No entanto, a reemergência de doenças contagiosas, o surgimento de cepas resistentes e o descobrimento de novos patógenos é uma situação real e potencialmente perigosa (CARNEIRO, 2011)

A resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas antimicrobianas cresceu nos últimos anos devido, principalmente, ao uso indiscriminado desses fármacos. Por outro lado, a partir do ano 2000 poucos antibióticos foram introduzidos no mercado para terapêutica antimicrobiana (GUIMARÃES *et al.*, 2010). Assim, surge a necessidade de buscar novas alternativas terapêuticas, onde as plantas medicinais representam uma importante fonte de compostos ativos para o desenvolvimento de novos medicamentos (MENEZES *et al.*, 2009; SILVA *et al.* 2010; CANTON e ONOFRE, 2010; ARAÚJO, 2010; VINAGRE *et al.*, 2011; CAMELO *et al.* 2011; MENDES *et al.*, 2011; MULYANINGSIH *et al.*, 2011; CHEN-LUNG *et al.*, 2012; SARAIVA, 2012; NASCIMENTO *et al.*, 2012,).

As plantas medicinais são utilizadas para distintas atividades terapêuticas, cujas propriedades biológicas devem ser analisadas em modelos *in vitro*, *in vivo*, seguindo com os ensaios clínicos. Essas propriedades medicinais são decorrentes da presença de compostos ativos, conhecidos como metabólicos secundários, identificados por meio de métodos de análise química (RATES, 2001; SILVA *et al.*, 2012).

Constatada a presença de atividade biológica contra microrganismos, é importante que se conheça o potencial do produto natural em causar ou não danos às células normais ou tumorais do hospedeiro, para que um futuro uso terapêutico seja viável (RODEIRO; CANCINO; GONZÁLEZ *et al.*, 2006).

O Brasil possui a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado acima de 20% do número total de espécies do planeta. Com mais de 55 mil espécies descritas, esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimentos tradicionais acumulados por pessoas locais que têm acesso direto a natureza e seus produtos (CARVALHO *et al.* 2007; SILVA *et al.*, 2012).

Devido á riqueza da flora do Brasil e ao conhecimento popular transmitido através das gerações, as plantas medicinais são vendidas em feiras livres e mercados populares e muitas

delas são usadas para curar várias enfermidades da população (DUARTE, 2006; SARAIVA, 2012).

Dentre as plantas medicinais disponíveis destaca-se a *Guapira graciliflora* (Mart.), conhecida popularmente como joão-mole, pau-mole, joão dormindo (LORENZI, 1998), pau-piranha (COELHO *et al.*, 2005). Esta planta pertence à família Nyctaginaceae, é de origem brasileira e tem como sinónima científica *Pisonia graciliflora* Mart. ex J. A. Schmidt; e *Pisonia graciliflora* Mart. var. *B. subferruginosa* Mart. (CHAVES, 2013; ARAÚJO 2014)

Encontrada no bioma Caatinga é referenciada como planta medicinal pela população local (LORENZI, 1998; CHAVES, 2013), cuja infusão da entrecasca é utilizada como cicatrizante (COELHO *et al.* 2005). Sua madeira é utilizada para instrumentos agrícolas e pau para lenha e carvão. Está inserida na composição de reflorestamentos destinados à recuperação da vegetação em áreas degradadas. (LORENZI, 1998; AQUINO *et al.*, 2007; CHAVES, 2013).

Poucos estudos foram desenvolvidos para analisar a atividade antimicrobiana do extrato da *G. graciliflora*. ROCHA *et al.* (2013) relataram resultado positivo do extrato bruto das folhas da *G. graciliflora* contra o *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Utilizaram como solvente o álcool etílico 70%, o que pode ter influenciado o resultado. Outro trabalho foi desenvolvido por CHAVES *et al.*, 2013 onde utilizaram o extrato das cascas do caule da *G. graciliflora*. Não encontraram atividade antimicrobiana para nenhum microrganismo testado (*S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*).

Considerando o uso da *G. graciliflora* na medicina tradicional e a necessidade inicial da sua caracterização biológica, o presente estudo objetivou avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato da *Guapira graciliflora* (Mart.) frente a cepas padrão de bactérias e levedura; e sua toxicidade, através do teste da hemólise *in vitro*.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 Material vegetal

As folhas da *Guapira graciliflora* (Mart.) foram coletadas na região do semiárido paraibano, no município de Queimadas, na meso região da Borborema e micro região do Cariri Oriental, no mês de agosto de 2013. O espécime testemunho da *G. graciliflora* (Mart.) encontra-se depositado na coleção do Herbário Manuel de Arruda Câmara (ACAM) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba (nº

907/ACAM). O material foi limpo, acondicionado em sacos de papel e seco em estufa de ar circulante (FANEM®, modelo 330) a temperatura de 40°C até obtenção de peso constante.

## 2.2 Obtenção do extrato

Foi obtido um extrato hidroalcolico a 50% das folhas da *G. graciliflora*, através do processo de maceração, por cinco dias, em temperatura ambiente e protegido da luz, utilizando uma proporção de 200 g da planta seca e moída para 1 litro do solvente (álcool etílico 50%). Após esse processo, o solvente foi removido em evaporador rotativo (Quimis® / Q344M) a 40°C, e em seguida o extrato foi liofilizado (Labconco® / Freezone 4.5).

## 3 CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

### 3.1 Microrganismos

Foi utilizada uma linhagem padrão da levedura *Candida albicans* ATCC 10231 além de linhagens padrões das seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

### 3.2 Preparação do inóculo

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado através do método de microdiluição seguindo as recomendações dos protocolos M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008) e M07-A8 para bactérias (CLSI, 2009).

Culturas de leveduras de 24 horas foram preparadas e adicionadas em solução salina estéril (5mL), ajustando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 525 nm, resultando numa concentração equivalente a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL. A partir desta solução, foi removida uma alíquota de 1mL, que foi adicionada em 9 mL de solução salina estéril, obtendo-se uma concentração de  $5,0 \times 10^5$  UFC/mL. Uma alíquota de 1mL desta solução foi adicionada a 9 mL de meio de cultura RPMI-1640. A mistura foi homogeneizada. Novamente, 1mL foi removido e adicionado em 9 mL do meio de cultura, estabelecendo uma concentração final de  $5 \times 10^3$  UFC/mL. Nos poços da microplaca inoculados, a solução final resultou em uma concentração de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL.

Culturas de bactérias de 24 horas foram preparadas e adicionadas em solução salina estéril (5mL), ajustando-se sua absorbância entre 0,08 a 0,10 a 625 nm, resultando numa concentração equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. A partir disso, desta solução, foi removida uma alíquota de 1mL, que foi adicionada 9 mL do meio BHI caldo, obtendo-se uma

concentração de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL. Uma alíquota de 1mL desta solução foi adicionada a 9 mL do meio de cultura. A mistura foi homogeneizada. Por fim, 8mL foram removidos e adicionados a 4 mL do meio de cultura, estabelecendo uma concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Nos poços da microplaca inoculados, a solução final resultou em uma concentração de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

### **3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição**

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços (8 linhas A-H/ 12 colunas), foram depositados 100  $\mu$ L do meio de cultura. Em seguida, foram acrescentados 100  $\mu$ L do extrato em diferentes colunas na concentração de 4.000  $\mu$ g/mL. A microdiluição foi realizada na placa, onde 100  $\mu$ L do conteúdo do primeiro poço foi homogeneizado e transferido para o seguinte, repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a se obter concentrações entre 15,62 e 2.000  $\mu$ g/mL do extrato. Os 100  $\mu$ L finais foram desprezados. Posteriormente, 100  $\mu$ L do inóculo do microrganismo a ser avaliado, de crescimento recente, foram adicionados. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera aeróbia (CLSI 2008, 2009).

Como controles positivos foram utilizados a nistatina (Sigma-Aldrich®) e a clorexidina 2% (Sigma-Aldrich®). Foi verificado também o controle do crescimento do microrganismo e a esterilidade do meio de cultura, bem como, do extrato, sendo colocados de forma individualizada nos poços das microplacas. O experimento foi realizado em triplicata e em três diferentes momentos.

Após o período de incubação, foi verificado se houve mudança de coloração do meio RPMI-1640 das microplacas inoculadas com as leveduras, de rosa (cor original) para amarelo, o que indica mudança de pH ocasionada pelo crescimento microbiano (CLSI, 2008). Na microplaca inoculada com a bactéria, foram adicionados 20  $\mu$ L da solução do corante resazurina 0,01% (Sigma-Aldrich®) em cada poço. Este corante é capaz de distinguir as amostras de microorganismos com atividade respiratória, através da coloração vermelha, daquelas sem atividade, coradas de azul (CLSI, 2009). A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu crescimento microbiano visível. A CFM/CBM foi realizada apenas como as amostras que apresentaram atividade antimicrobiana menor que 1000  $\mu$ g/mL.

A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada de acordo com a classificação de Holetz *et al* (2002), empregando-se os seguintes critérios: para CIM entre 10 e 100  $\mu$ g/mL é

considerada como boa; entre 101 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , como atividade moderada; entre 501 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , como fraca atividade, e quando a CIM for maior que 1000  $\mu\text{g/mL}$ , como inativo.

### **3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Para determinar a atividade fungicida mínima, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de cada poço da placa inoculada com a levedura, com concentrações igual e maiores que a CIM, foi subcultivada em meio ágar Sabouraud Dextrose e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas. A CFM foi definida como a menor concentração que inibiu crescimento visível no meio utilizado.

## **4 ENSAIO DE CITOTOXIDADE**

### **4.1 Hemólise**

Preparou-se uma suspensão de hemácias 5% em solução salina 0,9%. Em seguida, 2mL desta suspensão foi distribuída em tubos de ensaio e homogeneizadas com 2 mL do extrato dissolvido em solução salina o qual foi diluído em diferentes concentrações a fim de se obter 16, 08, 04, 02 e 1  $\text{mg/mL}$ . Após 1 hora, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, durante 10 minutos e foi realizada a leitura visual levando em consideração a quantidade de hemácias que sofreram lise. A visualização da hemólise foi classificada como: – (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise) de acordo com Luize *et al.* (2005). Essa leitura foi realizada em espectrofotômetro (540 nm) (Shimadzu® UV mini – 1240), utilizando como branco a solução salina 5% para confirmar os resultados da leitura visual. Foi utilizado como controle negativo solução salina a 0,9% e como controle positivo o Líquido de Turk.

## **5 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA**

### **5.1 Separação de compostos fenólicos por cromatografia em camada delgada (CCD)**

Foi realizada a Cromatografia de Camada Delgada (CCD), utilizando-se cromatofolhas de alumínio com fase estacionaria de sílica, com tamanho de 20cm x 20cm (cromatofolha–alumínio CCF-C/25, Merck) com pontos de aplicação a 1cm da margem inferior da placa. Como fase móvel foi utilizada a mistura de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água, nas proporções de 100:11:11:26. Os componentes da amostra foram visualizados sob luz ultra-violeta (254 nm), sendo a cromatofolha revelada com

NP/PEG/macrogol (fenóis), com posterior aquecimento a 100°C, durante 5 minutos. As bandas reveladas foram medidas e os resultados expressos pelo fator de retenção (Rf), através do cálculo da razão entre a distância total e a distância percorrida pela substância, cujo resultado norteou a identificação do composto.

## 6 RESULTADOS

Nas concentrações utilizadas, o extrato hidroalcolico das folhas da *G. graciliflora* apresentou atividade apenas para a cepa de *C. albicans* (Tabela 1).

**Tabela 1:** Distribuição dos valores das concentrações inibitória mínima, bactericida e fungicida do extrato da *G. graciliflora*, de acordo com o microorganismo.

MICRORGANISMOS	<i>Guapira Graciliflora</i> (Mart.)	
	CIM (µg/mL)	CFM/CBM (µg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	> 2000	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	> 2000	-
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	> 2000	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	250	1000

Em relação à hemólise, o extrato não produziu hemólise significativa nas concentrações analisadas (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos valores percentuais da hemólise produzida pelo extrato da *Guapira graciliflora*, de acordo com as concentrações.

CONCENTRAÇÕES	16 mg/mL	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL
MÉDIA	0,486	0,374	0,352	0,300	0,231
HEMÓLISE	22,81%	17,55%	16,52%	14,08%	10,84%
	-	-	-	-	-

Referências: – (0% de hemólise), + (25% de hemólise), ++ (50% de hemólise), +++ (75% de hemólise) e ++++ (100% de hemólise)

## 7 DISCUSSÃO

O extrato hidroalcolico liofilizado das folhas da *G. graciliflora* apresentou moderada atividade contra a *C. albicans* (CIM = 250 µg/mL) e nenhuma atividade, até a concentração de 2000 µg/mL, contra as espécies bacterianas. Estudos anteriores apresentaram resultados positivos em relação à atividade antimicrobiana do extrato da *G. graciliflora* contra o *S. aureus* e *E.coli* (ROCHA *et al.* 2013) e frente a outras espécies bacterianas como a *Klebsiella*

*pneumoniae* (COSTA *et al.* 2010) e o *Enterococcus faecalis* (ROCHA *et al.* 2013). No trabalho de ROCHA *et al.* 2013 foi testado o extrato bruto das folhas da *G. graciliflora*, utilizando-se o álcool etílico 70% como solvente, o que pode ter contribuído para o resultado positivo. CHAVES *et al.*, 2013 testou o extrato das cascas do caule da *G. graciliflora* frente aos microrganismos *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e não observaram inibição de crescimento.

Esta diferença de resultados pode ser atribuída a outros fatores inerentes à planta, que vão desde as condições ambientais (radiação UV, alta temperatura, estresse hídrico), de cultivo, época de coleta do material vegetal e método de obtenção do extrato (GOBBO-NETO E LOPES, 2007; NCUBE *et al.* 2010; CHAVES, 2012). Esses aspectos devem ser considerados, uma vez que podem interferir na produção dos metabólitos secundários pelas plantas, cujos compostos são responsáveis pelas suas propriedades biológicas e terapêuticas.

A análise química do extrato da *G. graciliflora* por cromatografia de camada delgada revelou a presença marcante de flavonóides. Os flavonóides são um grupo de compostos polifenólicos, metabólitos secundários produzidos por plantas. Eles podem ser encontrados na dieta humana em frutos e vegetais. (BIRT, 2001; BECHO *et al.*, 2009). O interesse pelos flavonóides tem aumentado à medida que suas atividades biológicas vão sendo descobertas. Estão associados a diferentes propriedades farmacológicas como antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, antialérgica, vasodilatadora, anti-proliferativa, antidiarréica, antiúlcera, antiestrogênica, anticâncer, antidiabética, anti-hepatotóxica (LONGHINI *et al.* 2007; DORNAS *et al.*, 2007; SEVERI, 2010).

Um dos compostos majoritários identificado no extrato pertence ao grupo dos flavonóides, conhecido como rutina, cuja eficácia na atividade anti-cândida tem sido elucidada (BECHO *et al.*, 2009). Considerando o resultado positivo da atividade anti-cândida e sua composição química, o extrato da *G. graciliflora* pode constituir uma fonte promissora para o desenvolvimento de uma substância para o controle e/ou tratamento da candidose. A candidose na sua forma invasiva, sistêmica tornou-se uma das doenças com maior risco de morte em hospitais no mundo (NISHIKAKU, MELO; COLOMBO, 2010).

Em relação a hemólise os resultados foram satisfatórios, onde o extrato da *G. graciliflora* não produziu hemólise acima de 50% em nenhuma das concentrações testadas. É um resultado positivo, uma vez que o extrato na concentração de 250 µg/mL foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* da *C. albicans*. Este resultado oferece uma segurança, quando se discute a produção de uma substância que será utilizada clinicamente. Estes achados reforçam a importância das indicações terapêuticas da planta como método alternativo. O que pode

sinalizar o desenvolvimento de uma nova formulação com atividade antimicrobiana de uso odontológico no controle de patógenos orais.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que o extrato da *G. graciliflora* apresenta moderada atividade anti-cândida e baixa toxicidade frente às hemácias. Sendo necessárias mais análises, *in vitro* e *in vivo*, para comprovação de sua eficácia e segurança, para o desenvolvimento de uma nova formulação para o combate ou tratamento da candidose.

## ABSTRACT

The medicinal plants constitute a rich source for the development of new drugs, particularly antibiotics, be topical and / or systemic use. Among these plants used in traditional medicine, stands out *Guapira graciliflora* (Mart.), more popularly known as João-mole, commonly used as a healing agent. This study evaluated the antimicrobial activity and *in vitro* toxicity of hydroalcoholic extract of the leaves of *Guapira graciliflora* (Mart.); and determined its phytochemical profile. The hydroalcoholic extract was obtained by maceration process, for five days, using 50% ethanol as solvent. The extract was subjected to the process of vacuum evaporation and lyophilization. The antimicrobial potential was analyzed by the broth microdilution technique, with determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Fungicidal/Bactericidal Concentration minimum (FCM / BCM) against the bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC11775 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 and the yeast *Candida albicans* ATCC 10231. The toxicity of yeast extract was analyzed by the method of hemolysis and phytochemical analysis by thin layer chromatography (TLC). The extract of *G. graciliflora* showed high potential antifungal (MIC= 0,250 µg/mL) compared to *C. albicans*; expressionless antibacterial activity (MIC> 2000 µg/mL); and showed no hemolysis over 50% in any of the tested concentrations (1, 2, 4, 8, 16 mg/ml). The phytochemical analysis identified composed groups of flavonoids, being the rutin the major compound. The *G. graciliflora* presented antimicrobial activity only for strain of the *C. albicans* and its toxicity front the red blood cells was considered low. This initial biomonitoring signals a possible potential against candida of the *G. graciliflora* extract,

requiring further studies, pre-clinical and clinical trials to prove its efficacy and safety, with a view to developing a new formulation for combating or treating candidiasis.

**Keywords:** Medicinal plants. Products with antimicrobial action. *Candida albicans*.

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A.L.; SCHWAN, R.F.; DIAS, D.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; BRAVO-MARTINS, C.E.C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.9, n.4, p.86-91, 2007.

ARAÚJO, T. K. de. Avaliação in vitro do potencial antimicrobiano e da atividade antiproliferativa da Guapira Graciliflora Mart. (joão-mole), 2014.

AQUINO, F. G.; WALTER, B. M. T.; RIBEIRO, J. F. Espécies vegetais de uso múltiplo em reservas legais de cerrado – Balsas, MA. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 147-149, 2007.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M de O. Rutina – Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21 - 25, 2009.

BIRT, D. F.; HENDRISCH, S.; WANG, W., Dietary Agents in Cancer Prevention: Flavonoids and Isoflavonoids. **Pharmacology Therapeut.** v. 90, p. 157-177, 2001.

CAMELO, S.R.P.; COSTA, R.S.; RIBEIRO-COSTA, R.M.; BARBOSA, W.R.L.; VASCONCELOS, F.; VIEIRA, J.M.S.; SILVA JUNIOR, J.O.C. Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (aubl.) Choisy. **IJPSR**, v. 2, n. 12, p. 3224-3229, 2011.

CANTON, M. & ONOFRE, S.B. Interferência de extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a atividade de antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 348- 354, 2010.

CARNEIRO, M. As doenças infecciosas no contexto da saúde pública. *Revista da AMRIGS*, Porto Alegre, 55 (3): 215, jul.-set. 2011.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p. 26-32, 2007.

CHAVES, T. P.; SANTANA, C. P.; VÉRAS, G.; BRANDÃO, D. O.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D.; TROVÃO, D. D. M de B. M. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology** Vol. 12(8), pp. 847-853, 20 February, 2013.

CHEN-LUNG, H.; PEI-CHUN, L.; YU-CHANG, S. Composition and antimicrobial activities of the leaf essential oil of *Machilus zuihoensis* from Taiwan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n.2, p. 277-283, 2012.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; **Approved Standard**, vol. 28, no. 14, CLSI document M27-A3, Wayne, PA, USA, 3rd edition, 2008.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; **Approved Standard**, vol. 29, 29 of CLSI document M07-A8, Wayne, Pa, USA, 8th edition, 2009.

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F., SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia**. Suplemento v. 2, n. 2, p. 52-55, 2005.

COSTA, E. M. M. B., BARBOS, A. A. S., ARRUDA, T. A., OLIVEIRA, P. T., DAMETTO, F. R., CARVALHO, R. A., MELO, M. D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. **J Bras Patol Med Lab**. 2010;46(3):175-80.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiências**, v.7, 2006.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. da S.; PUPO, M. P. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027, 2002.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Brazilian Journal of Pharmacognosy 17(3): 388-395, Jul./Set. 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**. 2. ed. Nova Odessa, São Paulo: Editora Plantarum., Vol.II, 1998.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2005.

MENDES, L.P.M.; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM NETO, P.J.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MENEZES, T.O.A.; ALVES, A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S.; MENEZES, S.A.F.; ALVES, B.P.; MENDONÇA, L.C.V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184-91, 2009.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharm. Biol.**, v. 49, n. 9, p. 893-9, 2011.

MURRAY, P.R. **Microbiologia médica**, 3.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000. 726p.

NASCIMENTO, M.S.; VIEIRA, J.M.S.; MALHEIROS, L.C.S.; J. O. C. SILVA JÚNIOR, J.O.C.; L. C. S. RODRIGUES, L.C.S.; BARBOSA, W.L.R. Characterisation of isoeleutherine in aqueous extract of *Eleutherine plicata* herb, iridaceae, active against *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in-vitro. **IJPSR**, v. 3, n. 4, p. 1096-1100, 2012.

NCUBE, B.; FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. **South African Journal of Botany**. v. 79, 2010.

NISHIKAKU, A. S.; MELO, A. S. A.; COLOMBO, A. L. Geographic Trends in Invasive Candidiasis. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 4, p. 210–218, 2010.

RATES, S. M. K. “Plants as source of drugs,” **Toxicon**, vol. 39, pp. 603–613. 2001.

ROCHA, E.A.L.S.S., CARVALHO, A.V.O.R., ANDRADE, S.R.S., TROVÃO, D.M.M.B., MEDEIROS, A.C.D., et al..Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v.34, n.3, p. 351-355, 2013.

RODEIRO, L. CANCINO, J. E. GONZÁLEZ et al., “Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity,” **Food and Chemical Toxicology**, vol. 44, no. 10, pp. 1707-1713, 2006.

SARAIVA, R.M.C. Antibacterial activity of medicinal plants used against multi-resistant bacteria and their interaction with antimicrobial agents. 94f. Thesis (Master). Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará, Belém-PA, 2012.

SEVERI, J. A. Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção química farmacológica em plantas superiores: *Guapira* spp. / Juliana Aparecida Severi. Araraquara, 2010. 144 f.

SILVA, M. S. P.; BRANDÃO, D. O.; CHAVES, T. P.; FILHO, A. L. N. F.; COSTA, E. M. M. de B.; SANTOS, V. L.; MEDEIROS, A. C. D. Study Bioprospecting of Medicinal Plant

Extracts of the Semiarid Northeast: Contribution to the Control of Oral Microorganisms. Hindawi Publishing Corporation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Volume 2012

SOUSA, A. J. F. Avaliação dos efeitos antimicrobianos de rutina e quercetina in vitro. Campinas, SP, 2009.

TAUXE, R.V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.31- 41, 2002.

VINAGRE, N.P.L.; FARIAS, C.G.; ARAÚJO, R.J.G.; VIEIRA, J.M.S.; SILVA JÚNIOR, J.O.C.; CORRÊA, A.M. Efetividade clínica de um enxagatório bucal fitoterápico com tintura padronizada de *Calendula officinalis* na manutenção da saúde periodontal. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 40, n. 1, p. 30-35, 2011.