



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I- CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

INGRID MAYARA DA CUNHA BRITO

**DO CONHECIMENTO EMPÍRICO AO CIENTÍFICO: INVESTIGAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA
DE *Hymenaea courbaril* L. FRENTE A CEPAS CLÍNICAS**

CAMPINA GRANDE

2019

INGRID MAYARA DA CUNHA BRITO

**DO CONHECIMENTO EMPÍRICO AO CIENTÍFICO: INVESTIGAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA
DE *Hymenaea courbaril* L. FRENTE A CEPAS CLÍNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo) apresentado a Coordenação do Curso de Biologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Botânica Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Delcio de Castro Feslismo

CAMPINA GRANDE

2019

É expressamente proibido 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 do trabalho.

B862d Brito, Ingrid Mayara da Cunha.
Do conhecimento empírico ao científico [manuscrito] :
investigação da atividade antimicrobiana do Extrato Etanólico
da entrecasca de *Hymenaea courbaril* L. frente a cepas
clínicas / Ingrid Mayara da Cunha Brito. - 2019.
25 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde , 2019.
"Orientação : Prof. Dr. Delcio de Castro Felismino ,
Departamento de Biologia - CCBS."
1. Atividade antimicrobiana. 2. Resistência microbiana. 3.
Plantas medicinais. 4. Jatobá. I. Título
21. ed. CDD 581.634

INGRID MAYARA DA CUNHA BRITO

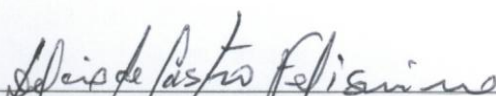
**DO CONHECIMENTO EMPÍRICO AO CIENTÍFICO: INVESTIGAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA
DE *Hymenaea courbaril* L. FRENTE A CEPAS CLÍNICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso (Artigo)
apresentado a Coordenação do Curso Biologia
da Universidade Estadual da Paraíba, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharela em Ciências Biológicas.

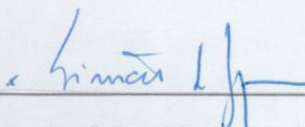
Área de concentração: Botânica Aplicada

Aprovada em: 26/06/2019.

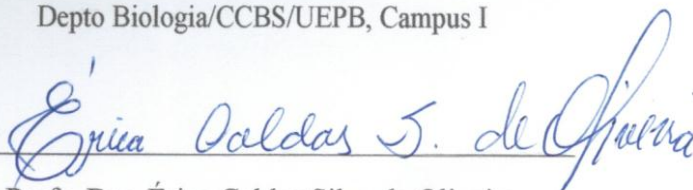
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Delcio de Castro Felismino)
Depto Biologia/CCBS/UEPB, Campus I
Orientador



Prof. Dr. Simão Lindoso de Souza
Depto Biologia/CCBS/UEPB, Campus I



Profa. Dra. Érica Caldas Silva de Oliveira
Depto Biologia/CCBS/UEPB, Campus I

A minha mãe, por todo amor, carinho, dedicação,
companheirismo e amizade, **DEDICO**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo o dom da vida e a oportunidade que ele me deu de realizar meus sonhos. Agradeço a minha mãe, Valdete, pela batalha diária para uma vida digna, honesta e sempre em crescimento. Pelas noites em claro, pelas preocupações com meu futuro, pela insistência para que consiga realizar meus objetivos, a toda minha família, tios e irmã, sou grata pelo os momentos e apoio.

Aos meus queridos amigos de Graduação, Joyce e Ketley, Igor, pelas palavras de incentivo, pela paciência, pelos momentos alegres e estressantes... Agradeço a Augusto pelo o companheirismo e se dispor nos ajudar em diversos momentos e por também fazer parte desse trabalho.

Em especial gostaria de agradecer a minha querida amiga de batalhas Thalita pelo companheirismo, por aqueles momentos de desespero onde sempre havia uma mão estendida e uma, palavra de consolo, que tudo ficaria bem... Pela reciprocidade, alegrias e carinho e principalmente por sempre está comigo nas pesquisas... valeu por ser minha companheira de bancada, coleta, coisas aleatórias e loucuras.

Aos meus muitos amigos que não se envolveram diretamente, mas que sempre prestaram apoio em momentos difíceis.

A meu querido orientador Dr. Delcio de Castro Felismino, pela oportunidade, pela paciência, pelo incentivo, por acreditar que eu chegaria lá. E cheguei amoriiiiiiii! A meus queridos professores, em especial a Beatriz Ceballos, Joseline Molozzi, Avany Gusmão, José Valberto, André Pessanha, Roberta Smênia, Walclecio Lira, Simão Lindoso, Érica Caldas, Johan Bruno, Mônica Maria e Lívia Pooliana pelo aprendizado e incentivo

Ao pessoal da Criart Silvia, Didida, Luciene e dona Mari pela ajuda e dedicação, a coordenação de Biologia e todos os seus funcionários pela a prestatividade. Ao pessoal do Laboratório de Fitoquímica por auxiliar na pesquisa, ao laboratório de Microbiologia, especialmente a Luiz por todo ensinamento que obtive sobre microbiologia, e todo o auxílio nos experimentos. Gostaria de agradecer a meus queridos amigos do Horto da (UEPB) João e Anfus Pombo, por ao longo desses últimos anos ter passado muito conhecimento sobre botânica. A Universidade Estadual da Paraíba, por tornar esse sonho possível... Enfim, a todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, desses quatro anos de batalha para o meu crescimento pessoal e profissional, o meu muito obrigada!!!!!!

“Se não tens um jardim verdadeiro,
sonha-o dentro de ti.”

(Raul Cânovas)

DO CONHECIMENTO EMPÍRICO AO CIENTÍFICO: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DA ENTRECASCA DE *Hymenaea courbaril* L. FRENTE A CEPAS CLÍNICAS

BRITO, I. M.C. ¹

RESUMO

Devido ao crescente número de microrganismos resistentes aos antimicrobianos atuais, têm se valorizado a busca por alternativas naturais, que sejam eficazes nos tratamentos de enfermidades. A *Hymenaea courbaril* L. (jatobá), segundo a medicina popular, é utilizada para o tratamento de enfermidades microbianas. O presente estudo teve por objetivo avaliar de forma científica o conhecimento empírico dos raizeiros com relação a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da entrecasca da *Hymenaea courbaril* L., frente a cepas de importância clínica. O material vegetal fresco foi coletado no distrito de São José da Mata/Município de Campina Grande/Paraíba. Para obtenção do extrato da entrecasca utilizou-se o processo de maceração à frio, com álcool a 96%, e submetido a rotaevaporação. Para a análise microbiológicas foram utilizadas cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida krusei* e *Candida albicans*. A avaliação do potencial antimicrobiano do extrato foi realizada pelos métodos de difusão cavidade-placa, sendo as cepas inoculadas pela técnica de espalhamento em superfície. A concentração inibitória mínima foi avaliada a partir da diluição seriada (100%; 50%; 25%; 12,5% e 6,25%) do extrato. Constatou-se que o extrato foi efetivo frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida krusei*. Portanto, o conhecimento empírico pode ser validado a partir dos resultados obtidos a partir do extrato da entrecasca de *Hymenaea courbaril* L.. Sugere-se que os estudos devem ter continuidade visando identificar, purificar e fracionar os fitoquímicos da entrecasca e testar frente a outros microrganismos.

Palavras-chaves: Resistência microbiana; Plantas medicinais; Jatobá; Alternativas antimicrobianas.

¹ Graduanda do curso de bacharelado em Ciências Biológicas/UEPB/CCBS/Departamento de Biologia, Campus I.

**BY THE EMPIRICAL TO SCIENTIFIC: INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL
ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF THE BINDER OF
Hymenaea courbaril L. AGAINST THE CLINICAL STRAINS**

BRITO, I. M.C. ¹

ABSTRACT

Due to the growing number of resistant microorganisms to current antimicrobials, the search for natural alternatives that are effective in the treatment of diseases has been valued. The *Hymenaea courbaril* L. (jatobá), according to folk medicine, is used for the treatment of microbial diseases. The objective of the present study was to evaluate the empirical knowledge of the rootstocks in relation to the antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Hymenaea courbaril* L., against strains of clinical importance. The fresh plant material was collected in the district of São José da Mata /City of Campina Grande / Paraíba. To obtain the extract of the binder, the cold maceration process was used, with 96% alcohol, and subjected to rotoevaporation. For the microbiological analysis was used strains of *Staphylococcus aureus*, *enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumonia*, *Candida krusie* and *Candida albicans*. The evaluation of the antimicrobial potential of the extract was performed by cavity-plate diffusion methods, and the strains were inoculated by surface scattering technique. The minimum inhibitory concentration was evaluated from the serial dilution (100%; 50%; 25%; 12,5% e 6,25%) of the extract. It was verified that the extract was effective against the strains of *Staphylococcus aureus*, *enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *klebsiella pneumonia*, and *Candida krusie*. Therefore, the empirical knowledge can be validated from the results obtained from the *Hymenaea courbaril* L. binder extract. It is suggested that the studies should have continuity in order to identify, purify and fractionate the phytochemicals of the binder and to test against other microorganisms.

Keywords: Microbial resistance, Medicinal plants, Jatobá. Antimicrobials Alternatives.

¹ Bachelors of Biological Sciences/UEPB/CCBS/Department of Biology, Campus I.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Resistência microbiana	11
2.2 Plantas medicinais e indicação popular	11
2.2.1 <i>Hymenaea courbaril</i> L.	13
3 METODOLOGIA	14
3.1 Local do estudo	14
3.2 Obtenção do material vegetal	14
3.3 Obtenção do extrato	16
3.4 Análise microbiológica	16
3.4.1 Cepas microbianas	16
3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	16
3.5 Análise dos dados	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5 CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

A resistência microbiana é uma grande ameaça à saúde pública, elencada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em doze famílias de bactérias, "patógenos prioritários" resistentes a antibióticos (MUNITA; ARIAS, 2016). As infecções que são causadas por bactérias com resistência a múltiplos fármacos estão associadas com o aumento de óbitos, quando comparadas a aquelas causadas por bactérias suscetíveis (SYDNOR; PERL, 2011). Geralmente, as bactérias resistentes surgem a partir de mutações que alteram a ação dos antibióticos através de mecanismos, diminuindo a afinidade pelo fármaco. Assim, a resistência que surge devido a mudanças mutacionais adquiridas é diversa e varia em complexidade (MUNITA; ARIAS, 2016). Tais mutações são conferidas pela capacidade que a bactéria tem de adquirir material genético através da transformação, transdução e conjugação (MELDERNACH; LOGAN, 2018).

Ao longo da história, muitos estudiosos têm buscado os conhecimentos populares em ervas e plantas para incorporar à sua "iatroquímica" na intenção de obter novos caminhos para a medicina, como alternativa terapêutica menos nocivas aos indivíduos e mais eficientes no combate de enfermidades (STRATERN, 2002).

Dessa forma, se faz necessária a busca de produtos alternativos de origem natural, que apresente atividade terapêutica no tratamento de enfermidades. Nas últimas décadas se têm demonstrações científicas da eficácia de compostos bioativos de origem vegetal contra várias doenças. Alguns estudos têm tentado encontrar novas moléculas que apresentem potencial antimicrobiano (HERRERO *et al.*, 2013).

A partir disso, o extrato etanólico bruto da casca de *H. courbaril* L. já demonstrou apresentar atividade antimicrobiana. Em que extratos hidroetanólicos brutos obtidos do súber desta planta mostraram propriedades antibióticas ao ser testado contra o isolado clínico meticiclina-resistente de *Staphylococcus aureus* (MRSA) inibido tais microrganismos (ALEIXO *et al.*, 2013). Sabe-se que a *H. courbaril* é utilizado na medicina popular para tratamento de algumas infecções gastrointestinais e doenças relacionadas ao trato respiratório. Entretanto, é altamente perceptível a relevância na continuidade da exploração de tais potenciais de outras formulações e extratos a base de partes de *Hymenaea courbaril* bem como ensaios que relatem sua toxicidade.

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar de forma científica o conhecimento empírico dos raizeiros com relação a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da entrecasca da *Hymenaea courbaril*, frente a cepas de importância clínica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resistência microbiana

O surgimento de resistência em microrganismos é reconhecido como uma grande ameaça à saúde pública. Esse fato afeta seres humanos em todo o mundo, não apenas no ambiente hospitalar, mas também em ambientes comunitários, devido a presença de reservatórios de microrganismos resistentes a antibióticos presentes fora do hospital (MUNITA; ARIAS, 2016).

O grupo de bactérias de maior relevância são multirresistentes, uma ameaça particular em indivíduos suscetíveis hospitalizados. Os representantes desse grupo são: *Acinetobacter*; *Pseudomonas*; e várias *Enterobacteriaceae* (incluindo *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia e Proteus*). Eles podem causar infecções graves e muitas vezes mortais, como infecções da corrente sanguínea e pneumonia (OMS, 2019). No grupo de prioridade alta, a OMS incluiu as bactérias que tem ficado cada vez mais resistente entre elas estão *Staphylococcus aureus*, resistente à metilina e vancomicina; *Enterococcus faecalis*, resistente à ampicilina e vancomicina; *Salmonella spp.*, resistente a fluoroquinolonas; *Neisseria gonorrhoeae* de terceira geração resistente à cefalosporina, resistente a fluoroquinolona (TACCONELLI *et al.*, 2018). As infecções que são causadas por microrganismos com resistência a múltiplos fármacos estão associadas com o aumento de óbitos, quando comparadas a aquelas causadas por bactérias e fungos suscetíveis (SYDNOR; PERL, 2011).

Portanto, terapias eficazes são urgentemente necessárias, as opções terapêuticas para os patógenos são extremamente limitadas e os médicos são obrigados a usar medicamentos caros ou que estão associados com efeitos colaterais significativos para a saúde dos pacientes (RÍOS; RECIO, 1988). Conseguem-se encontrar alternativas que possibilitem tratamentos eficazes de infecções microbianas. A utilização de plantas com indicação medicinal apresenta-se como alternativa terapêutica no combate de doenças infecciosas e tem sido promissora desde os tempos antigos (DAHANUKAR; KULKARNI; REGE, 2000).

2.2 Plantas medicinais e indicação popular

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (OMS, 2019). Estima-se que 75-80% de toda a população mundial utilize plantas medicinais (SUMITRA;

JIGNA; RATHISH, 2005). Nos países desenvolvidos, a chamada medicina complementar e alternativa é frequentemente utilizada de forma conjunta à medicina convencional (RIBEIRO; MOURA, 2009). Países em desenvolvimento por apresentarem déficits nos cuidados primários de saúde por parte do governo ou sistemas de saúde em geral, maior aceitabilidade, vivência e prática cultural e acessibilidade têm apresentado maior intensidade no uso de plantas medicinais (ROY *et al.*, 2013)

Seu uso dá-se desde os primórdios da humanidade e o conhecimento acumulado durante séculos continua sendo valioso para as gerações atuais (BRAGA, 2011; ZENI *et al.*, 2017). Assim, surgiu a etnofarmacologia que tem fornecido evidências sobre substâncias que apresentam potencial para o desenvolvimento de novos fármacos baseado em observações feitas em diversas áreas como química, bioquímica, botânica, farmacologia e antropologia (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

O Brasil apresenta um número significativo de plantas utilizadas em diferentes formulações de extratos brutos para tratar doenças, tais indicações realizadas a partir de conhecimento popular, embora, seja perceptível a falta de estudos de cunho científico que comprovem sua eficácia. Sob este aspecto, é indiscutível o aumento do uso de fitoterápicos no país, tornando-se um setor da economia brasileira importante devida sua aceitação popular como tratamento (LIMA *et al.* 2006). Cerca de 80% da população brasileira utiliza 37% dos medicamentos disponíveis no mercado e dependem quase que exclusivamente dos medicamentos de origem natural (CARVALHO *et al.*, 2008).

Dentre as 71 plantas da lista da RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), para 18 espécies já foram documentados estudos envolvendo o potencial terapêutico antibacteriano dessas espécies. Referente a essas plantas, são disponibilizada no SUS como fitoterápico (*Aloe vera*, *Mentha piperita* e *Schinus terbinthifolius*). Geralmente, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram às bactérias com a maior concentração de estudos, a partir de alguma das plantas da RENISUS (MARMITT *et al.*, 2015).

Em diversas cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (TRESVENZOL *et al.*, 2006). Tal comércio envolve várias espécies, produtos e subprodutos de plantas, sendo a maioria, comercializadas somente pelo nome popular. O comércio local não é controlado, inclui plantas medicinais muitas não estudadas ou ainda que não tiveram seus princípios ativos identificados para validá-las como medicamentos ou aproveitá-las adequada e

economicamente. Sendo estas plantas utilizadas por uma diversidade de usuários distribuídos pelo o país. As indicações terapêuticas dessas plantas envolvem relações de troca de informações entre as pessoas e seu entendimento sobre o meio ambiente em que vivem, e são permeadas por fatores culturais e sociais (FERREIRA, 1998; SILVA et al. (2001).

2.2.1 *Hymenaea courbaril* L.

H. courbaril L. é conhecida popularmente como “jatobá”, pertencentes à família das Fabaceas (*Leguminosae*), são árvores com porte que varia de 15m a 45 m, apresentam troncos retos de forma cilíndrica, suas folhas são compostas, bifolioladas, de filotaxia alterna com estipulas e pecíolo livre do lado interno. Apresenta flores actinomorfas, unicarpelares e uniloculares, hermafroditas; as 4 sépalas são verde-cremes; as 5 pétalas são brancas a creme-alaranjadas. O fruto é uma vagem indeiscente, lenhosa, glabra, oblonga a cilíndrica, que mede 8-15cm de comprimento; com exocarpo espesso e vermelho-escuro; o endocarpo é farináceo, adocicado e amarelo claro. As sementes, em número de 2 a 6 por fruto ou mais, apresentam formato obovóide a elipsóide; o tegumento é pétreo, liso e pardo-claro a pardo escuro (SOUZA et al., 2016).

A distribuição geográfica das plantas do gênero *Hymenaea*, ocorrido México até a América do Sul podendo ser encontrada também na costa leste da África. No Brasil encontra-se cerca de 12 espécies, sendo 3 endêmicas do país, onde a espécie *Hymenaea courbaril* apresenta ampla distribuição, se estendendo da floresta amazônica até a floresta semidecidual no sudoeste do Brasil(PESTANA, 2010).

Entre a grande variedade de plantas com potencial terapêutico, o gênero *Hymenaea* que apresentam como representantes os jatobás, têm sido amplamente utilizadas em países sul-americanos (BONIFACE; FERREIRA; KAISER, 2017).

A casca é utilizada no tratamento de hemoptises, hematúria, diarreia, disenteria, cólicas ventosas, além de ser poderoso fortificante (BONTEMPO, 2000), apresenta potenciais terapêuticos para distúrbios pulmonares como gripe, bronquite, cistite, catarro no peito, diarreia, vermes, fraqueza, cólicas, infecções na bexiga, para ajudar na digestão e no tratamento de câncer de próstata (SHANLEY; MEDINA, 2005). Sendo, extremamente importante a continuidade de estudos científicos que comprovem tais propriedades terapêuticas da *Hymenaea courbaril* L.(SILVA, 2012).

Segundo Miranda (2014, p.694), o gênero *Hymenaea*, apresenta compostos fenólicos. Tais fitoquímicos podem apresentar atividade antioxidante, relacionado à presença de polifenóis e flavonoides.

Os flavonoides se destacam dentre os fenólicos encontrados na planta, estando amplamente distribuídos em diferentes partes do vegetal. De acordo com as substituições em sua estrutura eles podem ser divididos em várias classes tais como, flavonóis (quercetina), flavonas (rutina), flavanóis (catequina), flavanonas (naringenina), isoflavonas (genisteína) e antocianinas (cianidina). Alguns estudos têm demonstrado que os flavonoides apresentam efeitos sobre os sistemas biológicos, tais como atividade anti-inflamatória, vasodilatadora, antiplaquetária e antimicrobiana (FIGUEIREDO, 2014; COSTA; SILVA-JÚNIOR., 2014; ALMEIDA *et al.*, 2012).

3 METODOLOGIA

3.1 Local do estudo

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Botânica, Fitoquímica e Microbiologia da Universidade Estadual da Paraíba/CCBS, Campus I.

3.2 Obtenção de material vegetal

A entrecasca foi coletada no distrito de São José da Mata/ Campina Grande- PB com latitude e longitude ($7^{\circ}11'55.522''S$, $35^{\circ}58'57.09''W$), no período das 08:00-10:00 horas. A coleta foi realizada a partir da planta matriz (Figura 1), na fase vegetativa. Sendo retirada a entrecasca através de cortes longitudinais no caule (Figura 2), usando facão e foice, sem comprometer seu sistema condutor. Em seguida, o material foi separado da casca, e procedeu-se o processo de secagem em estufa de circulação forçada. Na fase de floração foi obtido o exemplar da planta para identificação e posteriormente foi confeccionada exsicata, e depositada no Herbário Manuel de Arruda Câmara/CCBS/Universidade Estadual da Paraíba/ Campus I, com número de tombamento: 1932, sendo a pesquisa cadastrada no SisGen (Patrimônio Genético) sob o número: A1DEFD7.

Figura 1: Espécie vegetal *Hymenaea courbaril* L. presente no Município de Campina Grande/PB, 2019



Fonte: BRITO, I. M. C., 2019

Figura 2: Tronco *H. courbaril* L. setas indicando a entrecasca (parte de coloração vermelha), na lateral imagem de cortes longitudinais realizados para obtenção de entrecasca, Campina Grande-PB, 2019



Fonte: BRITO, I. M. C., 2019

3.3 Obtenção do extrato

A entrecasca foi submetida à secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura de $50^{\circ}\text{C} \pm 1$. Após a secagem, o material foi triturado em moinho do tipo faca, em seguida o material passou por peneira (tamis) de numeração 10Mesh obtendo-se o pó. Para obtenção do extrato utilizou-se o método de maceração a frio, o material foi homogeneizado, sendo utilizadas 100g do referido pó, para 0,5 L de solvente etanol a 96%. A amostra foi filtrada em papel filtro estéril e o produto filtrado foi submetido, novamente, ao processo de maceração e filtragem e concentrada em rotaevaporador a 60°C (Tecnal/TE-211) a 40 rpm. Os extratos foram armazenados em um refrigerador a 4°C até o uso para os experimentos propostos.

3.4 Análise microbiológica

3.4.1 Cepas microbianas

Foram utilizadas cepas clínicas bacterianas Gram-Negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*); Gram-Positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) e fúngicas (*Candida albicans* e *Candida krusei*) pertencentes à coleção de Cultura do Laboratório de microbiologia/UEPB/CCBS, Campus I.

3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para reativação dos microrganismos realizou-se a repicagem e procedeu-se a sua incubação a $\pm 37^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para bactérias e $\pm 26^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para fungos. A suspensão de cada microrganismo foi obtida transferindo-se as culturas crescidas sobre o meio de cultura, com alça estéril, para um tubo de ensaio contendo inóculo bacteriano a 3mL de solução salina 0,9% estéril até se obter a turvação do meio de 1 MacFarland.

A CIM foi determinada pelo método de diluição em cavidade-placa, com adaptações. Em que, a partir do extrato a 100% (v/v), por diluição seriada em água destilada estéril, foram obtidas as demais concentrações a 50; 25; 12,5; 6,25 % (v/v).

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato foi utilizado o método de difusão em meio sólido. Sendo utilizadas placas de Petri contendo 20mL de Müller-Hinton para as bactérias, e para os fungos, caldo Saboraud Dextrose. Procedeu-se a formação das cavidades, usando-se canalículas ($\varnothing 6,0\text{mm}$), nas quais foram colocados 50 μL do extrato da entrecasca de *H. coubaril* em cada poço. Nas quais foram inoculadas as respectivas cepas, pela técnica de espalhamento em superfície. As placas foram incubadas a temperatura de \pm

37°C/48 horas para as bactérias, e ± 26 °C/24 horas para os fungos, sendo os ensaios realizados em triplicata.

Utilizou-se como controle positivo o Ciprofloxacino, que se demonstrou eficaz frente as cepas estudadas após prévia realização de antibiograma

3.5 Análise dos dados

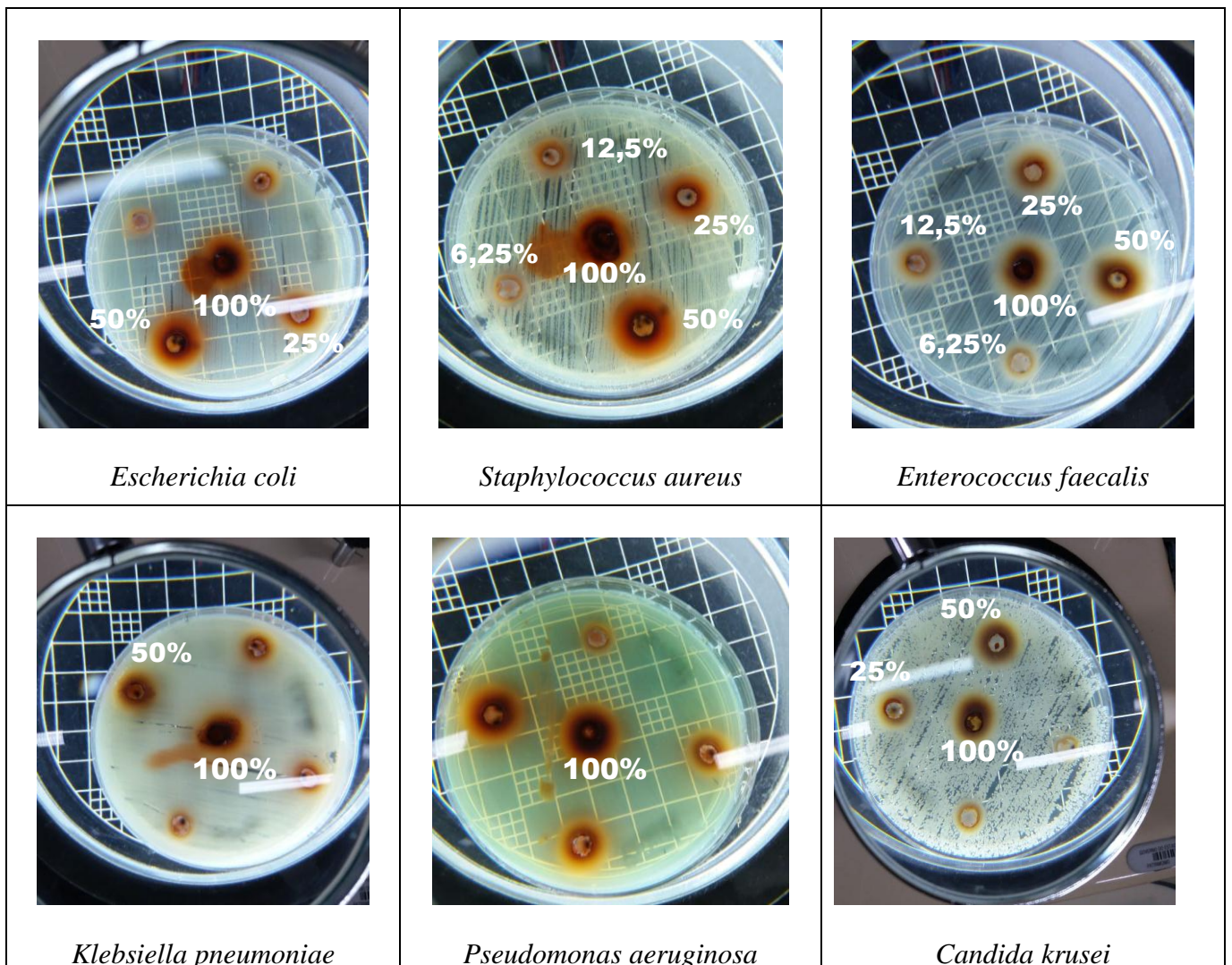
A leitura dos resultados foi realizada com auxílio de um halômetro e contador de colônias medindo-se o diâmetro dos halos, em mm, formados ao redor dos discos contendo os extratos. O resultado final foi obtido a partir da média das três medidas dos halos. Sendo considerada como possuidora de atividade antimicrobiana aquela concentração do extrato que quando aplicada sobre o meio de cultura contendo a suspensão do microrganismo apresentou um halo de inibição de crescimento igual ou superior a 8,0 mm de diâmetro (LIMA *et al.*, 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse referido trabalho não foram realizadas análises fitoquímicas devido a comprovação da presença destes compostos descritos na literatura. De acordo com Silva *et al.* (2012) existe uma dominância dos flavonoides astilbina, quercetina, rutina, catequina, naringenina, genisteína e cianidina como o principais compostos fenólicos presente na *H. coubaril* L.. Tais metabólitos secundários apresentam baixo peso molecular e são amplamente distribuídos nos vegetais, demonstrando diversas atividades biológicas (HERNANDEZ; TERESCHUK; ABDALA, 2000). Segundo Mishra & Tiwari (2011), a presença de flavonoides nos vegetais é de ampla importância terapêutica, em que várias áreas de doenças infecciosas e oncologia se beneficiaram dessas classes de drogas, capazes de interagir com muitas áreas dentro das células, e de fato têm sido fundamentais na descoberta e desenvolvimento de medicamentos.

Na Figura 3 observa-se halo de inibição do extrato frente à *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Candida krusei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando halos variando de 18 a 8,0 mm de diâmetro (Tabela 1).

Figura 3: Halos de inibição do extrato etanólico da entrecasca de *Hymenaea courbaril* L., frente a cepas de importância clínica.



Fonte: BRITO, I. M. C., 2019

Verificou-se a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* em todas as concentrações utilizadas com halos variando de 18,0 a 8,0 mm; seguida por *Escherichia coli* e *Candida krusei* nas concentrações de 100%, 50% e 25%, com halos 12,0 a 8,0 mm; *Klebsiella pneumoniae* também apresentou halos de inibição apenas para concentrações de diluções 100% e 50% com halos de 10,0 a 8,0 mm, enquanto as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram halos de inibição a concentrações de diluções na proporção 100% do extrato, apresentando halo de 8,5 mm. Sendo apresentado maior halo para

S. aureus e *E. faecalis* (18,0 mm) e menor halo para *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *C. krusei* (8,0 mm).

Tabela 1: Avaliação da concentração inibitória mínima (mm) do extrato vegetal da entrecasca de *Hymenae courbaril* L., frente a cepas clínicas. Campina Grande-PB, 2019.

Microrganismos	Concentração do extrato (%)/ Diâmetro dos halos de inibição (mm)				
	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
<i>Escherichia coli</i>	10,5	10,0	8,0	SI	SI
<i>Staphylococcus aureus</i>	18,0	17,0	13,0	11,0	8,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	18,0	16,0	13,0	11,5	10,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10,0	8,0	SI	SI	SI
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,5	SI	SI	SI	SI
<i>Candidaalbicans</i>	SI	SI	SI	SI	SI
<i>Candida krusei</i>	12,0	12,0	8,0	SI	SI

*SI: Não apresentou halo de inibição

Os extratos que apresentam flavonóides em sua composição apresentam atividade inibitória frente a estirpes de gram-positivas (*S. aureuse E. faecalis*) é comprovada em diversos estudos (CHATTOPADHYAY *et al.* 2001, CUSHNIE & LAMB 2011). Tal fato está relacionado composição celular do organismo.

As cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, e *P. aeruginosa* apresentaram menor halo, pois, segundo Salton e Kim, (1996) as bactérias gram-negativas por apresentarem uma estrutura complexa, podem evitar a ação dos compostos fitoquímicos no interior das células, a presença de uma parede celular menos espessa, composta por peptidoglicano, que proporciona certa rigidez a parede celular desses organismos, e, protege o citoplasma das variações de pressão osmótica, apresentando uma membrana externa com característica isolante evitando à perda de proteínas e a ação de enzimas hidrolíticas, proporcionando resistência a bactéria. Tal fato pode influenciar diretamente na ação do extrato que não consegue chegar ao interior da célula desses microrganismos

Foi apresentado efeito inibitório frente a *C. krusei*. Martins *et al.* (2010) e Albuquerque *et al.* (2007) relataram que a infusão da entrecasca apresenta efeito antifúngico e

pode ser utilizada no tratamento de micose. Algumas plantas apresentam atividade anti-candida, porém necessitam de concentrações muito altas, tal fato, se deve alguns fatores como, método de avaliação, tipo de extrato, parte utilizada e procedência dos isolados fúngicos.

Dimechet *al.* (2013) em seus estudos demonstrou que ao utilizar o extrato etanólico da casca do caule de espécies do gênero *Hymenaea* pode observar que o extrato gerou vários processos na cepa utilizada, como a falhas ao inserir peptideoglicos na membrana externa, falha na pressão osmótica interna, devido à ação de produtos na membrana externa, alterações nos componentes intracelulares, tais como ácidos nucléicos e proteínas.

Na *H. courbaril* L. encontram alguns óleos essenciais, taninos, substâncias amargas, matérias resinosas e pécticas, amido e açúcares (PANIZZA, 1997; PINTO *et al.*, 2000). Na casca e folhas se encontra compostos terpênicos e fenólicos que agem como antimicrobianos, antifúngicos, descrito em vários estudos (STUBBLEBINE; LANGENHEIM, 1980; LORENZI; MATOS, 2002).

Diversos fatores podem contribuir para tais resultados, podendo variar de acordo com a ausência ou variabilidade de atividade antibacteriana. No presente estudo pode ser decorrente da concentração do extrato, qualidade do material vegetal (alterada por condições de solo, sazonalidade, tipo de colheita e teor de ativos) ou mesmo da menor sensibilidade dos microrganismos (MACHADO, 2012).

Alguns estudos demonstram que os taninos podem atuar sobre o metabolismo dos microrganismos inibindo enzimas, da fosforilação oxidativa e do sistema de transporte de elétrons e inativação de adesinas microbianas e proteínas do envelope celular. (COWAN, 1999; SCALBERT, 1991) Os flavonoides podem atuar na inibição de síntese de ácidos nucléicos impedindo a formação de pontes de hidrogênio entre bases nitrogenadas e, podem perturbar as bicamadas lipídicas penetrando diretamente e interrompendo a função de barreira, como também podem provocar a fusão da membrana, resultando em vazamento de materiais intramembranosos (MORI *et al*, 1987; FRANCIS *et al*,2002).

5 CONCLUSÃO

Mediante o presente estudo, constata-se que o extrato da entrecasca de *H. coubaril* apresenta atividade inibitória frente a cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) e fúngicas (*Candida krusei*) de importância clínica, reforçando a presença do potencial antimicrobiano, indicado pelos os raizeiros para tratamento de afecções, a qual ainda não foi amplamente explorada cientificamente, merecendo uma investigação mais detalhada dos bioativos presentes na entrecasca.

Portanto, sugere-se uma futura investigação, devendo-se identificar, purificar, fracionar os fitoquímicos, da entrecasca, e testar frente a outros microrganismos.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE U.P., MEDEIROS P.M., ALMEIDA A.L.S., MONTEIRO J.M., LINS NETO E.M.F., MELO J.G., SANTOS J.P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 114, p. 325/328, 2007.

ALEIXO, A. A. *et al.* Propriedades antibióticas dos extratos de *Stryphnodendron adstringens* E *Hymenaea courbaril* (Fabaceae), frente ao isolado clínico meticiclina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, Minas Gerais, v. 2, n. 2, p.85-88, jun. 2013. Anual.

ALMEIDA, J. R. G. S. *et al.* Analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. Petrolina, p. 1160-1166. Mar. 2012.

BRAGA, C. M.. **Histórico da utilização de plantas medicinais**. 2011. 24 f. TCC (Graduação) - Curso de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BONIFACE, P.; FERREIRA, S. B.; KAISER, C. R.. Current state of knowledge on the traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of the genus *Hymenaea*. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 206, p.193-223, jul. 2017.

BONTEMPO, M.. **Medicina Natural**. São Paulo: Nova Cultura, 2000. 584p.

CARVALHO, A. C. B. *et al.* Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 18, n. 2, p.314-319, jun. 2008.

CHATTOPADHYAY, D. *et al.* Antimicrobial activity of *Alstonia macrophylla*: a folklore of bay islands. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 77, n. 1, p.49-55, set. 2001.

- COSTA, A. L. P.; SILVA-JÚNIOR A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (unifap)**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.45-57, 23 ago. 2017. Universidade Federal do Amapá.
- COWAN, M. M.. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Miami, v. 12, n. 4, p.564-582, out. 1999.
- CUSHNIE, T.P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 38, n. 2, p.99-107, ago. 2011.
- DAHANUKAR, S. A.; KULKARNI, R. A.; REGE, N. N..Pharmacology of medicinal plants and natural products. **Indian Journal of Pharmacology**. Mumbai, p. 81-118. 2000.
- DIMECH, G. S. *et al.* Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and Fractions from the Stem Bark of *Hymenaeastigonocarpa* Mart. ex Hayne and Effect on Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Induced by Hydroalcoholic Extract. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2013, p.1-8, 2013.
- FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, [s.l.], v. 109, n. 1, p.69-75, mar. 2001. Environmental Health Perspectives.
- FERREIRA, S. H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.
- FIGUEIREDO, P. A. **Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e fotoprotetor de extratos de *Hymenaea courbaril* L. *E Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex Hayne.** 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biociências, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Assis, 2014.
- FRANCIS, G. *et al.* The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 88, n. 6, p.587-605, dez. 2002. Cambridge University Press (CUP).
- MARTINS, C.H.G., SOUZA, F.R., FONSECA, C., CASEMIRO, L.C., FURTADO, N. A. J. C., AMBROSIO, S.R., CUNHA, W.R. , Determinação in vitro da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaeacourbaril* L. *Investigação*. v. 10, P. 37-43, 2010.
- HERRERO, M. *et al.* Compressed fluids for the extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 43, p.67-83, fev. 2013.
- HERNÁNDEZ, N. E.; TERESCHUK, M. L.; ABDALA, L. R..Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 73, n. 1-2, p.317-322, nov. 2000.
- LIMA, M. R. F. *et al.* Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 105, n. 1-2, p.137-147, abr. 2006.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.** 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512 p.

- MACHADO, S. E. F. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos fracionados de casca e folha da *Schinopsis brasiliensis* Engler. através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e de cavidade em placa.** 2012. 27 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2012. Cap. 1.
- MAHADY, B. G. *et al.* Studies in Natural Products Chemistry edited by Atta-ur-Rahman. **Bioactive Natural Products (part O)**, [s.l.], p.423-444, 2008.
- MEDERNACH, R. L.; LOGAN, L. K.. The growing threat of antibiotic resistance in children. *Infectious Disease Clinics*, v. 32, n. 1, p. 1-17, 2018.
- MANSON, J. M.; HANCOCK, L. E.; GILMORE, M. S. Mechanism of chromosomal transfer of *Enterococcus faecalis* pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 107, n. 27, p.12269-12274, 21 jun. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- MARMITT, D. J. *et al.* Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática. **Rev. Saúde Pública**, Florianópolis, v. 8, n. 2, p.135-152, maio 2015.
- MIRANDA, A. R.; CASTRO, C. F. S.; SILVÉRIO, M. D. O. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaeastigonocarpa Mart.exHayne*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 16, n. 31, p.693-699, 2014.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V.. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 10, p.4769-4807, out. 2011.
- MORI, A. *et al.* Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 26, n. 8, p.2231-2234, jan. 1987.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A..Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition**, [s.l.], p.481-511, 2016. American Society of Microbiology.
- PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato.** 15. ed. São Paulo: Ibrasa, 1998. 279 p.
- PINTO, J. E. B. P.; SANTIAGO, E. J. A. & LAMEIRA, O. A. *Compêndio de plantas medicinais.* Lavras, MG: UFLA/FAEPE, 2000. 208p.
- PESTANA, L. T. C. **Estudo taxonômico de *Hymenaea L.*: complexo *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae: Detarieae).** 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.
- RIBEIRO, A. Q.; MOURA, C.S. Informações sobre plantas medicinais e fitoterápicos no contexto da farmacoterapia. In: *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*, 328 p. 2009.

- RIOS, J. L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 23, n. 2-3, p.127-149, jul. 1988.
- ROY, J. *et al.* Microbes on the Cliff: Alpine Cushion Plants Structure Bacterial and Fungal Communities. **Frontiers in Microbiology**, [s.l.], v. 4, p.1-9, 2013.
- SALTON, M. R. J.; KIM, K. S. Structure. In: BARON, S. (editor). **Medical microbiology**.4th. edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 30, n. 12, p.3875-3883, jan. 1991.
- SHANLEY, P.; MEDINA, G. (Ed.). Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Cifor, 2005.
- SHRIVASTAVA, S.; SHRIVASTAVA, P.; RAMASAMY, J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society**, v. 32, n. 1, p. 76-76, 2018.
- SILVA, S. R. *et al.*. Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio. Brasília, DF: **Ministério de Cooperação Econômica e Desenvolvimento da Alemanha e IBAMA**. 2001.
- SILVA, M. E. G. C. *et al.* HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaeamartiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. Pernambuco, p. 1160-1166. jan. 2012.
- SILVA, M. S.; LEITE, K. R. B.; SABA, M. D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaeamartiana* Hayne (Caesalpinioideae- Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 673-679, 2012.
- SOUZA, I.; FUNCH, L. S.; QUEIROZ, L. P. Flora da Bahia: Leguminosae–Hymenaea (Caesalpinioideae: Detarieae). **SITIENTIBUS** série Ciências Biológicas, v. 16, 2016.
- SUMITRA, C; JIGNA, P; RATHISH, N. Preliminary screening of some folklore medicinal plants from western India for potential antimicrobial activity. **Indian Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 37, n. 6, p.408-409, 2005.
- STUBBLEBINE, W.H. & LANGENHEIM, J.H. Estudos comparativos da variabilidade na composição da resina da folha entre árvore parental e progênie de espécies selecionadas de *Hymenaea*: comparação de populações Amazônicas com uma população do sudeste brasileiro. *Acta amazonica*, Manaus, v.10, n.2, 1980, p.293-309.
- STRATHERN, P (Ed.). **O Sonho de Mendeleiev::** a verdadeira história da química. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2002.
- SYDNOR, E. R. M; PERL, T. M. Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 141-173, 2011.
- TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318-327, 2018.

TRESVENZOL, L. M. et al. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 1, p. 23-28, 2006.

ZENI, A. L. B. *et al.* Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703-2712, 2017.

World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 27 February 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

‘