



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I - CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

ADRIANO FERNANDES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
HIDROACETÔNICO E HIDROMETANÓLICO DE *Pseudobombax marginatum* (A.
ST.-HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS FRENTE A MICRO-ORGANISMOS DE
INTERESSE CLÍNICO**

**Campina Grande - PB
2014**

ADRIANO FERNANDES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
HIDROACETÔNICO E HIDROMETANÓLICO DE *Pseudobombax marginatum* (A.
ST.-HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS FRENTE A MICRO-ORGANISMOS DE
INTERESSE CLÍNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Bacharel no curso de Farmácia.

Orientador: Prof. DSc. Delcio de Castro Felismino

Campina Grande - PB
2014

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.

S725a Sousa, Adriano Fernandes de.

Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroacetônico e hidrometanólico de *Pseudobombax Marginatum* (A. ST.-HIL., JUSS. & CAMESS.) A. Robyns frente a microorganismos de interesse clínico [manuscrito] / Adriano Fernandes de Sousa. - 2014.

20 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

"Orientação: Prof. Dr. Delcio de Castro Felismino, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Plantas medicinais. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Resistência microbiana. I. Título.

21. ed. CDD 615.321

ADRIANO FERNANDES DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
HIDROACETÔNICO E HIDROMETANÓLICO DE *Pseudobombax marginatum* (A.
ST.-HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS FRENTE A MICRO-ORGANISMOS DE
INTERESSE CLÍNICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Departamento de Farmácia da Universidade
Estadual da Paraíba, como requisito para obtenção
do título de bacharel no curso de Farmácia.

Aprovado em: 14/03/2014



Prof. DSc. Delcio de Castro Felismino
(UEPB/CCBS/DB/Campus I)
Orientador



Prof.^a DSc. Karlete Vânia Mendes Vieira
(UEPB/CCBS/DF/Campus I)
Examinadora



Prof. MSc. Thiago Pereira Chaves
(UFPI/ CPCE)
Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ter permitido alcançar mais este objetivo em minha vida, apesar das inúmeras dificuldades encontradas durante o caminho.

Aos meus pais, Dona Antônia e Sr. Raimundo, pelo amor, dedicação e incentivo, desde sempre ao longo da minha vida.

À minha mulher, Dona Barthíria, por todo o apoio e paciência durante os anos complicados de estudante na universidade.

Em especial ao meu filhinho Adrian, que no decorrer desses anos muitas vezes me tirou o sono, literalmente, e que ainda hoje, me faz esquecer os problemas e as preocupações do dia a dia. Meu bem mais valioso!

Agradeço ao Mestre Rodrigo, meu irmão, por toda a ajuda, paciência, incentivo e trabalho para que eu enfim concluísse esta pesquisa.

Ao professor Dsc. Delcio de Castro Felismino, do departamento de Biologia, por ter aceitado a difícil tarefa de me orientar neste trabalho, como também pela paciência, atenção e apoio. Ok.

Agradeço aos professores Dr.^a Karlete Vânia Mendes Vieira e ao Mestre Thiago Pereira por terem aceitado prontamente fazer parte da minha banca apesar de suas muitas outras obrigações.

A todos os professores do departamento de Farmácia, que no decorrer desses anos foram fundamentais para a construção de nossa formação, não só no processo de aprendizagem, mas também pelas lições de vida, pelas demonstrações de companheirismo e também pelas amizades que foram construídas durante esses anos.

Aos amigos e colegas da turma de farmácia por todos os momentos compartilhados. Foram muitas preocupações, inúmeras provas, vários trabalhos, e também muitas risadas.

Em especial aos amigos José Fábio (Bichão), Mara (Maroca), Alcinda (Cindoca), não exatamente nesta ordem, sem esquecer é claro, de Agélise e Ana Maria, por toda a ajuda, atenção, respeito e carinho durante esta longa caminhada. Vivenciamos muitos bons momentos juntos.

Ao grande Luís Augusto, do laboratório de microbiologia, sempre atencioso e disposto a nos ajudar.

Sem esquecer os amigos de trabalho, Manoel e Cleodon, que tanto me ajudaram.

Enfim, a todos vocês meu muito obrigado.

**AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
HIDROACETÔNICO E HIDROMETANÓLICO DE *Pseudobombax marginatum* (A.
ST.-HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS FRENTE A MICRO-ORGANISMOS DE
INTERESSE CLÍNICO**

Sousa, Adriano Fernandes de¹
Felismino, Delcio de Castro²

RESUMO

A utilização incorreta e indiscriminada dos antimicrobianos habituais têm contribuído para o surgimento da crescente resistência a essas substâncias nos últimos anos, ocasionando importantes implicações para a morbidade, mortalidade e saúde pública. Este cenário estimula e intensifica a procura por substâncias com atividade antibacteriana em fontes alternativas. Portanto, objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos hidroacetônico e hidrometanólico das cascas de *Pseudobombax marginatum* (embiratanha) frente a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *C. kruzei* e *C. parapsilosis*. Os extratos da casca foram obtidos por técnica de ultrassom. O *screening* microbiológico foi realizado por técnica de disco-difusão em meio sólido, sendo os extratos testados em diluições seriadas. Constatou-se que os extratos apresentaram potencial atividade antimicrobiana frente às espécies bacterianas e ausência de atividade antifúngica, sendo o extrato hidroacetônico mais efetivo que o hidrometanólico. Evidencia-se a importância de se trabalhar com solventes de polaridades distintas. Sugere-se uma maior investigação dos resultados, devendo-se extrair, fracionar, identificar, quantificar, purificar e isolar os fitoquímicos, avaliando sua atividade antimicrobiana e testando-a frente a outros micro-organismos.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Polaridade. Resistência microbiana.

-
1. Acadêmico de Farmácia/Departamento de Farmácia/CCBS/Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: f.sousa07@gmail.com
 2. Professor Doutor/Departamento de Biologia/CCBS/Universidade Estadual da Paraíba. E-mail: dcfelismino@ccbs.uepb.edu.br

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o uso indiscriminado e incorreto dos antibióticos usuais contribuiu também para o desencadeamento da crescente resistência aos antimicrobianos, acarretando importantes efeitos para a morbidade, mortalidade e saúde pública, já que os pacientes acometidos por micro-organismos resistentes além de precisar de maior tempo de permanência nos hospitais, também necessitam de antimicrobianos mais potentes e até mesmo mais tóxicos com custo mais elevado, aumentando os custos dos sistemas de saúde e o risco de morte dos pacientes (CASTRO *et al.*, 2002). A resistência aos agentes antimicrobianos demanda cada vez mais de novas alternativas, tanto para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos quanto de novas abordagens para o tratamento das infecções bacterianas, já que se trata de um grave problema de saúde (CUNICO *et. al.*, 2004; LATHERS, 2002).

Diante da busca de novas alternativas terapêuticas no combate a resistência microbiana, assim como de novos compostos ativos, é de grande importância que a enorme biodiversidade do Brasil seja racionalmente estudada, explorada, e, devidamente utilizada. Portanto, há necessidade de identificação de substâncias ativas de origem natural com potencial antimicrobiano, visando, contribuir para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, visto que nas últimas décadas, com o aumento crescente da resistência bacteriana aos antimicrobianos existentes, poucos medicamentos foram desenvolvidos e/ou disponibilizados no mercado para esta finalidade.

A espécie vegetal *Pseudobombax marginatum* (A. St.-Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns, conhecida popularmente como embiratanha, apresenta uso de sua casca relatado como possuidora de ação anti-inflamatória no nordeste brasileiro (AGRA *et al.*, 2008).

Portanto, este trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos hidroacetônico e hidrometanólico das cascas de *P. marginatum* frente a cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas e fúngicas de interesse clínico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resistência microbiana

A resistência microbiana é um processo biológico natural que se seguiu à introdução dos agentes antimicrobianos na prática clínica, variando com a dependência do consumo local

de antimicrobianos (TAVARES, 2008). A resistência microbiana diz respeito a cepas de micro-organismos com capacidade de se multiplicar em concentrações de substâncias antimicrobianas mais altas que as doses terapêuticas utilizadas em seres humanos (AVORN, 2000; WANNMACHER, 2004).

Segundo Harvey *et al.* (2008), três mecanismos principais estão envolvidos na resistência microbiana aos antibióticos, no primeiro, ocorre aumento do efluxo, ou seja, há uma diminuição da absorção do antibiótico; no segundo, alteração do sítio-alvo do antibiótico e, no terceiro, adquire-se a capacidade de modificar ou destruir o antibiótico. A resistência antimicrobiana pode ser de origem genética ou não e, independente de qual seja a forma mais relevante deste processo, o número de novas bactérias resistentes e patogênicas para animais e humanos cresce mais rápido do que a capacidade dos laboratórios e indústrias produzirem novos medicamentos (MOTA *et al.*, 2005).

De acordo com o Ministério da Saúde, segundo Oliveira e Silva (2008), cerca de 70% das bactérias responsáveis por infecções hospitalares no Brasil são resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos habitualmente utilizados para o tratamento dos pacientes. E ainda, provocam uma maior permanência hospitalar dos pacientes, requerendo tratamento com fármacos de segunda e terceira geração que podem ser mais tóxicos, menos efetivos ou mais caros (OLIVEIRA; SILVA, 2008). A crescente incidência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos tem causado grande preocupação em contexto mundial, seja pela redução do arsenal terapêutico, pelo aumento do tempo de internação, pelo custo do tratamento e/ou ainda, pelo risco associado à morte dos pacientes (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os *Staphylococcus aureus* (SCHAECHTER *et al.*, 2002) e *Staphylococcus epidermidis* (JAWETZ; LEVINSON, 2005) são espécies bacterianas comumente envolvidas em infecções piogênicas; por outro lado, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis* (BRAOIOS *et al.*, 2009), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (HEILBERG & SCHOR, 2003) estão frequentemente envolvidas em infecções urinárias, enquanto *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* estão geralmente envolvidas no acometimento de candidíase bucal (CORRÊA; ANDRADE, 2006) e candidíase vulvovaginal (FIDEL, 2002).

2.2 Plantas medicinais

No Brasil, a utilização de plantas medicinais associada ao conhecimento popular repassado através das gerações faz com que muitas dessas plantas sejam utilizadas para a cura

da população frente a várias enfermidades (DUARTE, 2006). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), segundo Tadeg *et al.* (2005), apontam que 80% da população mundial faz uso de remédios obtidos de plantas, principalmente nos países em desenvolvimento, e que a maior utilização se concentra nas áreas rurais ou em zonas onde a população não tem acesso ou condições de adquirir medicamentos.

O surgimento de micro-organismos cada vez mais resistentes aos antimicrobianos convencionais, associado ao avanço tecnológico, impulsionou a pesquisa pela procura de novas substâncias de origem natural com eficácia igual ou superior ao das substâncias utilizadas nos tratamentos usuais (OESTERHELT *et al.*, 2005). Segundo Michelin *et al.* (2005), os antibióticos vegetais possuem uma estrutura química que difere daquela dos antibióticos derivados de micro-organismos, podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativar ou bloquear reações e síntese enzimática ou mesmo alterar a estrutura de membranas. Entretanto, “desde o advento dos antibióticos nos anos 1950 o uso de derivados de plantas como antimicrobianos tem sido virtualmente inexistente” (COWAN, 1999).

2.3 *Pseudobombax marginatum* (A. St.-Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns

Originária do Brasil, pertencente à família *Bombacaceae*, conhecida popularmente como embiratanha, imbiricu, paineira-imiricu ou sumaúma (CORRÊA, 1969; LORENZI, 1998), possui distribuição exclusiva na América do Sul, especialmente na Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru. No Brasil, ocorre na Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco (DU BOCAGE; SALES, 2002), em todos os Estados do Centro-Oeste e ainda Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro (DUARTE, 2006). Altura variando entre 2,5 a 8m; copa rala e umbeliforme; tronco com diâmetro de 30 a 45cm; casca com estrias longitudinais irregulares, de coloração verde e sulcada superficialmente. Os ramos são longos e pendentes. As folhas são unifolioladas, pubescentes, reunidas em ramos curtos. As flores são alvas, actinomorfas, monóclinas, polistêmones, tipo pincel, de antese noturna, solitárias ou em duas ou três, geralmente nas extremidades dos ramos, de 7 a 14 cm de comprimento. Os frutos são do tipo cápsula loculicida, secos, glabros, abrindo-se em cinco valvas longitudinais. As sementes são amarronzadas, ovaladas, envoltas por paina sedosa de cor castanho-claro (CORRÊA, 1969; DU BOCAGE; SALES, 2002; LORENZI, 1998).

Dentre as classes de substâncias químicas identificadas nessa espécie, se destacam alcaloides, fenóis, flavonoides, flavanonas, flavonóis, taninos e xantonas (CHAVES, 2013). Quanto à utilização medicinal de *P. marginatum*, destaca-se o uso da casca da planta como

anti-inflamatório no Nordeste brasileiro (AGRA *et al.*, 2008) e a utilização de sua entrecasca para dor na coluna na comunidade rural de Laginhas, Caicó - RN (ROQUE *et al.*, 2010).

Chaves (2013), ao avaliar a atividade antimicrobiana de *P. marginatum*, constatou efeito frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. Enquanto Leal *et al.* (2011), avaliando espécie pertencente à mesma família da referida planta, verificaram eficácia apenas contra *S. aureus*. Por outro lado, Almeida *et al.* (2012) não observaram atividade do extrato dessa planta frente as cepas de *E.coli*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*.

3 REFERENCIAL METODOLÓGICO

3.1 Obtenção do material vegetal

Foram coletadas cascas do caule de *P. marginatum*, a partir de plantas adultas selecionadas, considerando-se as características fitossanitárias. A coleta do material foi realizada na Fazenda Vereda Grande, zona rural do município de Barra de Santana-PB, na Microrregião de Barra de Santana, nas coordenadas geográficas 7° 32,013' S e 36° 3,018' W. Sendo um exemplar vegetal depositado no Herbário Arruda Câmara/Universidade Estadual da Paraíba, sob o número 00906.

3.2 Obtenção dos extratos vegetais

Os extratos hidroacetônico e hidrometanólico de *P. marginatum* foram obtidos por técnica de ultrassom. Para cada amostra, foram pesados 10 g do pó da casca da planta, e umedecidos. Sendo o primeiro, com 100 mL de solução acetona/água a70% (v/v), e o segundo, com 100 ml de solução metanol/água a 70% (v/v). Em seguida, foram submetidos a banho de ultrassom (UNIQUE[®]) por 60 minutos a 40 °C. Após este período, os solventes foram removidos em evaporador rotativo (QUIMIS[®]), e os extratos armazenados sob refrigeração a 4 °C até o uso para os estudos propostos.

3.4 Análise microbiológica

3.4.1 Cepas microbianas

Para a avaliação dos extratos nos ensaios microbiológicos foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC), de *Enterococcus faecalis* (51299), *Staphylococcus aureus* (14458), *S. epidermidis* (12228), *S. saprophyticus* (15305), *Escherichia coli* (35218), *Klebsiella pneumoniae* (10031), *Proteus mirabilis* (43071),

Candida albicans (18804), *C. krusei* (34135) e *C. parapsilosis* (22019), as quais foram disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ, RJ).

3.4.2 Teste de suscetibilidade microbiana

Foi utilizado o teste de disco-difusão em meio sólido, seguindo os procedimentos de Kirby-Bauer (CLSI, 2012). Foram utilizadas placas de Petri contendo 20 mL do meio de cultura, sendo as cepas bacterianas cultivadas em ágar Mueller-Hinton (Himedia[®]), enquanto as fúngicas em ágar Saboraud (Himedia[®]) (CLSI, 2009). Os inóculos contendo os micro-organismos foram suspensos previamente em solução salina estéril a 0,9 % e tais suspensões ajustadas espectrofotometricamente a 625 nm para bactérias (10^6 UFC/mL) e 530 nm para fungos (5×10^4 UFC/mL). Os referidos micro-organismos foram analisados pela técnica de espalhamento em superfície (BAUER *et al.*, 1966), com auxílio de *swabs* estéreis, mergulhados na suspensões contendo os inóculos.

Após este procedimento, discos de papel de filtro estéril (CECON[®], n° 3, \varnothing 6,0mm) foram impregnados, separadamente, com 20 μ L dos respectivos extratos a 100 mg.mL^{-1} . Em seguida, os discos foram secados à temperatura ambiente (26 °C/20 min.) e semeados nas respectivas placas, assim como os discos contendo o controle negativo (DMSO 10%) e o controle positivo. Para este último, foram utilizados discos antibacterianos [cefalotina (30 μ g) para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*; polimixina (300 μ g) para *P. mirabilis*; gentamicina (10 μ g) para *E. coli* e *K. pneumoniae*; 20 μ L de gluconato de clorexidina a 0,12% para *E. faecalis*; e Nistatina (100 UI) para as cepas da espécie *Candida*]. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C/24 h para bactérias e 25 °C/48 h para os fungos, sendo os ensaios realizados em triplicata.

Após a análise da atividade antimicrobiana, as cepas sensíveis aos extratos foram submetidas à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Inicialmente, os respectivos extratos foram redissolvidos utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%, em seguida, em um tubo de ensaio de vidro estéril foram adicionados 5mL do respectivo extrato bruto fluído da casca e 5 mL de água destilada estéril, sendo agitado até a completa homogeneização, obtendo-se uma diluição com concentração final de 50 mg.mL^{-1} do extrato. A partir desta, foram obtidas as demais diluições: 25, 12,5 e 6,25 mg.mL^{-1} , sendo a metodologia adaptada de Stangarlin *et al.* (1999).

Após o período de incubação, as zonas de inibição ao redor dos discos foram medidas com o auxílio de um paquímetro digital. Foi considerada detentora de atividade

antimicrobiana a concentração do extrato que apresentou um halo de inibição de crescimento, igual ou superior a 8,0 mm de diâmetro (LIMA *et al.*, 2004).

4 DADOS E ANÁLISE DA PESQUISA

Após a análise microbiológica, Tabela 1, verifica-se que os extratos de *P. marginatum* apresentaram potencial atividade antimicrobiana frente às cepas *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* e *S. saprophyticus*, sendo esta última resistente ao extrato hidrometanólico. Comparando a eficácia dos extratos, em relação ao diâmetro dos halos, observa-se que o hidroacetônico foi mais efetivo que o hidrometanólico, exceto, quanto a *S. aureus* em todas as concentrações analisadas e *P. mirabilis* na concentração 100 mg.mL⁻¹.

Tabela 1. Médias dos halos de inibição (mm) para os extratos hidroacetônico (EHAPm) e hidrometanólico (EHMPm) das cascas de *P. marginatum* pelo método de disco-difusão em ágar.

Micro-organismos	Concentração mg.mL ⁻¹										C + *	C - *
	EHAPm					EHMPm						
	100	50	25	12,5	6,25	100	50	25	12,5	6,25		
Bactérias												
Gram-positivas												
<i>S. aureus</i>	10,5	9,0	0,0	---	---	16,0	14,0	13,0	10,0	8,0	23,5	0,0
<i>S. epidermidis</i>	14,0	11,0	8,0	---	---	11,5	9,0	0,0	---	---	20,4	0,0
<i>S. saprophyticus</i>	10,5	9,5	0,0	---	---	0,0	---	---	---	---	25,0	0,0
<i>E. faecalis</i>	12,0	10,0	0,0	---	---	11,0	8,0	---	---	---	13,3	0,0
Gram-negativas												
<i>E. coli</i>	0,0	---	---	---	---	0,0	---	---	---	---	28,8	0,0
<i>K. pneumoniae</i>	0,0	---	---	---	---	0,0	---	---	---	---	28,9	0,0
<i>P. mirabilis</i>	8,7	8,0	---	---	---	10,0	7,0	---	---	---	25,8	0,0
Fungos												
<i>C. albicans</i>	0,0	---	---	---	---	0,0	---	---	---	---	12,0	0,0
<i>C. krusei</i>	0,0	---	---	---	---	0,0	---	---	---	---	12,0	0,0
<i>C. parapsilosis</i>	0,0	---	---	---	---	0,0	---	---	---	---	16,0	0,0

* C+ = controle positivo; C - = controle negativo.

Resultados divergentes foram observados na pesquisa de Chaves (2013), utilizando extrato etanólico das cascas de *P. marginatum*, pelo método de microdiluição em caldo,

constatando que o extrato causou a inibição do crescimento e a morte das cepas *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Almeida *et al.* (2012), em um estudo comparativo entre plantas nativas e exóticas da caatinga e mata Atlântica, também constataram que as cepas de *E.coli*, *K. pneumoniae* e *C. albicans* foram resistentes ao extrato etanólico de *P. marginatum*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Leal *et al.* (2011), com extratos hidroalcoólicos das cascas e folhas de *Ceiba glaziovii* Kuntze K. Schum, espécie pertencente à mesma família de *P. marginatum*. A referida espécie apresentou atividade antimicrobiana frente à cepa de *S. aureus*, assim como ineficácia sobre *E. coli* e *C. albicans*.

Ao comparar a eficácia dos extratos da casca, Tabela 1, observa-se que o extrato hidroacetônico foi mais efetivo, apresentando eficácia contra cinco das sete cepas bacterianas avaliadas. Embora acetona e metanol sejam substâncias indicadas para a extração de fitoquímicos, frequentemente com diferentes proporções de água (XU; CHANG, 2007), a diferença de atividade antimicrobiana entre os extratos de *P. marginatum* provavelmente deva estar associada à escolha do solvente utilizado, já que acetona e metanol possuem polaridades diferentes, o que influencia diretamente na quantidade e na taxa desses compostos. Segundo Waterman (1994), a eficiência da extração de compostos fitoquímicos está diretamente relacionada às características químicas destas moléculas e aos procedimentos de extração.

Alguns estudos demonstram ainda diferenças quanto à eficiência de acetona e metanol em relação à extração de compostos fitoquímicos. Keinänen (1993) evidenciou que solução aquosa de metanol a 80% foi mais eficaz para extração de fitoquímicos; enquanto Rocha *et al.* (2011), constataram que a solução aquosa de acetona a 70% foi mais eficiente que a de metanol para a extração das amostras daquele estudo. O que demonstra a importância da escolha do solvente, devendo-se levar em consideração a sua polaridade, para que se obtenha uma extração mais efetiva de compostos fitoquímicos para cada planta.

Estas diferenças de comportamento entre os solventes, sendo a acetona de caráter apolar e o metanol de caráter polar, podem explicar a diferença de atividade antimicrobiana observadas no presente estudo quando comparado aos resultados obtidos por Chaves (2013), ao analisar o extrato etanólico da casca de *P. marginatum*, verificando eficácia contra *K. pneumoniae* e *E. coli*, contrariamente ao observado no presente estudo, ou mesmo, ter relação com o próprio método de microdiluição em caldo, o que favorece uma maior difusibilidade dos extratos ao meio de cultura.

Quanto à técnica de ultrassom adotada neste trabalho, esta tem sido amplamente utilizada, para a extração de compostos fitoquímicos a partir de diferentes partes de plantas

(ALBU *et al.*, 2004; YANG; ZHANG, 2008), já que facilita a liberação de compostos extraíveis e melhora a penetração do solvente e a transferência de massa através da ruptura de membranas biológicas (VINATORU, 2001). Um estudo comparativo mostrou que a extração por ultrassom causou uma menor degradação dos compostos fitoquímicos e também um menor tempo para extração quando comparado com outros métodos de extração (HERRERA; DE CASTRO, 2005). Este é um fator importante a se considerar, já que períodos muito longos de extração e temperaturas elevadas podem aumentar a probabilidade de oxidação dos compostos fitoquímicos, diminuindo o seu rendimento nos extratos (JACKMAN *et al.*, 1987).

Embora *P. marginatum* tenha apresentado resultados negativos em relação a algumas cepas avaliadas a partir dos extratos hidroacetônicos e hidrometanólicos, isso não implica na ausência de alguma potencial atividade antimicrobiana, uma vez que classes de substâncias químicas notadamente possuidoras de tal atividade foram identificadas na espécie em questão (COWAN, 1999; MONTEIRO *et al.*, 2005). Entre tais substâncias, taninos, fenóis, flavonoides, flavonóis, flavanonas, xantonas e alcaloides foram encontrados em *P. marginatum* (CHAVES, 2013). Autores como Bastos (2008) e Mendes (2011) sugerem que fenóis e taninos são substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana em extratos vegetais. Além disso, mecanismos de ação antimicrobiana de alguns produtos naturais, como taninos, fenóis e alcaloides já foram investigados (SAVOIA, 2012), além de serem referidos como substâncias ativas contra diversos micro-organismos (ALMEIDA *et al.*, 2006; VENTURA *et al.*, 2007).

Dentre as substâncias associadas à atividade antimicrobiana em extratos vegetais contra diversos micro-organismos, destacam-se compostos como os flavonóides e os taninos. Os flavonóides, que representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados dentre os produtos de origem natural, desempenham funções importantes nas plantas. Ao uso terapêutico de plantas contendo flavonoides se atribuem várias atividades biológicas, dentre elas a antibacteriana (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; ROSS; KASUM, 2002). Essas substâncias agem sobre a membrana bacteriana e proteínas extracelulares (SAVOIA, 2012). Já os taninos, que são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico, possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides (MELLO; SANTOS, 2001). Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam efeito antimicrobiano (BRUNETON, 1991), formando complexos com proteínas essenciais ao micro-organismo de forma a inativá-las (SAVOIA, 2012).

Ao analisar os micro-organismos resistentes ao efeito dos extratos hidroacetônicos e hidrometanólicos de *P. marginatum* (Tabela 1), verifica-se que estes resultados,

provavelmente, também podem estar associados à própria conformação estrutural das bactérias gram-negativas, as quais apresentam uma membrana externa que pode auxiliar na sua proteção, agindo como uma barreira contra as substâncias ativas presente em extratos de plantas (URZUA *et al.*, 1998), diferentemente dos fungos, a exemplo de *C. albicans*, que, usualmente, formam esporos de resistência quando submetidos a condições ambientais estressantes (LEAL *et al.*, 2011).

Vários autores verificaram que a atividade antimicrobiana de muitas plantas já estudadas é ativa apenas contra cepas bacterianas gram-positivas (VLIETINCK *et al.*, 1995; RABE *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 1999; KELMANSON *et al.*, 2000). Entretanto, também já foram identificados extratos vegetais com atividade tanto para bactérias gram-positivas quanto para gram-negativas (KHAN *et al.*, 2009; KUETE *et al.*, 2010; ABD AZIZ *et al.*, 2011; STEFANOVIC; COMIE, 2012), corroborando com os resultados desta pesquisa, uma vez que foi identificada atividade dos extratos frente a cepas bacterianas gram-positivas e contra uma gram-negativa.

5 CONCLUSÃO

Nas condições de estudo, constata-se que *P. marginatum* é constituída por fitoquímicos capazes de impossibilitar o crescimento de micro-organismos, reforçando o potencial antimicrobiano da casca da referida planta. Evidencia-se a importância de se trabalhar com solventes de polaridades distintas, pois os resultados sugerem a presença de compostos ativos polares e apolares, sendo mais efetivo o extrato hidroacetônico.

Portanto, sugere-se uma maior investigação dos resultados, devendo-se extrair, fracionar, identificar, quantificar, purificar e isolar os fitoquímicos, avaliando sua atividade antimicrobiana e testando-a frente a outros micro-organismos.

RÉSUMÉ

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE D'EXTRAITS HIDRO-ACÉTÔNIQUES ET HYDROMÉTANOLIQUES DE *Pseudobombax marginatum* (A. ST.-HIL., JUSS. & CAMBESS.) A. ROBYNS CONTRE MICRO- ORGANISMES D'INTÉRÊT CLINIQUE.

SOUSA, Adriano Fernandes de¹
FELISMINO, Delcio de Castro²

L'usage inadéquate et indiscriminé des antimicrobiens habituels a contribué de plus en plus pour la résistance à ces substances au cours des dernières années, en résultant des effets importants sur la morbidité, la mortalité et la santé publique. Ce qui stimule et intensifie la recherche des activités antibactérienne dans les extraits de plantes. Par conséquent, cette étude vise à évaluer l'activité antimicrobienne des extraits (hydro-acétonique et hydrométhanolique) obtenus à partir de l'écorce de la espèce végétale *Pseudobombax marginatum* (A. St.-Hil., Juss. & Cambess.) A. Robyns ("Embiratanha"), contre *Enterococos faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *C. kruzei* et *C. parapsilosis*. Les extraits des enveloppes ont été obtenus par la technique de l'ultrason. Le *screening* (dépistage) microbiologique a été réalisée par diffusion disque-agar, dans des dilutions en série. Il a été constaté que les extraits ont montré une potentielle activité antimicrobienne contre les espèces bactériennes et absence d'activité antifongique, étant que l'extrait hydro-acetônique a été plus effectif que l'extrait hydrométanolique. Cette étude souligne l'importance de travailler avec des solvants de polarités différentes. On suggéré une investigation plus approfondie des résultats, il faut identifier, extraire, isoler, purifier, fractionner et quantifier les composés phytochimiques, en évaluant l'activité antimicrobienne et l'en testant contre d'autres micro-organismes.

Mots-clés: Plantes médicinales. Polarité. Résistance microbienne.

-
1. Académique de Pharmacie/Département de Pharmacie/CCBS/Université de l'État de la Paraíba. Email: f.sousa07@gmail.com
 2. Professeur Docteur./Département de Biologie/CCBS/Université de l'État de la Paraíba. Email: dcfelismino@ccbs.uepb.edu.br

REFERÊNCIAS

- ABD AZIZ, S.M.; LOW, C.N.; CHAI, L.C.; ABD RAZAK, S.S.N.; SELAMAT, J.; SON, R.; SARKER, M.Z.I.; KHATIB, A.. Screening of selected Malaysian plants against several food borne pathogen bacteria. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 3, p. 1195-1201, 2011.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASILIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSAFILHO, J. M.. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472-508, 2008.
- ALBU, S. *et al.*. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrason. Sonochem.**, v. 11, p. 261-265, 2004.
- AL-HABIB, A.; AL-SALEH, E.; SAFER, A.; AFZAL, M.. Bactericidal effects of grape seed extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 35, p. 357-364, 2010.
- ALMEIDA, A. C. S., *et al.*. Avaliação bromatológica de espécies arbóreas e arbustivas de pastagens em três municípios do Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2006.
- ALMEIDA, C. F. C. B. R., *et al.*. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 2: p. 201–207, 2012.
- AVORN, J.; SOLOMON, D. H.. Cultural and economic factors that (mis)shape antibiotic use: nonpharmacologic basis of therapeutics. **Ann Intern. Med.**, v. 133, p.128-135, 2000.
- BASTOS, M. L. A.. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro e in vivo e estudo químico biomonitorado de *Piper hayneanum* C.CD.(Piperaceae) e *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae). Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - **Instituto de Química e Biotecnologia**, Universidade Federal de Alagoas, 2008.
- BAUER, A.W. *et al.*. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **AJCP**, v. 45, p. 493-96, 1966.
- BRAOIOS, A. *et al.*. Infecções do trato urinário em pacientes não hospitalizados: etiologia e padrão de resistência aos antimicrobianos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.**, v. 45, n. 6, 2009.
- BRUNETON, J.. **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.
- CASTRO, M. S. *et al.*. Trends in antimicrobial utilization in a university hospital, 1990-1996. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 553-558, 2002.
- CHAVES, T. P. *et al.*. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. **African Journal of Biotechnology**. v. 12, n 8, p. 847-853, 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty-Second Informational Supplement, ninth ed. Document M100-S22, v. 32, n. 23, 2012.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline, second ed.** CLSI Document M44-A, v. 24, n. 15, 2009.

CORRÊA, E.M.; ANDRADE, E.D.. Tratamento odontológico em pacientes HIV/AIDS. **Rev. Odonto Ciênc.**, v.20, n.49, p. 281-289, 2006.

CORRÊA, M., P.. **Dicionário das plantas úteis do Brasil, e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Nacional, v. 4. 1969.

COWAN, M. M.. Plants products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; ALMEIDA, C. S. C.; MIGUEL, M. D.. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 97-103, 2004.

DU BOCAGE, A. L.; SALES, M. F.. A família Bombacaceae Kunth no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Bot. bras.**, v. 16, n. 2, p. 123-139, 2002.

DUARTE, M., C.. Diversidade de *Bombacaceae kunth* no estado de São Paulo- dissertação de mestrado - **Instituto de botânica da secretaria de estado do meio ambiente**. São Paulo, p. 73-74, 2006.

FIDEL, P.L. Jr. Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. **Med. Mycol.**, v. 40, n. 4, p. 359-375, 2002.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry.**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARVEY, R. A; CHAMPE, P. C; FISHER, B. D.. **Microbiologia ilustrada**. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

HEILBERG, I. P.; SCHORN, N.. Abordagem diagnóstica e terapêutica na infecção do trato urinário-ITU. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 1, p. 109-116, 2003.

HERRERA, M. C.; DE CASTRO, M. D.. Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. **J. Chromatogr. A.**, v. 1100, p. 1-7, 2005.

JACKMAN, R. L.; YADA, R.Y.; TUNG, M.A.; SPEERS, R. A.. Anthocyanins as food colorants - a review. **J. Food Biochem.**, v 11, p. 201-247, 1987.

JAWETZ, E.; LEVINSON, W.. **Microbiologia médica e imunologia**. 7. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KEINÄNEN, M.. Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.11, p.1986-1990, 1993.

KELMANSON, J. E.; JAGER, A. K.; VAN STADEN, J.. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.**, v. 69, p. 241–246, 2000.

KHAN, R.; ISLAM, B.; AKRAM, M.; SHAKIL, S.; AHMAD, S. A.; ALI, S. M., SIDDIQUI M.; KHAN, A. U.. Antimicrobial Activity of Five Herbal Extracts Against Multi Drug Resistant (MDR) Strains of Bacteria and Fungus of Clinical Origin. **Molecules**, v. 14, p. 586-597, 2009.

KUETE, V.; POUMALE, H. M.; GUEDEM, A. N.; SHIONO, Y.; RANDRIANASOLO, R.; NGADJUI, B. T.. Antimycobacterial, antibacterial and antifungal activities of the methanol extract and compounds from *Thecacoris annobonae* (Euphorbiaceae). **S. Afr. J. Bot.**, v. 76, p. 536-542, 2010.

KUMAR, K. A.; NARAYANI, M.; SUBANTHINI, A.; JAYAKUMAR, M.. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit peels - utilization of fruit waste. **International Journal of Engineering Science and Technology**, v. 3, p. 5414-5421, 2011.

LATHERS, C. M.. Clinical Pharmacology of Antimicrobial Use in Humans and Animals. **The Journal of Clinical Pharmacology**, n. 42, p. 587- 600, 2002.

LEAL, A. J. B. *et al.*. Estudo fitoquímico antimicrobiano de *Ceiba glaziovii kuntze k. Schum.* BIOFAR. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, n.1. p. 75-76, 2011.

LIMA, E. O. *et al.*. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre dermatófitos isolados de *Tinea capitis*. **Laes & Haes**, v. 25, n. 150, p. 200-212, 2004.

LIN, J.; OPOKU, A.R.; GEHEEB-KELLER, M.; HUTCHINGS, A.D.; TERBLANCHE, S.E.; JAGER, A.K.; VAN STADEN, J.. Preliminary Screening of Some Tradicional Zulu Medicinal Plants for Anti-Inflammatory and anti-microbial activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 267-274, 1999.

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

LORENZI, H.. **Árvores brasileiras**. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Ed. Plantarum, 2002. Vol. 2, 352 p.

MELLO, J. P. C.; SANTOS, S. C.. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Simões, C. M. O.; Schenckel, E. P., orgs.; Ed. UFSC: Porto Alegre; 3ª ed., 2001.

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.

MICHELIN, D.C. *et al.*. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 5, p. 316-320, 2005.

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

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G.. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

OESTERHELT, H. B.. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. **Nature Medicine**, v. 11, n. 10, p. 1082-1087, 2005.

OLIVEIRA, A.C., SILVA R.S.. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n.1, p. 189-197, 2008.

OLIVEIRA, A.D. *et al.*. Resistência bacteriana e mortalidade em um centro de terapia intensiva. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.18, n.6, p. 1152-1160, 2010.

RABE, T.; VAN STADEN, J.. Antimicrobial activity os South African Plants Used for Medicinal Purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p.81-87. 1997.

ROCHA, W. S. *et al.*. Compostos Fenólicos Totais e Taninos Condensados em frutas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B.. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.12, n.1, p.31-42, 2010.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M.. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 19-34, 2002.

SAVOIA, D.. Plant-derived antimicrobial compounds alternatives to antibiotics. **Future Microbiol.**, v.7, p. 979-990, 2012.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G.. **Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas**. 3. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.

STANGARLIN, J. R. *et al.*. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 2, n. 1, p. 16-21, 1999.

STEFANOVIĆ, O.; COMIE, L.. Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2 n. 01, p. 01-05, 2012.

TADEG, H.; MOHAMMED, E. ASRES.; GEBRE-MARIAN, T.. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in treatment of skin disorders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 168-175, 2005.

TAVARES, U. L. N., *et al.*. Prescrição de antimicrobianos em unidades de saúde da família no Sul do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 2008.

URZUA, A.; CAROTI, M.; VASQUEZ, L.; MENDONZA, L.; WILKENS, M.; TOJO, E.. Antimicrobial study of the resinous exudate and of Diterpenoids Isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 31- 47, 1998.

VENTURA, C. P. *et al.*. Atividade antimicrobiana de *Trembleya laniflora*, *Xyris platystachia* e *Xyris pterygloblephora*. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 17-22. 2007.

VINATORU, M.. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. **Ultrason. Sonochem.**, v. 8, p. 303-313, 2001.

VLIETINCK, A. J.; VAN HOOFF, L.; TOTTE, J.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE D.; RWANGABO, P.C.; MVUKIYUMWAMI, J.. Screening of a Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 31-47, 1995.

WANNMACHER, L.. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?** Uso racional de medicamentos: temas selecionados. Brasília, 2004.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S.. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1994.

XU, B. J.; CHANG, S. K.. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **J. Food Sci.**, v. 72, p. 159-166, 2007.

YANG, Y.; ZHANG, F.. Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. **Ultrason. Sonochem.**, v. 15, p. 308-313, 2008.