



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 12, Issue, 03, pp. 54538-54543, March, 2022

<https://doi.org/10.37118/ijdr.23970.03.2022>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

MODULAÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DA ENTRECASCA LIBIDIBIAFERREA

*Samuel Bruno dos Santos

Rua Engenheiro Antônio Gonçalves Soares, 330, Brasil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 06th January, 2022

Received in revised form

21st January, 2022

Accepted 03rd February, 2022

Published online 28th March, 2022

Key Words:

L. ferrea, Antimicrobiano,
Citotóxico, Antioxidante, Sinergismo.

*Corresponding author:

Samuel Bruno dos Santos

ABSTRACT

O surgimento de patógenos multirresistentes aos antibióticos em uso atualmente, vem motivando o estudo dos grupos de metabólitos secundários produzidos por produtos naturais e sua ação farmacológica como uma nova alternativa na busca por agentes antimicrobianos menos tóxicos e mais eficazes e capazes de interagir sinergicamente com os antibióticos comerciais. Neste cenário, destaca-se a *Libidibia ferrea* popularmente conhecida como Pau-ferro, pertencente à família *Fabaceae* e endêmica das regiões Norte e Nordeste do Brasil, objeto deste estudo quanto à sua composição fitoquímica, antimicrobiano, sinérgico e citotóxico. Para tal foram escolhidas as frações FHM e FAE, obtidas de sua entrecasca, que demonstraram através da prospecção fitoquímica, a presença de fenóis, taninos flavobênicos, flavonas, flavononas, xantonas, flavononóis, esteroides livres, triterpenos pentacíclicos e saponinas. A avaliação da atividade antimicrobiana foi feita através do teste de difusão em disco com as frações e cepas padrão ATCC, obtendo a FHM halo de $14,33 \text{ mm} \pm 0,94$ para *P. aeruginosas* e a FAE obteve halo de $15,33 \text{ mm} \pm 0,47$ para *S. aureus* e $15,66 \text{ mm} \pm 0,34$ para *P. aeruginosas*. Para a avaliação da Concentração Mínima Inibitória, a FHM obteve destaque com CIM $0,0125 \mu\text{g/mL}$ para a bactéria *S. aureus* e *E. durans/hirae* e $0,050 \mu\text{g/mL}$ para *P. aeruginosas* e *E. coli* sendo considerado um forte potencial inibitório. Estes mesmos microorganismos e a CIM da FHM, foram testadas associadas aos antibióticos: gentamicina, cirpofloxacina, amoxicilina, cefalotina, apresentando resultado sinérgico/aditivo para a maioria das combinações, com destaque para as combinações com amoxicilina e cefalotina ambas para *S. aureus* e *E. durans/hirae*. Na avaliação da atividade citotóxica pelo método de redução do MTT, nenhuma das concentrações da FHM testadas diminuiu a viabilidade em 75% dos macrófagos J774. Sendo possível concluir que a *L. ferrea* é uma espécie com grande potencial antioxidante, antimicrobiano e sinérgico e além de não apresentar potencial citotoxicidade.

Copyright © 2022, Samuel Bruno dos Santos. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Samuel Bruno dos Santos. "Modulação antimicrobiana do extrato da entrecasca libidibiaferrea", *International Journal of Development Research*, 12, (03), 54538-54543.

INTRODUCTION

O uso de produtos naturais com a finalidade de obtenção de cura e tratamento de doenças remete aos tempos mais antigos e conserva-se até o presente. Tem sido destaque nas instituições de pesquisa brasileiras, a procura por substâncias bioativas visto que o Brasil dispõe de vasta biodiversidade em sua flora, contando com cerca de 22% da diversidade floreira global (Carvalho et al., 2007; Silva; Duarte; Vieira, 2014). A utilização de produtos naturais provenientes de espécies vegetais para o tratamento de doenças, no Brasil, é uma prática que vem sendo promovida por instituições de saúde e vem obtendo crescimento gradual e bastante significativo, principalmente nas últimas décadas, com a inserção delas na atenção básica à saúde (Lima; Gomes, 2014).

Este crescimento alcançou visibilidade devido à implantação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e das Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de saúde (SUS) (Brasil, 2010). As plantas produzem substâncias denominadas metabólitos secundários que desempenham diversas funções fisiológicas no vegetal com exclusivo objetivo de defesa e perpetuação da espécie em resposta aos estímulos ambientais (Dewick, 2002; Alothman et al., 2009). Esses metabólitos, inerentes aos grupos químicos alcalóides, fenólicos e terpenóides, possibilitam inúmeras interações planta-ambiente, planta-planta e planta-patógeno (Schaller; Ryam, 1996) e, em especial, esta última interação, instiga vários pesquisadores a buscarem novos agentes biocidas. Esses grupos de metabólitos são amplamente estudados ante suas atividades bactericida, fungicida, antiparasitária, antiviral e inseticida, já comprovadas (Coutinho et al., 2009). O estudo da estrutura química

desses metabólitos secundários, bem como sua ação farmacológica, contribui com o desenvolvimento do campo da saúde, possibilitando uma nova alternativa na busca por agentes antimicrobianos menos tóxicos e mais eficazes, devido ao surgimento de patógenos multirresistentes aos antibióticos em uso atualmente (Ostrosky et al., 2008). Dentre as famílias promissoras para estudo a Fabaceae é uma das mais amplas, é constituída de mais de 700 gêneros e 19.000 espécies de árvores, videiras e arbustos, com larga distribuição mundial (LPWG, 2007). Inserido nesta família, está o gênero *Libidibia* que possui 500 espécies de árvores distribuídas mundialmente e é caracterizado por ser composto de polifenóis, terpenos, esteroides e substâncias polissacarídicas, responsáveis por suas amplas propriedades biológicas. (Zannin et al., 2012). As principais espécies desse gênero são nativas do Brasil, dentre elas a *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul.), popularmente conhecida como “juçá” e “pau-ferro” (Queiroz, 2009; BFG, 2019), endêmica das regiões Norte e Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba e Pernambuco). Na medicina popular, é utilizada para o tratamento de feridas, contusões, asma, tosse crônica e afecções do trato gastrointestinal (Braga, 1976; Araújo et al., 2014), além disso, ela é uma das plantas inseridas no RENISUS. Isto a torna uma espécie promissora para estudos de atividade biológica antimicrobiana por ser rica em compostos das classes dos terpenos, flavonoides e taninos. Possibilitando através deste estudo, fazer uma triagem fitoquímica, e avaliar seu potencial antimicrobiano, sinérgico e citotóxico.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal e preparação das frações hidrometanólica e acetato de etila: As entrecascas de *Libidibia ferrea* (Mart. Ex. Tul) com sinônimo *Ceasalpinea ferrea* foram coletadas no município de Piranhas/AL e foram identificadas e registradas junto ao Herbário da Universidade federal de Sergipe sob número de ASE: 24706. Logo após a identificação, o material foi seco em estufa com circulação de ar a 37° C até completa desidratação e moídas para a obtenção de pó do material coletado e submetido à extração por maceração exaustiva em etanol 90% durante 5 dias. O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida para eliminação do solvente e obtenção do extrato hidroetanólico da *L. ferrea*. Parte do extrato hidroetanólico foi dissolvida em solução de Metanol/Água (2:3) e submetida à extração líquido/líquido com solventes para obtenção das frações e os solventes utilizados para extração das frações de interesse desse estudo foram metanol e acetato de etila. As frações hidrometanólica e acetato de etila obtidas foram levadas a evaporador rotatório para eliminação do solvente.

Prospecção Fitoquímica: Para determinar a ocorrência dos grupos metabólitos secundários foram aplicados métodos e reações químicas clássicas que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado característico. As reações foram realizadas em 9 tubos de ensaio para cada fração, para a determinação da presença de derivados antracênicos, heterosídeos cardiotônicos, cumarinas, esteróis, flavanoides, seguindo os procedimentos descritos na literatura de Wagner & Bladt (1995); Matos (1997); Shan et al., (2016), para as classes fenóis e taninos (FeCl₃), antocianinas, antocianidinas e flavonoides, flavanonois e xantonas (Mg/HCL concentrado), como descritas a seguir.

Atividade Antimicrobiana: Foram utilizadas cepas padrões de microrganismos gram positivos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25 923), *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae* (SS1225/ IAL 03/10), *Streptococcus mutans* (INCQS 00446) e microrganismos gram negativos *Klebsiella pneumoniae* derivada (ATCC 700603), *Escherichia coli* derivada (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* derivada (ATCC 2783). A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da formação de halos de inibição medidos em milímetros e sua interpretação seguida conforme CLSI (2003) e Santos et al., (2011) onde os halos formados foram comparados com a tabela de referência, classificando assim os microrganismos em relação a determinado agente como: *diâmetro do halo de inibição do*

crescimento ≤ 8 mm (resistente); 9 a 14 mm (intermediário) e). ≥ 14 mm é considerado sensível.

Teste de difusão em disco: Esta avaliação qualitativa foi realizada seguindo a metodologia de Bauer et al., (1996). Foram realizadas culturas overnight de microrganismos mantidas em meio BHI (Brian Heart Infusion) suplementado com ágar (8 g/L) em estufa bacteriológica na temperatura de 37°C ± 1. As culturas foram semeadas com auxílio de swab estéril em placas de Petri contendo 4 mm de ágar Muller-Hinton (pH 7.2-7.4), previamente solidificado e semeado usando alça de Drigalsky. Posteriormente, discos de papel filtro embebidos com 20 µL de cada amostra vegetal, na concentração de 100 mg/mL, foram depositados na superfície do meio de cultura inoculado com os microrganismos. Como controle negativo foram utilizados todos os reagentes em uso para diluição das amostras, enquanto para o controle positivo foi utilizado o fármaco antimicrobiano Gentamicina (20 mg/mL) devido a sua atividade conhecida para cepas padrão ATCC. Após incubação, decorridas 24h, foram realizadas as medidas dos halos de inibição. Para interpretação dos resultados recomendações do CLSI (2003) foram seguidas, onde os valores dos halos de inibição formados foram comparados com os de referência para o teste; sendo os microrganismos classificados como resistente quando o diâmetro do halo de inibição for inferior a 8 mm, intermediário (9 a 15 mm) e sensível (15 – 25 mm) à determinado agente. O teste de difusão em disco é aceito pela FDA (Food and Drugs Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (Nacional Committe for Clinical Laboratory Standards).

Concentração Inibitória Mínima (CIM): Para este teste, foram utilizadas placas de Elisa com 96 poços, esterilizadas e em cada poço foram adicionados 100 µL do caldo Mueller Hinton. Em seguida, foram acrescidos 50 µL das frações nas concentrações de 1-100 µg/mL. Em cada poço também foram adicionados 50 µL do inoculo. Como controle negativo foi utilizado o meio de cultura, averiguar se não há contaminação do meio. O controle positivo foi o meio de cultura com inoculo para verificar a viabilidade das cepas bacterianas testadas. Como outros controles também foram utilizados: 100 µL meio de cultura mais 20 µL de DMSO e 80 µL da suspensão bacteriana, para verificar se o DMSO não inibe o crescimento bacteriano; meio de cultura e extrato na maior concentração (verificar a esterilidade do extrato). Foi utilizado como substância referência o antibiótico gentamicina, e as bactérias que apresentaram resultado no teste de difusão em disco. Em seguida, cada microplaca foi envolvida em plástico filme e incubada a 35 ± 2° C por 24 horas. Após o período de incubação, foram adicionados em cada poço 20 µL de solução aquosa de resazurina 0,01%, previamente preparada. As microplacas foram novamente incubadas, desta vez por 60 minutos e em seguida, foi realizada a leitura visual. A manutenção da coloração azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento microbiano e a cor vermelha/rosa indicou a presença de metabolismo no meio.

Avaliação do efeito sinérgico dos extratos com antimicrobianos comerciais: O método de checkboard é correntemente utilizado para medir a inibição interativa. Neste caso, foi utilizado para determinar a atividade da interação entre a fração ativa que apresentou halo de inibição com diâmetro superior a 7 mm. Neste estudo, o teste foi realizado de forma qualitativa, utilizando discos contendo os antibióticos selecionados impregnados com as CIM's da fração hidrometanólica de *L. ferrea* estabelecidas no teste anterior. Foram selecionados os antibióticos: Gentamicina, Ciprofloxacina, Amoxicilina e Cefalotina, tendo por base para esta escolha, sua disponibilidade na rede básica de saúde. Os discos contendo estes antibióticos foram adicionados às placas contendo as culturas das cepas bacterianas selecionadas e impregnados com as concentrações inibitórias mínimas determinadas anteriormente. A avaliação do crescimento bacteriano foi feita por medição e comparação dos halos de inibição obtidos deste teste com os obtidos pelo teste de difusão em disco utilizando apenas os antibióticos selecionados, tornado este teste uma adaptação dos testes feitos por Palaniappan; Holey (2010). Todos os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados expressos através da média ± desvio padrão obtida dos três ensaios paralelos.

Atividade Citotóxica

A avaliação do efeito citotóxico das hidrometanólica e acetato de etila da *L. ferrea* foram realizados através da exposição, em triplicata, de ambas as amostras à viabilidade das células J774 (2x10⁴ células) durante 24h, através de ensaio colorimétrico da redução do MTT (tetrazole amarelo) à formazan (coloração púrpura) conforme Mosmann, 1983. Para este ensaio, foi utilizada uma placa de Elisa contendo 96 poços para impregnação das células viáveis através de meio de cultura. Após a impregnação, o meio foi substituído por meio de cultura contendo amostras das frações hidrometanólica e acetato de etila diluídos em DMSO 0,5% nas concentrações 20, 100 e 250 µg/mL. Em seguida, as placas foram incubadas por 24h, após este tempo, o meio de cultura foi substituído por 200µL de solução 0,5 mg/mL do corante MTT, previamente filtrado em membrana milipore de 0,22 µm. As placas preparadas previamente com a metodologia acima, foram incubadas por 3h, tempo suficiente para haver a redução do MTT a formazan. Após este tempo, todo o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e foram adicionados mais 200 µL de DMSO a cada poço para a solubilização de formazan. Em seguida, todo conteúdo foi transferido para nova placa e esta foi lida no leitor de ELISA (EnzymeLinkedImmunesorbentAssay) em λ 570 nm. Os resultados analisados foram normalizados de acordo com a equação abaixo, onde: VC e DO correspondem à viabilidade celular e densidade óptica, respectivamente.

$$\% VC = \frac{[DO (\text{células tratadas}) - DO (\text{branco})]}{DO (\text{controle}) - DO (\text{branco})} \times 100$$

Análise estatística: As análises foram realizadas em triplicata e as médias e desvio padrão dos resultados foram obtidos. Os dados foram analisados utilizando as técnicas estatísticas Análise de Variância (ANOVA) e pós-teste Tukey considerando $p \leq 0,05$ para determinar o nível de significância das amostras. Os programas utilizados foram o Microsoft Excel e o programa GRAPH.PAD PRISM 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção Fitoquímica: A triagem fitoquímica é o ensaio inicial e qualitativo que fornece o conhecimento dos constituintes presentes na amostra vegetal. A partir disso, é possível avaliar as classes de metabólitos presentes, designando através de estudos na literatura à qual atividade biológica as substâncias são responsáveis. As informações sobre metabólitos secundários coletadas em uma triagem fitoquímica são de grande importância para o desenvolvimento de pesquisas, podendo levar ao isolamento de princípios ativos viáveis no desenvolvimento de novos fármacos (Silva et al., 2010).

Tabela 1. Resultado da prospecção fitoquímica das frações acetato de etila e hidrometanólica, da entrecasca de *Libidibia ferrea* demonstrando a presença dos seus constituintes químicos

Constituintes químicos	Fração hidrometanólica	Fração acetato de etila
Fenóis	+	+
Taninos Hidrolisáveis	-	-
Taninos Flabobênicos	+	+
Antocianinas/Antocianidinas	-	-
Flavonas/Flavonois/Xantonas	+	+
Chalconas/Auronas	-	-
Flavononóis	+	-
Leucantocianidinas	-	-
Catequinas	-	-
Flavonononas	-	-
Esteróides Livres	-	+
Triterpenóides Pentacíclicos livres	+	-
Saponinas	+	+
Alcalóides	-	-

(+) Presença do metabólito

(-) Ausência do metabólito

A tabela acima mostra o resultado da prospecção fitoquímica realizada para as frações hidrometanólica e acetato de etila obtidas da entrecasca de *L. ferrea* (tabela 1). Para o teste de fenóis e taninos, ambas as frações foram positivas para a presença de compostos fenólicos e a fração acetato de etila demonstrou resultado positivo para a presença de taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos), concordando com a literatura e o estudo de Araujo et al., (2014) que encontraram taninos condensados.

Atividade Antimicrobiana

Difusão em Disco: O método de difusão usado para análise antimicrobiana consiste em colocar a amostra (Frações) em discos de papel, e estes em contato com o meio de cultura sólido inoculado previamente com o microrganismo. Após o período de incubação, o diâmetro do halo de inibição é medido, obtendo de forma qualitativa o resultado da sensibilização do microrganismo à amostra (Santos et al., 2011). Como critério de medidas para determinar o valor do halo de inibição e classificar a suscetibilidade do microrganismo à amostra, Santos et al. (2011) sugeriu o seguinte padrão: diâmetro do halo de inibição do crescimento ≤ 8 mm (resistente), 9 a 14 mm (intermediário) e ≥ 14 mm é considerado sensível. No presente estudo, as frações hidrometanólica e acetato de etila de *L. ferrea* apresentaram atividade antimicrobiana, na concentração de 100 mg/mL conforme pode ser observado na (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antimicrobiana das frações hidrometanólica e acetato de etila da entrecasca de *L. ferrea*, através do teste de Difusão em Disco

Microorganismos	Fração Hidrometanólica	Fração Acetato de Etila
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,66 ± 0,47 mm	15,33 ± 0,47 mm
<i>Enterococcus durans/hirae</i>	4,33 ± 3,29 mm	-
<i>Pseudomonas aeruginosas</i>	14,33 ± 0,94 mm	15,66 ± 0,34 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	7,3 mm ± 0,40
<i>Streptococcus mutans</i>	-	12,0 ± 2,05 mm

Dados referentes ao diâmetro do halo de inibição expressos em média ± desvio padrão da média, expressos em milímetro (mm).

De acordo com o critério de medidas para classificar a suscetibilidade do microrganismo às amostras sugerido por Santos et al. (2001), a fração hidrometanólica da entrecasca de *L. Ferrea* apresentou na concentração de 100 mg/mL atividade antimicrobiana intermediária para a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus*, atividade antimicrobiana sensível para a gram negativa *Pseudomonas aeruginosas* e resistência para a bactéria *Enterococcus duran/hirae* também pertencente a classe das gram positivas. Já para as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Streptococcus mutans*, a fração hidrometanólica não apresentou nenhuma atividade, mostrando-se ineficaz para o tratamento destes microrganismos, se usada isolada. A fração acetato de etila demonstrou atividade antimicrobiana forte (sensível) para as bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus*, e *Streptococcus mutans* e atividade antimicrobiana intermediária para a gram negativa *Pseudomonas aeruginosas*; resistência para a *Escherichia coli* e nenhuma atividade para a *Klebsiella pneumoniae*. Ferreira & Soares (2014), citam a maioria das bactérias gram negativas, como resistentes a maioria dos extratos de produtos vegetais, principalmente a *E. coli*. Marreiro et al (2014) destaca a forte atividade antimicrobiana do extrato etanólico dos frutos de *L. ferrea* frente aos microrganismos *S. aureus*, *P. aeruginosas* e *E. coli* atribuindo esta atividade aos terpenos encontrados na amostra. A presença destes metabólitos nas amostras foi sugerida pela prospecção fitoquímica (triterpenos pentacíclicos). Os terpenos são compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas, tem nelas a funcionalidade de defesa e/ou atração (Simões, 2007). Além dos terpenos, a classe dos flavonoides também é responsável por esta atividade, este grupo é bastante conhecido dentre os metabólitos de produtos naturais quando se fala de atividade antimicrobiana, por ser capaz de se complexar com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular das bactérias (Coelho et al,

2010). Colacite, (2015), cita os taninos e os flavonoides como principais responsáveis pelo potencial antimicrobiano de produtos naturais, embora haja outros compostos químicos capazes de inibir o crescimento microbiano. A pequena atividade antimicrobiana e/ou a falta de resultados para alguns microrganismos podem ser atribuídos a vários fatores como: as características físico-químicas das frações utilizadas, a ausência ou presença de alguns grupos de metabólitos secundários, que podem variar na planta de acordo com sua idade, tempo de coleta, época da coleta, local entre outros fatores (Blank et al., 2007), como também ao fato de as plantas produzirem uma atividade antimicrobiana menos potente que a dos antibióticos produzidos por bactérias e fungos (Hemaiswarya et al., 2008), além da espécie de microrganismo testada.

Concentração Inibitória Mínima (CIM): Para encontrar a mais baixa concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano foi utilizada a classificação proposta por Aligianis et al., (2001) que propõem uma classificação para produtos naturais baseada nos resultados de CIM, considerando: inibição forte com $CIM \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$; inibição moderada com CIM entre 0,6 e 1,5 $\mu\text{g/mL}$ e fraca inibição com $CIM \geq 1,6 \mu\text{g/mL}$. De acordo com os dados obtidos e expressos na tabela 3, a fração mais promissora dentre as testadas neste estudo, foi a hidrometanólica, pois apresentou concentrações mínimas consideradas como de forte inibição para todas as bactérias testadas (gram positivas e gram negativas), todas as CIMs ficaram dentro da faixa $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ indicada na classificação de Aligianis et al., (2001).

Tabela 3. Concentração inibitória mínima das frações hidrometanólica e acetato de etila da entrecasca de *L. ferrea*

Microorganismos	Fração Hidrometanólica	Fração Acetato de Etila
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,125 $\mu\text{g/mL}$	0,0125 $\mu\text{g/mL}$
<i>Enterococcus durans/hirae</i>	0,025 $\mu\text{g/mL}$	0,0125 $\mu\text{g/mL}$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,050 $\mu\text{g/mL}$	-
<i>Escherichia coli</i>	0,050 $\mu\text{g/mL}$	-

Dados das concentrações expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 4. Halos de inibição dos antibióticos associados às concentrações mínimas inibitórias encontradas para a fração hidrometanólica das entrecasas de *L. ferrea*

	Genta.	Genta.+ FHM	Cipro.	Cipro.+ FHM	Amox.	Amox.+ FHM	Cefa.	Cefa.+ FHM
<i>S. aureus</i>	24 mm \pm 1,22	24,3 mm \pm 0,81	29 mm \pm 0,70	29 mm \pm 1,22	9 mm \pm 0,80	38 mm \pm 1,87	-	39,6 mm \pm 0,40
<i>E. duran/hirae</i>	24,3 mm \pm 0,81	19,6 mm \pm 0,40	35,3 mm \pm 1,80	25 mm \pm 1,22	13,3 mm \pm 0,81	34,6 mm \pm 0,40	9,6 mm \pm 0,40	35 mm \pm 0,81
<i>P. aeruginosas</i>	22 mm \pm 1,22	13 mm \pm 0,70	35,6 mm \pm 0,81	34 mm \pm 1,77	19,6 mm \pm 0,48	12,3 mm \pm 1,77	20 mm \pm 0,70	14 mm \pm 1,22
<i>E. coli</i>	25 mm \pm 1,22	17 mm \pm 1,42	35,3 mm \pm 1,08	38,3 mm \pm 1,47	20 mm \pm 0,70	15 mm \pm 0,40	19,6 mm \pm 0,48	19 mm \pm 0,70

Dados referentes ao diâmetro do halo de inibição expressos em média \pm desvio padrão da média, expressos em milímetro (mm).

Sinergismo: A avaliação da atividade sinérgica entre os antimicrobianos tradicionais e os produtos naturais vem sendo empregada como alternativa na pesquisa por novos medicamentos e/ou para aumentar o potencial antimicrobiano destas drogas. Esses estudos relatam que o uso dos extratos combinados com antibióticos tem proporcionado uma redução significativa das concentrações inibitórias mínimas em isolados resistentes de algumas bactérias Gram negativas e Gram positivas (Darwish et al., 2002; Souza et al., 2010). Sabe-se que as plantas produzem em seu metabolismo secundário, uma pluralidade de moléculas com potencial antimicrobiano, porém é curioso observar que a maioria dessas moléculas quando comparadas aos antibióticos produzidos por bactérias e fungos, possuem uma atividade menos potente, mas mesmo assim combatem as infecções com êxito. A possibilidade de uso desses produtos naturais em combinação com os antibióticos tradicionais adotando uma estratégia diferente de ação, como o sinergismo, abre uma nova porta para tratamentos mais eficazes e até com menos efeitos colaterais (Hemaiswarya et al., 2008). A tabela 4 mostra os halos de inibição produzidos pelos antibióticos de uso convencional, para as cepas das bactérias testadas anteriormente e que também obtiveram resultados com a fração hidrometanólica das entrecasas de *L. ferrea* testados na difusão em disco. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) da fração hidrometanólica, foram encontradas para cada um dos microrganismos testado e foram utilizadas em associação com os antibióticos escolhidos frente aos mesmos microrganismos e os halos de inibição promovidos por essas associações foram expressos na tabela 4.

Entre as bactérias gram positivas testadas, a *Enterococcus duran/hirae* se mostrou mais sensível as interações dos antibióticos com a fração hidrometanólica, apresentando efeito sinérgico/aditivo para as interações com amoxicilina e cefalotina, apresentando efeito antagônico na combinação com gentamicina e ciprofloxacina, diminuindo consideravelmente o halo de inibição em relação a ação do antibiótico sozinho.

Já a bactéria *Staphylococcus aureus* apresentou efeito sinérgico/aditivo apenas para as interações com amoxicilina e cefalotina, mantendo os mesmos resultados dos antibióticos isolados para as interações com gentamicina e ciprofloxacina. Em seu estudo, Oliveira et al. (2006) observou que as bactérias gram positivas (*S. aureus* e *S. epidermis*) apresentaram maior sensibilidade às interações dos antibióticos e óleos essenciais selecionados para seu estudo. Lambert (2002) explica que as bactérias gram positivas são mais sensíveis a ação dos antimicrobianos por que sua parede bacteriana geralmente não limita a entrada de moléculas tóxicas, já as gram negativas dispõem em seu sistema de barreira, de uma membrana externa à parede bacteriana constituída por fosfolipídeos, lipossacarídeos e proteínas que concedem certa permeabilidade aos agentes antimicrobianos, que sucedem em uma resistência maior aos antibióticos. Para as bactérias gram negativas foi observado efeito antagônico para a *Pseudomonas aeruginosa* com amoxicilina e cefalotina e *E. coli* com gentamicina e amoxicilina e , todas contendo fração hidrometanólica em sua CIM para o restante das combinações

testadas. Grande parte das combinações da fração hidrometanólica da entrecasca de *L. ferrea* e antibióticos testados, mostraram-se aditivas ou sinérgicas, mostrando que o uso dessas combinações promove uma diminuição da dose mínima necessária para a eficácia dos antimicrobianos. Esta interação, desperta a atenção pela possibilidade de redução dos efeitos colaterais, bem como a redução dos custos dos tratamentos. Desta forma, este estudo aponta uma perspectiva com relação ao uso dos produtos naturais combinados com antibióticos habituais, tendo em vista o aumento do potencial antibiótico das drogas, levando em consideração a espécie do microrganismo avaliado, pois ela interfere nos resultados. Isso tudo reforça a importância dos estudos mais aprofundados com produtos naturais tendo em foco obter o maior número possível de informações específicas do material vegetal, como por exemplo, o seu modo de ação de forma que permita a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nestas interações, pois ainda não há um consenso em relação ao nível de inibição aceitável quando se fala em uso de produtos naturais comparados a antibióticos padrões, alguns autores consideram como sendo um bom potencial aqueles com níveis de inibição maiores que os antibióticos e outros consideram apenas os níveis de inibição semelhantes aos dos antibióticos (Duarte, 2006).

Atividade Citotóxica: A linhagem dos macrófagos J774 foi utilizada para testar a citotoxicidade das frações hidrometanólica e acetato de etila obtidas da entrecasca de *L. ferrea*, o controle negativo foi representado apenas por células e meio e o controle positivo para citotoxicidade por células e DMSO. As respostas dos J774 frente às

diferentes concentrações das frações estão representadas nas figuras 3 e 4, respectivamente. É possível observar um decréscimo na viabilidade celular dos macrófagos expostos a fração acetato de etila nas concentrações 100 e 250 µg/mL, ficando assim abaixo de 60% e apenas a concentração de 20 µg/mL manteve a viabilidade acima de 75%.

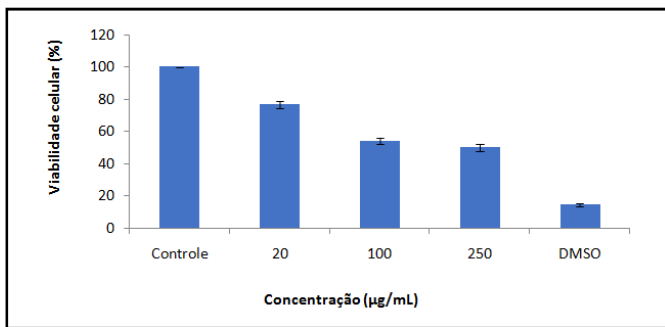


Figura 1. Viabilidade das células J774 após 72h de tratamento com fração acetato de etila da *L. ferrea* em diferentes concentrações (20,100 e 250 µg/mL). Valores de viabilidade celular expressos em %

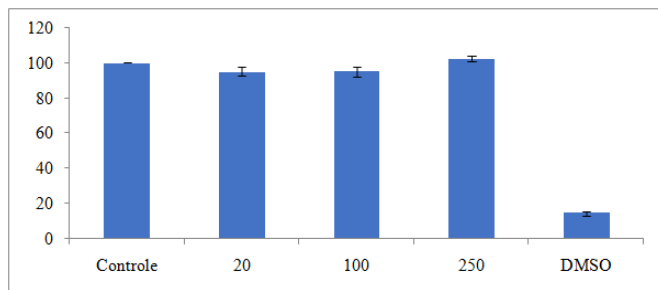


Figura 2. Viabilidade das células J774 após 72h de tratamento com fração hidrometanólica da *L. ferrea* em diferentes concentrações (20,100 e 250 µg/mL). Valores de viabilidade celular expressos em %.

Silva et al., (2014) avaliou a atividade citotóxica do extrato aquoso obtido das folhas e vagens de *L. ferrea* na concentração e 1g/1000 mL e observou efeito citotóxico na concentração de 1g/1000 mL em testes de desenvolvimento celular, retardando o processo mitótico das células testadas. Marreiro et al., (2014) A fração hidrometanólica nas concentrações testadas não apresentou potencial efeito citotóxico, mantendo a viabilidade celular acima de 90% para todas as concentrações (20, 100 e 250 µg/mL). Os resultados obtidos da avaliação da atividade citotóxica para a fração hidrometanólica nas concentrações testadas não apresentou potencial efeito citotóxico, mantendo a viabilidade celular acima de 90% para todas as concentrações (20, 100 e 250 µg/mL), corroborando com os resultados obtidos por Marreiro et al., (2014), que não encontrou potencial citotóxico significativo no extrato da entrecasca da *L. ferrea*.

CONCLUSÕES

Para as frações analisadas neste estudo, foi possível detectar através da prospecção fitoquímica, a presença dos grupos de metabólitos secundários responsáveis pelas atividades biológicas de interesse deste estudo. Tornou assim a espécie *L. ferrea*, uma espécie rica em potenciais atividades biológicas a serem testadas. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que as frações hidrometanólica e acetato de etila obtidas da entrecasca de *L. ferrea*, apresentam potenciais atividades antimicrobianas. Com destaque para a fração hidrometanólica que deteve os melhores resultados para concentração inibitória mínima, o que torna possível o uso de uma concentração menor da fração para obter os mesmos efeitos. Os resultados positivos de sinergismo com antibióticos de uso tradicional para a maioria das combinações testadas transformam a *L. ferrea* com grande potencial terapêutico tendo em vista o aumento do potencial antibióticos dos antibióticos de uso tradicional. No tocante à atividade citotóxica,

nenhuma das concentrações da FHM testadas apresentou citotoxicidade, já para FAE apenas a concentrações de 20 µg não apresentaram citotoxicidade. As concentrações que apresentaram toxicidade proporcionam uma nova alternativa de estudo, tendo em vista o estudo com células tumorais.

REFERÊNCIAS

- ALIGIANS, N.; KALPOUTZAS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, J.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*, v. 115, p. 785-788, 2009.
- ARAÚJO, A. A.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. R. A.; DE SOUZA NETO, M. A.; DA SILVA, G. R.; DE ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; GUERRA, G. C. B.; DE MELO, M. C. N. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *psidium guajava*. *J. Ethnopharmacology*, v. 156, p. 88-96, 2014.
- BARRY, A. L.; THORNSBERRY C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hausner WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadmody HJ 1991. Manual of clinical microbiology. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125, 1991.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibilities testing by standard single disc diffusion method. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, p. 493-496, 1996.
- BLANK, A. F.; COSTA, A. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVES, P. B.; INNECCO, R.; EHLERT, P. A. D.; SOUSA, I. F. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 4, p. 557-564, 2007.
- BRAGA, R. Plantas do Nordeste, Especialmente do Ceará. 2ª edição. São Paulo: Três Press. p. 45-46, 1976.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, p. 546, 2010.
- CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. *T&C Amazônia*, v. 5, n. 11, p. 26-36, 2007.
- CLSI (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- CLSI (CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. 6ª ed. M7-A6, v. 23, n. 2, p. 49, 2003.
- COELHO, M.F.B.; MAIA, S.S.S.; OLIVEIRA, A.K.; DIÓGENES, F.E.P. Superação da dormência tegumentar em sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart ex Tul. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.5, n. 1, enero-marzo, p. 74-79 Universidade Federal Rural de Pernambuco Brasil, 2010.
- COLACITE, J. Triagem fitoquímica, análise antimicrobiana e citotóxica e dos extratos das plantas: *Schinus terebinthifolia*, *Maydena ilicifolia* REISSEK, *Tabebuia avellanifolia*, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) BRENAN. *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 8, n. 3, p. 509-516. 2015.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v.1, p. 241-256, 2009.
- DARWISH, R M; ABURJAI, T; AL-KHALIL, S; MAHAFAZAH, A. 2002. Screening of antibiotic resistant inhibitors from local plant

- materials against two different strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharm.* v. 79, p. 359-364, 2002.
- DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products – A Biosynthetic Approach*, 3 ed. West Sussex: Wiley, 2002.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Multiciência.* v. 7, 2006.
- FERREIRA, M. R. A., SOARES, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex. Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. *Journal of Medicinal Plants Research.* vol 9 (2), p. 140-150, 2015.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHEIVENTI, A. K.; DOBLE M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine.* v. 15, p. 639-652, 2008.
- LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol Symposium Supplement* v. 92, p. 46S-54S, 2002.
- LIMA, L. O.; GOMES, E. C. Alimento ou medicamento? Espécies vegetais frente a legislação brasileira. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 16, n. 3, supl. I, p. 771-782, 2014.
- LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). A new subfamily classification of the leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66(1), p: 44-77, 2017.
- MARREIRO, R. O. BANDEIRA, M. F. C. L. ALMEIDA, M. C.; COELHO, N. C.; VENÂNCIO, G. N.; CONDE, N. C. O. Cytotoxicity evaluation of a mouthwash containing extract of *Libidibia ferrea*. *Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic.* v. 14, p. 34-42, 2014.
- MARREIRO, R. O.; BANDEIRA, M. F. C. L.; SOUZA, T. P.; ALMEIDA, M. C.; BEMDAHAM, K.; VENÂNCIO, G. N.; RODRIGUES, I. C.; COELHO, C. N.; MILÍRIO, P. S. L. L.; OLIVEIRA, G. P.; CONDE, N. C. O. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of na ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. *Clin. Cosmet. Invest. Dent.*, v. 6, p. 9-13, 2014.
- MATTOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: Edições UFC. Ministério da Agricultura. Secretaria de desenvolvimento rural – SDR. Programa de apoio à produção e exportação de frutas hortaliças, flores e plantas ornamentais. 1997.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 77-82, 2006.
- OSTROSKYY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.1 8, p. 301-3017, 2008.
- PALANIAPPAN, K.; HOLLEY, R. A. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. *Intern. J. of Food Microb.* v. 140, p. 164-168, 2010.
- QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga. 1. Ed. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, v.1. p. 443, 2009.
- SANTOS, R. L.; GUIMARAES, G. P.; NOBRE, M. S. C.; PORTELA, A. S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.13, n.4, p.486-491, 2011.
- SCHALLER, A.; RYAM, C. A. Systemin-a polypeptide signal in plants, *Bioessays.* v. 18, p. 27–33, 1996.
- SHAN, A. Y. K.; ALMEIDA, E. C. V.; SANTOS, A. L. L. M.; LIMA, A. C. B.; SANTOS, C. C. S.; SOUZA, M. T. S.; DAMASCENA, N. P.; ARAÚJO, S. SS.; SANTOS, J. L.; PAIXÃO, M. S.; MARÇAL, A. C.; QUINTAS JUNIOR, L. J.; ARAUJO, B. S.; ESTEVAM, C. S. Antioxidant and antinociceptive effect of the hydroetanolic extract and frations of the bark of *Bowdichia virgilioides* in orofacial pain. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* Vol. 10 (15), p. 320-329, 2016.
- SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. Celastráceas: Fontes detriterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 5, p. 1205-1220, 2014.
- SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 31, p. 669-682, 2010.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*, 6ª ed., Ed.Universidade/UFRSC/ED. UFSC, Porto Alegre, 2007.
- SOUZA, E O.; BARRETO, S. F.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara Linn* e *Lantana montevidensis Briq* na resistência de aminoglicosídeos. *Rev. Bras. Bioc.* v. 9, p. 1-5, 2010.
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis- a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer, 1995.
- ZANIN, J. B. L.; CARVALHO, B. A.; MARTINELLI, P. S.; SANTOS, M. H.; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P.; VIEGAR JR, C.; SOARES, M. G. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpiniaaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. *Molecules*, v. 17, p. 7887-7902, 2012.
