

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FOLHA DA *Aspidosperma pyrifolium* Mart. ATRAVÉS DE ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS MÉTODOS DE DIFUSÃO EM DISCO E DE CAVIDADE EM PLACA

Ingrid Mayara da Cunha Brito¹; Ketley Cristinne Araújo Albuquerque²; Luís Augusto Pereira Silva³; Delcio de Castro Felismino⁴.

¹ Departamento de Biologia/Universidade Estadual da Paraíba, ingridcunha1840@gmail.com

² Departamento de Biologia/Universidade Estadual da Paraíba, ketleycristinne@hotmail.com

³ Departamento de Biologia/Universidade Estadual da Paraíba, luisaugusto_cg@hotmail.com

⁴ Professor do Departamento de Biologia/Universidade Estadual da Paraíba, Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, CEP 58429-500, Campina Grande-PB, Brasil. dcfelismino@ccbs.uepb.edu.br

Resumo: O uso descontrolado de antibiótico tem tornado os micro-organismos mais resistentes a esses fármacos, a partir disso as plantas se tornaram um meio viável para o combate desses micro-organismos. A *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Pereiro) é uma planta da Caatinga, popularmente indicada para o tratamento de infecções microbianas. Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de folha da *A. pyrifolium* frente às cepas padronizadas bacterianas e fúngicas, através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e cavidade em placa. O extrato hidroalcoólico das folhas foi obtido por processo de percolação a frio, com álcool a 70° GL, e submetido a rotaevaporação. A avaliação do potencial antimicrobiano do extrato foi realizada pelos métodos de difusão em disco e cavidade em placa, sendo cada ensaio realizado em triplicata. Para o ensaio antimicrobiano, o extrato foi testado frente a cepas padronizadas de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) e fungos (*Candida tropicalis*, e *C. albicans*). Constatou-se efeito antimicrobiano, em ambos os métodos, do extrato à 100% de sua concentração, frente as cepas *Salmonella. sp.*, *Proteus vulgaris*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*. Os halos variaram de 10,0 a 13,0 mm, sendo o método em cavidade em placa mais efetivo em relação ao de disco. Portanto, *A pyrifolium* apresenta perspectiva para a obtenção de antibióticos naturais, recomendando-se estudos mais detalhados.

Palavras-chave: Resistência microbiana, Pereiro, Micro-organismos.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos tem aumentado de maneira descoordenada nas últimas décadas. Essa resistência se desenvolve devido habilidade das cepas bacteriana se adaptarem através de mutações. O uso indiscriminado de antibióticos aumenta a pressão seletiva e, também, a oportunidade da bactéria ser exposta aos mesmos. Aquela oportunidade

facilita a aquisição de mecanismos de resistência (SANTOS, 2004).

De acordo com Oliveira (2008), a composição bioquímica da parede celular bacteriana também pode estar relacionada com a resistência, no qual se confere impermeabilidade a determinadas substâncias. Esta característica pode ser aumentada pela diminuição de receptores da membrana dos patógenos para antibióticos e pela existência

de proteínas específicas para a exportação de substâncias nocivas ao metabolismo celular, as bombas de fluxo.

Devido a estrutura química que difere dos antibióticos derivados de microrganismos, os antibióticos vegetais podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas.

Desde o início da humanidade, o homem primitivo sempre buscou na natureza as soluções para os diversos males que o assolava, fossem esses de ordem espiritual ou física (ALVIM et al, 2006). Levando em consideração que, a cada dia, as bactérias se tornam mais resistentes, os pesquisadores tem buscado na natureza respostas para esse problema, onde as plantas se tornaram fontes alternativas, para produção de novos antibióticos.

A espécie *Asdiosperma pyrifolium* Mart., pertence à família Apocynaceae (BRAGA, 1976), planta conhecida popularmente como pereiro, pau-pereiro, pereiro-branco, pereiro-preto, pereiro-vermelho, pereiro-de-saia, pau-de-coaru, pequiá-da-mata, peroba-rosa e trevo (LORENZI, 1998). A árvore pode atingir até 5 metros de altura, sua madeira é amplamente empregada para serviços de carpintaria (BRAGA, 1976).

Segundo Medeiros (2007), é uma espécie de planta natural da região do Semiárido do Nordeste do Brasil, frequentemente utilizada pela medicina popular no tratamento de enfisema, bronquite, pneumonia, dispnéia asmática, cardíaca, estomacais, inflamações do trato urinário, popularmente utilizado como abortífero e no tratamento de doenças (CRAVEIRO; MATOS; SERUR, 1983; DEUTSCH et al., 1994; DANTAS; FELISMINO; DANTAS, 2007). Essa planta tem sido alvo de estudos, devido a presença de compostos fitoquímicos provenientes de seu metabolismo secundário (BESSA et al., 2013). Com relação aos efeitos farmacológicos, possui atividade bloqueadora adrenérgica, antineoplásica, hipotensora e na disfunção erétil (SOUSA et al., 2007, LIRA, 2010).

Tendo em vista a necessidade de novos meios antimicrobiano, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da folha de *Asdiosperma pyrifolium* frente às cepas padronizadas bacterianas e fúngicas, através de análise comparativa entre os métodos de difusão em disco e cavidade em placa.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do estudo

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia/Centro de

Ciências Biológicas e da Saúde/Universidade Estadual da Paraíba.

Obtenção do material vegetal

A coleta das folhas foi realizada no Sítio Cardoso, município de Massaranduba/Paraíba, situado entre as coordenadas 7° 13.345'S e 35° 49.703'O, com altitude de 418 m acima do nível do mar.

As folhas foram submetidas à secagem em estufa de ventilação forçada à temperatura de 40 °C. Após a secagem, o material foi triturados em moinho do tipo faca, e peneirados em tamis de numeração 10 mesh. Posteriormente, o referido pó foi utilizado na obtenção do extrato vegetal.

O extrato hidroalcoólico foi obtido por percolação a frio (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2003; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1990), utilizando como solvente etanol a 70 °GL, onde permaneceram em repouso, sob o abrigo da luz, por quatro dias. As amostras foram filtradas em papel filtro e concentradas em rotaevaporador (CAMPOS et al., 2011; CARVALHO, 2001) a 60° C e 40 rpm até a redução de 1/4 do volume do solvente. A partir do extrato a 100,0 % (v/v), por diluição seriada, foram obtidas as demais concentrações a 50; 25; 12,5; 6,25.

Análise microbiológica

Foram utilizadas cepas-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) *Salmonella sp.* (19430), *Serratia marcescens* (14756), *Proteus mirabilis* (43071), *klebsiella pneumoniae* (4352), *Pseudomonas aeruginosa* (25668), *Escherichia coli* (25922), *Candida albicans* (18804) e *Candida tropicalis* (13803), disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ–RJ), sendo reativadas, seguindo as recomendações da referida Fundação.

A suspensão de cada micro-organismo foi obtida transferindo-se as culturas crescidas sobre o meio de cultura, com alça estéril, para um tubo de ensaio contendo 3 ml de solução salina 0,9% estéril. O inóculo microbiano foi então padronizado de acordo com National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI, 2005), em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm para suspensões bacterianas, e de 530 nm para suspensões fúngicas, onde as referidas suspensões foram diluídas de modo a obter-se uma preparação microbiana com concentração final próxima a 10⁶ UFC mL⁻¹ (BAUER et al., 1966; HADACECK; GREGER, 2000)

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram testados os métodos de difusão em meio sólido utilizando-se discos e cavidades em placa (método do poço).

O método de disco foi realizado seguindo os procedimentos de Kirby-Bauer (NCCLS/CLSI, 2005), sendo utilizadas placas de Petri contendo 20mL de Müller-Hinton para as bactérias, e para os fungos, caldo Sabouraud dextrose. Nos quais foram inoculadas as respectivas cepas, pela técnica de espalhamento em superfície (BAUER et al., 1966). Após este procedimento, discos de papel de filtro estéreis (n°3 e ø6,0mm) foram impregnados, separadamente, com 20µL do extrato das folhas, esperando-se 20 minutos antes de distribuí-los nas placas.

No método de cavidades em placa, 20mL do meio de cultura foram distribuídos uniformemente em cada placa. Após solidificação dos respectivos meios de cultura, os inóculos foram espalhados sobre o respectivos meios de cultura sólidos. Em seguida, procedeu-se a formação das cavidades, usando-se canalículas (ø6,0mm), nas quais foram colocados 50µL dos extratos das folhas de *A. pyrifolium*.

Para ambos os ensaios, como controle negativo foi utilizado disco de papel de filtro estéril (n°3 e ø6,0mm), impregnados em solução de álcool etílico hidratado a 70 °GL.

Em seguida, as placas foram incubadas a temperatura de 37 °C/48 horas para as bactérias, e ±26 °C/24 horas para os fungos, sendo os ensaios realizados em triplicata.

Análise dos dados

Os diâmetros dos halos de inibição (mm), de cada ensaio, foram aferidos por halômetro, sendo considerada como possuidora de atividade antimicrobiana aquela concentração do extrato que apresentou um halo de inibição de crescimento igual ou superior a 8,0mm de diâmetro (NCCLS/CLSI, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análise dos resultados, observou-se que o extrato hidroalcoólico, em ambos os métodos, apresentou efetividade a 100% de sua concentração, frente aos microorganismos Gram-negativos, *Salmonella sp.*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aureginosa* e *klebsiella pneumoniae*, os quais apresentaram halos de inibição pelo método em disco de 11,0; 12,0; 10,0; 10,5 e 10,0 mm, e método em cavidade de 13,0; 12,5; 11,0; 11,5 e 12,5 mm; respectivamente. Entretanto, o extrato não obteve efeito frente a *Escherichia coli*, *Candida. albicans* e *C. tropicalis*.

Os halos de inibição variaram de 10,0 a 13,0 mm, nota-se que, o método cavidade em placa produziu as maiores médias aritméticas de tamanho dos halos (11,0-13,0 mm) sendo mais efetivo em relação ao de disco (10,0-11,0 mm).

O método de cavidade em placa se baseia na difusão radial das substâncias, e a presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada é muito menos provável de interferir com a difusão da substância antimicrobiana no ágar que no disco de papel de filtro. De acordo com (VANDEN BERGHE; VLIETINCK, 1991) o método da cavidade em placa é o mais adequado para testar a difusão de substâncias em extratos etanoicos de plantas. (SILVEIRA et.al., 2005). O método de difusão em cavidade em placa aponta maior sensibilidade em relação ao método de disco difusão. (ESTRELA, 2000).

Observa-se que o método de difusão, empregados em disco e cavidade em placa para obtenção dos resultados, ambos demonstraram o êxito desejado, apesar de notasse que o método de difusão em cavidade em placa apresentou halos de maiores proporções. O método de difusão em ágar não oferece condições de igualdade para se comparar substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas. Analisando substâncias com diferentes capacidades de difusão e dissociação, este pesquisador observou que algumas substâncias apresentam dificuldades de difusão e dissociação em ágar. (RIBEIRO; SOARES, 2000).

Entretanto essas diferenças não são comprovativas que um método apresente

melhor eficácia que o outro, isso apenas demonstra que em relação ao o uso de extratos a técnica de difusão em cavidade em placa possui um melhor desempenho.

Ensaio farmacognóstico observou-se a presença de vários metabólitos secundários como: taninos condensados, flavonóides, alcalóides, quinonas, esteróides livres e triterpenos (BERNARDES, 2005), a ocorrência de estruturas alcalóidicas é característica da família Apocynaceae (PEREIRA et al., 2007). Esses compostos químicos são provenientes do metabolismo secundários presentes nas plantas. Os quais ajudam no processo de cura de feridas, queimaduras e inflamações, através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada” (SIMÕES et al., 2001). O extrato da *A. pyrifolium* apresentou características antimicrobianas, provavelmente devido à presença desses compostos fitoquímicos.

Entretanto, extrato não apresentou um controle inibitório mínimo (CIM), apresentando o efeito antimicrobiano apenas a 100% de sua concentração. Isso ocorre provavelmente, devido à baixa concentração de compostos fitoquímicos nas folhas das plantas, onde as maiores concentrações desses compostos estariam no caule do pereiro, podemos acrescentar que, o período de coleta

das partes vegetais, temperatura, estação do ano e tipo de solvente, são fatores que influencia na concentração desses compostos (MACHADO, 2012).

Outro fator que pode ter influenciado o resultado, foram os micro-organismo utilizados, as bactérias gram-negativas por apresentarem uma estrutura complexa evita a ação dos compostos fito químicos no interior dos micro-organismos, a presença de uma parede celular menos espessas, composta por peptidoglicano (SALTON; KIM, 1996) que proporciona certa rigidez a parede celular desses organismos, e, protege o citoplasma das variações de pressão osmótica, a membrana externa dessas bactérias, possui uma característica isolante evitando a perda de proteínas e a ação de enzimas hidrolíticas, proporcionando resistência a bactéria.

Segundo Machado (2012), 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 das folhas (alterada por condições de solo, sazonalidade, tipo de colheita e teor de ativos) ou mesmo da menor sensibilidade dos micro-organismos.

CONCLUSÃO

Constatou-se efeito antimicrobiano, em ambos os métodos, do extrato à 100% de

sua concentração, frente as cepas *Salmonella* sp., *Proteus vulgaris*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*. Os halos variaram de 10,0 a 13,0 mm, sendo o método em cavidade em placa mais efetivo em relação ao de disco. Portanto, *A. pyrifolium* apresenta perspectiva para a obtenção de antibióticos naturais, recomendando-se estudos mais detalhados.

AGRADECIMENTO

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) por disponibilizar as cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) necessárias à realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, N. A.T, F. et al.. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Rev Latino-AM Enfermagem**, p. 3–14, 2006.
- 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. Chapter 2.
- BAUER. A. W. et al.. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single

disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45. p. 493-96, 1966.

BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde-Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 15, n. 4, supl. 1, p. 692-707, 2013.

BRAGA, R.. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceara**. 3. ed. Mossoró-RN: ESAM. 1976.

CAMPOS, M. S. et al.. Estudo fitoquímico e biológico do extrato etanólico de *Solanum cernuum* Vell (Solanaceae). **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 7, n. 13, 2011.

CARVALHO J. L. S.. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium offi cinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2001.

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**. Campina Grande, 2012. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Graduação em Farmácia,

Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, 2012.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M.. Alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 6, p. 1526-1528, 1983.

DANTAS, I. C.; FELISMINO, D. C.; DANTAS, G. D. S.. Plantas medicinais. In: DANTAS, I. C. (Ed.). **O raizeiro**. Campina Grande-PB: EDUEP, p. 57-404. 2007.

DEUTSCH, H.F. et al. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **Journal Pharmacology and Biomedical Analysis**, v.12, n. 10, p.1283-1287, 1994.

ESTRELA, C.R.A. **Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares**. Goiânia, 2000. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia-GO, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4^a ed. Parte II. Fasc. 5. São Paulo-SP: Editora Atheneu. 2003.

HADACEK, F.; GREGER, H.. Testing antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem. Anal.** v. 11, p. 137-147, 2000.

LIRA, S. R. S.. **Estudo farmacológico dos efeitos gastrointestinais e comportamentais do lupeol e da dilactona do ácido valonéico,**

isolados de *Cenostigma macrophyllum* Tul., em roedores. Fortaleza, 2010. 198 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2010.

LORENZI, H.. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa-SP: Plantarum, 1998. v.2.

MEDEIROS, V. F. **Potencial larvicida de extratos de plantas regionais no controle de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae).** Natal, 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2007.

NCCLS/CLSI. **National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2005. Disponível em: <<http://www.contractlaboratory.com>>.

Acesso em: 10 Abr. 2016.

OLIVEIRA, S.. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem.** v. 10, n. 1, p. 189-197, 2008. Disponível em: <https://www.fen.ufg.br/fen_revista/v10/n1/v10n1a17.htm>. Acesso em: 04 Nov. 2015.

PEREIRA, M. M. et al.. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). **Quim. Nova**, v. 30, n. 4, 970-983, 2007

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R.. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica.** 3ed. Lisboa-PT: Fundação Calouste Gulbenkian. 1990. v. 1.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R.. **Microbiologia prática:** roteiro e manual. São Paulo-SP: Atheneu. 2000.

SANTOS, N. Q.. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**, 13, n. esp., p. 64-70, 2004.

SILVEIRA, P.M. et al.. Acumulação de nutrientes no limbo foliar de guandu e estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.35, n.3, p. 130-138, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre-RS: UFSC. 2010.

BERNARDES, W.A. **Estudo fitoquímico, ensaios farmacognóstico, e avaliação da atividade tripanocida de extratos de *Aspidosperma macrocarpon* Mart. (Apocynaceae).** 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Ciências – Universidade de Franca, São Paulo.

SOUSA, C. M. M. et al.. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, 2007.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J.. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P.M.; HARBONE, J. D. (Eds), **Methods in**

plant biochemistry, London: Academic
Press, p. 47-69. 1991.