



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA

CARLOS CÉSAR DA SILVA

ESTUDO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DE *Erythroxylum subrotundum* SOBRE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa*.

CAMPINA GRANDE, PB

2019

CARLOS CÉSAR DA SILVA

ESTUDO *IN VITRO* DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DE *Erythroxyllum subrotundum* SOBRE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa*.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Campina Grande – Campus I, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Medicina.

Orientador (a): Prof. Dra. Cristina Ruan Ferreira de Araújo

CAMPINA GRANDE, PB

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial do HUAC - UFCG

S586e

Silva, Carlos César da.

Estudo *in vitro* da ação antibacteriana de *Erythroxyllum subrotundum* sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* / Carlos César da Silva – Campina Grande, 2019.

54f.; il.; tab.

Monografia (Graduação em Medicina) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Unidade Acadêmica de Ciências Médicas, Curso de Medicina, Campina Grande, 2019.

Orientadora: Cristina Ruan Ferreira de Araújo, Dra.

1.Resistência microbiana a medicamentos. 2.Testes de sensibilidade microbiana. 3.Extratos vegetais. I.Título.

BSHUAC/CCBS/UFCG

CDU 616-008.87(043.3)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CAMPINA GRANDE

ANEXO VI

Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

Às 11:00 horas do dia 11/06/2019, nas dependências do Hospital Universitário Alcides Carneiro, da Universidade Federal de Campina Grande, Paraíba, realizou-se a defesa do TCC intitulado:

ESTUDO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO DE ERYTHROXYLUM SU PROTUNDUM SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS E PSEUDOMONAS DEWINDA

de autoria do(s) aluno(s):

CARLOS CÉSAR DA SILVA

sendo orientados por:

CRISTINA RUAN FERREIRA DE ARAÚJO

E Co orientador:

Estiveram presentes, os seguintes componentes da Banca Examinadora:

MAYRA GOMES MONTEIRO
SAULO RIOS MARIZ

Iniciados os trabalhos, o Presidente da Banca Examinadora, Professor(a) Orientador(a) sorteou o aluno:

CARLOS CÉSAR DA SILVA

passando a palavra ao mesmo para iniciar a apresentação, que teve 30 minutos para fazê-lo. A apresentação durou 30 minutos, após a qual foi iniciada a discussão e arguição pela Banca Examinadora. A seguir, os discentes retiraram-se da sala para que fosse atribuída a nota. Como resultado, a Banca resolveu APROVAR o trabalho, conferindo a nota final de 9,75. Não havendo mais nada a tratar, deu-se por encerrada a sessão e lavrada a presente ata que vai assinada por quem de direito.

Campina Grande, 11 JUNHO 2019.

Orientador

Cristina Ruan Ferreira de Araújo

Titular 1

Mayra Gomes Monteiro

Titular 2

S. R. Mari

Suplente

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Av. Juvêncio Arruda 795 - Bodocongó - Campina Grande - Paraíba - CEP 58109-790

Dedico este trabalho a Deus que me deu o dom da vida para que pudesse usufruir de oportunidades como esta. Concluir um curso de medicina em uma Universidade Federal de ensino é uma honra para mim. Dedico também aos meus pais que me ensinaram a ser um espírito livre para que pudesse ver o mundo com meus próprios olhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço á minha família por todo suporte e dedicação durante esses seis anos de faculdade que não foram fáceis.

Á minha mãe que apostou em mim e não hesitou em me apoiar quando lhe disse que abandonaria minha vida e meu emprego estáveis, na época, para ir atrás de um sonho em uma terra distante. Ela abandonou a aposentadoria e não mediu esforços para me ajudar. Sem sua garra não teria sido possível

Ao meu pai que de algum lugar desse universo sem fronteiras cuida de mim. Seus ensinamentos e seu espírito livre construíram em mim a coragem necessária para enfrentar o mundo sem temores.

A todos os colegas de curso de compartilharam os momentos alegres e as lutas.

A todos os professores do curso de Medicina da UFCG que contribuíram com seu saber e sua sabedoria. Vocês fazem parte do meu “eu” médico.

À professora Cristina Ruan Ferreira de Araújo pelos ensinamentos, orientações e dedicação.

A Fagner, estagiário do laboratório multidisciplinar, onde este trabalho foi desenvolvido, por todo o apoio, contribuição e paciência sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, que financiou o projeto e concedeu a bolsa PIBIC/CNPq/UFCG.

Onomashivaia: "Eu reverencio a Deus que habita em mim da maneira que eu sou".

Princípio Indu.

RESUMO

Desde as civilizações primitivas que as potencialidades terapêuticas das espécies do reino vegetal são conhecidas e exploradas, seja na forma de chás, unguentos ou mesmo como os modernos medicamentos de hoje. As espécies do gênero *Erythroxylum* são conhecidas e utilizadas na medicina popular para o tratamento das mais diversas infecções. *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são microrganismos patogênicos presentes em nosso meio e responsáveis por grande parte das infecções comunitárias e hospitalares. Sua habilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos tem conduzido profissionais de saúde a uma busca incessante por novos fármacos que possam contornar esse problema. Esta pesquisa avaliou atividade antibacteriana *in vitro* do extrato de *Erythroxylum subrotundum* sobre as espécies *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizando-se a técnica da microdiluição o extrato etanólico produzido com as folhas da espécie foi testado nas concentrações de 2000 μ /ml a 15,62 μ g/ml. Verificou-se ausência de atividade antimicrobiana contra as cepas de *Staphylococcus aureus*. As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* testadas apresentaram sensibilidade à ação do extrato sendo a concentração inibitória mínima observada de 250 μ g/ml. É necessário que novos estudos sejam conduzidos para que se avalie a ação de outras frações do extrato e que este possa ser testado frente a cepas clínicas destes microrganismos.

Palavras chave: Resistência microbiana a medicamentos, Testes de sensibilidade microbiana, Extratos vegetais.

ABSTRACT

From early civilizations the therapeutic potential of the species of the plant kingdom are known and exploited, either in the form of teas, ointments, or even as modern medicine today. The species *Erythroxyllum* are known and used in folk medicine for the treatment of various infections. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are pathogenic microorganisms present in our country and responsible for much of the community and hospital infections. Its ability to acquire resistance to antibiotics has led health professionals to an unceasing search for new drugs that can work around this problem. This research was intended to evaluate the in vitro antibacterial activity of *Erythroxyllum subrotundum* extract on the species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Using the technique of microdilution the hydroethanol extract of the leaves of plant species tested at concentrations of 2000 µg/mL to 15,62 µg/mL. There was no antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The tested *Pseudomonas aeruginosa* strains showed sensitivity to the action of extract with an observed minimum inhibitory concentration of 250 µg/ml. It is necessary that new studies be conducted to evaluate the action of other fractions of the extract and that they can be tested against clinical strains of these microorganisms.

Keywords: Drug resistance microbial, Microbial sensitivity tests, Plant extracts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fotografia 1 - Microplaca com <i>S. aureus</i> após adição de resazurina	25
Fotografia 2 - Crescimento de <i>S. aureus</i> na placa 6.....	26
Fotografia 3 - Microplaca com <i>P. aeruginosa</i> após adição do corante resazurina.....	28
Fotografia 4 - Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> a partir do quadrante E da placa de número 7.....	29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Concentração Bactericida Mínima (CIM) do extrato *Erythroxylum subrotundum* em diferentes concentrações frente cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235)**27**
- Tabela 2** - Concentração Bactericida Mínima (CIM) do extrato *Erythroxylum subrotundum* em diferentes concentrações frente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 29336)**29**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	As plantas como fonte de novos medicamentos	14
2.2	<i>Erythroxylum subrotundum</i>	15
2.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.5	Resistência bacteriana a antimicrobianos	18
3	OBJETIVO	20
3.1	Objetivo geral	20
3.2	Objetivo específico	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Desenho do estudo	21
4.2	Material botânico	21
4.3	Preparo do extrato de <i>Erythroxylum subrotundum</i>	21
4.4	Linhagens bacterianas testadas	22
4.5	Avaliação da atividade bacteriana	22
4.5.1	Meio de cultura	22
4.5.2	Preparação da suspensão microbiana	22
4.5.3	Inóculo Microbiano	23
4.5.4	Microdiluição	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	25
5.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32
	ANEXO 1 – MODELO DE ARTIGO	38

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é resultado do íntimo contato do homem com a natureza. Este saber e prática, acumulado pela sociedade há gerações, possibilitou o desenvolvimento de civilizações e ainda permite a sobrevivência de comunidades que habitam regiões isoladas e onde há carência de recursos em saúde (ORANTES-GARCIA et al., 2018).

No âmbito acadêmico é histórica a convicção das potencialidades do uso de espécies vegetais para o desenvolvimento de novos medicamentos. As plantas fizeram e ainda fazem parte da vida do homem desde os primórdios da humanidade sendo inegável sua importância em seus diversos estágios evolutivos (SIMÕES, SCHENKELL, 2002).

A diversidade das estruturas químicas de produtos naturais fornece inúmeras oportunidades para a descoberta de novos compostos que apresentem atividade biológica. Os metabólitos secundários produzidos por bactérias, organismos marinhos e plantas são uma fonte promissora para exploração de novos medicamentos (KURUPPU, PARANAGAMA, SILVA, 2019).

A família Erythroxylaceae comporta aproximadamente 240 espécies divididas em quatro gêneros: *Aneulophus*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum*. e *Pinacopodium*. No Brasil são encontradas mais de cem espécies com prevalência na Mata Atlântica e região nordeste (COSTA - LIMA, LOIOLA, JARDIM, 2014; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

As espécies do gênero *Erythroxylum* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de piodermites, ausência de fluxo menstrual, hemorragias, infecções renais e respiratórias (BARBOSA et al., 2014; ARAUJO et al., 2012; SILVA et al., 2001; RODEIRO et al., 2008).

Os antibióticos representam um grupo de medicamentos indispensável a vida. Sem eles crianças prematuras teriam pouca chance de vida, muitas cirurgias e transplantes se tornaria inviável, tratamentos oncológicos e imunossupressores causariam infecções graves e os hospitais se tornariam redutos de germes letais. Em suma, sem eles a humanidade voltaria à era pré-antibiótica e perderia anos preciosos na expectativa de vida conquistados ao longo da história (BRITO, CORDEIRO, 2012).

A alta prevalência de infecções justifica a preocupação na busca de recursos que permitam o desenvolvimento de novos métodos de controles específicos para estas patologias (ANTUNES et al., 2006; HAIDA, 2007).

Estima-se que aproximadamente 700.000 mortes relacionadas a patógenos resistentes a antimicrobianos ocorram anualmente. Número esse que pode chegar a 10 milhões na metade do século, caso as tendências atuais se confirmem. Microorganismos resistentes a antimicrobianos já representam uma das mais sérias ameaças à saúde pública (GUO, 2019; FURST, FRANCIS, 2019).

Diante dessa problemática, vários pesquisadores têm intensificado seus estudos no campo da medicina alternativa e voltado seu olhar para a natureza em busca de espécimes animais e vegetais que possam ser fonte de novos compostos bioativos a serem utilizados nessa luta constante contra a resistência bacteriana. (COSTA-LIMA, LOIOLA, JARDIM, 2014; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

Aguiar (2011) ao estudar a ação antibacteriana do extrato metanólico de partes aéreas de *Erythroxylum subrotundum* encontrou que a fase acetato de etila inibiu crescimento de *Staphylococcus aureus* e não apresentou ação inibitória a gram negativos. O que nos levou a questionar se outros tipos de extrato do vegetal apresentaria os mesmos resultados.

Esta pesquisa teve por intento estudar a ação antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico de folhas de *Erythroxylum subrotundum* sobre bactérias das espécies *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 As plantas como fonte de novos medicamentos

Ao longo dos séculos, os seres humanos têm recorrido à natureza para suprir suas necessidades básicas como a produção de alimentos, abrigos, roupas e medicamentos. As plantas formaram a base de sistemas de medicina tradicional que existem há milhares de anos. Os produtos de origem natural são a fonte mais promissora de novas moléculas biologicamente ativas. Estas substâncias apresentam uma diversidade única de estruturas em comparação com aquelas desenvolvidas pela química combinatória em laboratórios. Menos de 10% da biodiversidade mundial foi testada com intuito de avaliar seu potencial biológico e muitos outros compostos aguardam por serem descobertos, sendo um desafio o modo de acesso a essa diversidade química (CRAGG, NEWMAN, 2005; DIAS, URBAN, ROESSNER, 2012).

O convívio com grupos étnicos das mais diversas localidades propiciou a aquisição de conhecimentos que contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa na química de produtos naturais e da relação entre a estrutura química e a atividade biológica das substâncias. A natureza forneceu inúmeros modelos que serviram para fundamentar os estudos de estrutura-atividade e contribuíram para o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (VIEGAS JUNIOR, BOLZANI., 2006).

Quantidade significativa dos medicamentos disponíveis atualmente é derivada direta ou indiretamente de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos e terrestres. Ao analisar os medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2002, constata-se que 28% destes apresentam princípios ativos isolados de produtos naturais ou semissintéticos e que 24% são sintéticos com núcleos orgânicos inspirados em estruturas de moléculas oriundas dos reinos vegetal e animal. Dessa forma, aproximadamente metade dos novos medicamentos lançados nesse período são derivados de substâncias naturais, o que evidencia a importância dessa fonte para pesquisa e desenvolvimento de moléculas que originarão novos medicamentos (NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2000; NEWMAN, CRAGG, SNADER, 2003; CHIN et al., 2006).

As plantas representam as maiores fontes de moléculas orgânicas que podem ser utilizadas no arsenal terapêutico graças à grande diversidade estrutural de metabólitos secundários produzidos e talvez a fonte mais antiga de medicamentos

para o homem. No estudo de novos medicamentos originados de plantas são necessários profissionais das mais diversas áreas devido a gama de conhecimentos implicados em seu desenvolvimento que vão desde aspectos agrônômicos, botânicos, químicos, farmacológicos, médicos e toxicológicos (BRANDÃO et al., 2010).

2.2 *Erythroxylum subrotundum*

A família Erythroxylaceae comporta cerca de 240 espécies divididas em quatro gêneros: *Aneulophus*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum* e *Pinacopodium*. O gênero *Erythroxylum* está amplamente distribuído em regiões tropicais enquanto os demais encontram-se restritos à África, sendo seus principais centros de endemia o Brasil e a Venezuela. No Brasil são encontradas mais de cem espécies, prevalentes na Mata Atlântica e na região nordeste (COSTA-LIMA, LOIOLA, JARDIM, 2014; OLIVEIRA et al., 2011; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

No estado da Paraíba foram registradas 13 espécies: *E. caatingae* Plowman, *E. citrifolium* A. St.-Hil, *E. nummularia* Peyr., *E. paufferrense* Plowman, *E. passerinum* Mart., *E. pulchrum* A. St.-Hil., *E. pungens* O.E. Schulz, *E. revolutum* Mart., *E. simonis* Plowman, *E. suberosum* var. *denudatum* O. E. Schulz, *E. subrotundum* A. St.-Hil. e *E. squamatum* Sw. As espécies são encontradas em diversas formações do estado, como as florestas úmidas da Mata Atlântica, brejos, matas serranas, restingas e Caatinga, como o Cariri Paraibano (LOIOLA et al., 2007).

Encontram-se presentes nas espécies do gênero *Erythroxylum* flavonoides e alcaloides tropânicos, como a cocaína produzida pela *Erythroxylum coca*, esta foi a primeira subespécie do gênero estudada. Após esta descoberta o interesse científico se intensificou devido ao potencial terapêutico dos compostos encontrados. A molécula de cocaína foi identificada em várias espécies do gênero inclusive na *Erythroxylum subrotundum* (BIERI et al., 2006; BOHM et al., 1988).

As ações terapêuticas desta espécie e de outras espécies do mesmo gênero tem sido avaliadas contra uma série de patógenos clinicamente relevantes. Correia e colaboradores (2016) testaram a atividade antifúngica de *Erythroxylum subrotundum* A. St.-Hil sobre espécies de cândida e concluíram que o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* inibiu o crescimento de *Candida glabrata* e *Candida*

parapsilosis ao passo que o extrato aquoso do vegetal apresentou atividade inibitória do crescimento destas mesmas espécies e da *Candida guilliermondii*. Além disso, os pesquisadores também testaram a atividade antifúngica do extrato de *Erythroxylum daphnites* Mart. nestas mesmas espécies de cândida e verificaram inibição do crescimento de *Candida glabrata* pelo extrato aquoso do vegetal. Nestes estudos a concentração inibitória mínima de ambos os extratos foi de 1000 µg/disco.

2.3 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus*, é um coco gram-positivo, imóvel, não produtor de esporos, catalase positivo, que tende a formar agrupamentos irregulares semelhantes a cachos de uva e que podem eventualmente ser encontrados em diversos espécimes clínicos. São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota da pele e mucosas dos seres humanos. São facultativos quanto à respiração e pouco exigentes nutricionalmente. Crescem no ágar-manitol salgado, fermentam carboidratos e produzem pigmentos que variam do branco ao amarelo (JAWETZ et al., 2000). A intoxicação por *S. aureus* é oriunda da ingestão do alimento contendo as várias enterotoxinas (A, B, C1, C2, C3, D, E) sintetizadas por essa bactéria, que são capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização (JAWETZ et al., 2005).

Este patógeno humano está associado a infecções adquiridas na comunidade e em ambiente hospitalar. Destaca-se pelo seu potencial patogênico capaz de causar doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto saudáveis. O *Staphylococcus aureus* é capaz de desenvolver rapidamente resistência a antibióticos devido à aquisição de genes bacterianos de resistência, sendo este processo potencializado pela exposição repetida a agentes antimicrobianos. Algumas cepas são conhecidas atualmente por sua resistência a oxacilina e vancomicina (MARK et al., 2002; CATÃO, 2006).

A infecção por estafilococos geralmente é o resultado da combinação de fatores de virulência bacteriana com a capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições adversas: os constituintes da parede celular, a produção de enzimas e toxinas que promovem a invasão tissular, a capacidade de persistir no interior das

células e o seu potencial de adquirir resistência aos agentes antimicrobianos (JELJASZEWICZ, MLYNARCZYK, MLYNARCZYK, 2000).

2.4 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* faz parte da microbiota humana, sendo raramente causadora de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis, porém, em ambiente hospitalar é um importante agente infeccioso, principalmente em pacientes que apresentam imunossupressão. Os principais comprometimentos clínicos são pneumonia hospitalar, infecção urinária e em feridas cirúrgicas. Equipamentos e materiais hospitalares, principalmente líquidos, servem de reservatório para a bactéria, com destaque para equipamentos de ventilação mecânica (PAVIANI, STADNIK, HEINEK, 2004; FUENTEFRIA et al., 2008).

A resistência da *P. aeruginosa* aos antimicrobianos é frequente. Intrinsecamente a bactéria é resistente a vários antimicrobianos, incluindo cloranfenicol, tetraciclina, algumas quinolonas e betalactâmicos. São morfológicamente caracterizadas por seu formato de bacilo, são gram negativas, aeróbios e não produzem esporos. Podem se encontrar sozinhas, em pares ou pequenas cadeias. Crescem em temperaturas entre 37 e 42°C, e produzem pigmentos fluorescentes e solúveis em água, como a piocianina e a pioverdina de odor doce semelhante ao de uva (FEITOSA, 2012).

Os principais mecanismos relacionados a cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* em hospitais no Brasil estão relacionados a produção de metalobetalactamase do tipo SPM-1 e de metilase 16S rRNA RmtD, perda de porina OprD e superexpressão de bombas de efluxo de antimicrobianos. Estes mecanismos podem explicar a alta prevalência de resistência a carbapenêmicos e aminoglicosídeos. O isolamento de cepas com essas características é alarmante tendo em vista a escassez de opções terapêuticas disponíveis (NEVES et al., 2011).

2.5 Resistência bacteriana a antimicrobianos

A descoberta da atividade bactericida de um fungo do gênero *Penicillium* por Alexander Fleming em 1928 em uma placa de Petri que havia sido esquecida lançou as bases para o tratamento farmacológico das infecções. O tratamento antibiótico iniciou-se em 1941 com a produção da benzilpenicilina. Nos anos que se seguiram a expectativa de vida da população aumentou consideravelmente. No início do século XX a expectativa de vida ao nascer nos Estados Unidos era de 47,3 anos, ao final do século esse número havia superado a faixa dos 75 anos, fato que foi atribuído ao uso dos antibióticos (PEREIRA, PITA, 2005; LEDERMANN, 2006; DIAS, MONTEIRO, MENEZES, 2010; BELLOSO, 2009).

Os antibióticos são considerados como uma das descobertas terapêuticas mais importantes da história da medicina. Na atualidade é difícil que alguém passe pela vida sem utilizar algum deles (BELLOSO, 2009).

Em sua teoria da evolução Charles Darwin previu, cem anos antes do desenvolvimento dos antibióticos, que os organismos adaptam-se ao meio para sobreviver e aqueles com maior capacidade adaptativa prevalecem e perpetuam seu potencial genético para gerações futuras. O uso excessivo de antimicrobianos exerceu uma pressão seletiva no meio acelerando o processo de desenvolvimento e aquisição de resistência aos antibióticos pelas bactérias que é transmitida de forma vertical e horizontal entre os microorganismos. A velocidade de surgimento dessas habilidades é proporcional a utilização desses medicamentos (DIAS, MONTEIRO, MENEZES, 2010).

As infecções microbianas podem ser tratadas ou evitadas com antimicrobianos. Contudo, o uso inadequado dessa classe de fármacos acarreta a seleção de microrganismos resistentes a uma ou mais classes fazendo com que a doença progrida e coloque em risco a vida do paciente acometido. A cada dia novos casos de microrganismos resistentes ou multirresistentes são relatados na literatura. Embora muito se tenha investido na pesquisa de novas moléculas poucos medicamentos são desenvolvidos para contornar a resistência de microrganismos patogênicos. Muitos países tem implantado iniciativas para controlar o desenvolvimento da resistência a antimicrobianos e promover seu uso racional (WHO, 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Coordenação do Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados,

publicou a RDC nº 44/2010, que regulamenta o controle da venda de antimicrobianos. Desde a publicação dessa resolução, esses medicamentos passaram a ser dispensados em drogarias somente mediante apresentação de receita (BRASIL, 2010a).

Os hospitais se tornaram ambientes potencialmente perigosos devido à elevada taxa de resistência bacteriana, tornando os usuários susceptíveis a infecções fatais. Casos graves de infecções relacionadas à assistência à saúde são relacionadas a bactérias multirresistentes, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*. Algumas cepas desses microorganismos já são resistentes a todos os antibióticos disponíveis (NÓBREGA, CARMO FILHO, PEREIRA, 2013; YOSHIKAWA, 2002).

Sem uma ação harmonizada e imediata em escala global, o mundo está caminhando para uma era pós-antibiótica na qual infecções comuns poderiam mais uma vez matar (WHO, 2015).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Erythroxylum subrotundum* sobre as espécies *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico das folhas de *Erythroxylum subrotundum* sobre a cepa de *Staphylococcus aureus*.
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico das folhas de *Erythroxylum subrotundum* sobre *Staphylococcus aureus*.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico das folhas de *Erythroxylum subrotundum* sobre a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico das folhas de *Erythroxylum subrotundum* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de em um estudo do tipo experimental. Os ensaios laboratoriais da atividade antimicrobiana do extrato botânico foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.2 Material botânico

O material botânico foi coletado na região de Maturéia no estado da Paraíba.

4.3 Preparo do extrato de *Erythroxylum subrotundum*

O material botânico foi submetido a lavagem, imerso em solução de hipoclorito de sódio 0,01%, promovendo-se dessa forma sua desinfecção. As partes da planta utilizadas nos experimentos foram as folhas. Estas foram expostas à temperatura ambiente sobre bancadas higienizadas, após ter sido realizada previamente sua antiseptia. Em seguida, foram pesadas e colocadas em estufa de circulação de ar, a 45°C a cada 24 horas até a estabilização da umidade. Após este processo foram colocadas em um moinho de facas da marca Solab Científica e em seguida peneiradas no *tamis* de 10 *mash* para padronização granulométrica (CORDEIRO et al., 2006).

Para o preparo do extrato etanólico as folhas foram submetidas à maceração durante 15 dias em solução etanólica á 96%. O extrato botânico foi fornecido pelo laboratório de Fitoquímica Experimental do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) que tem como coordenador o Prof. Dr. Josean Fechine Tavares.

4.4 Linhagens bacterianas testadas

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos, a partir da espécie vegetal coletada, foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC®) de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235) e *Pseudomona aeruginosa* (ATCC® 29336) disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). Posteriormente, verificou-se a sensibilidade das bactérias frente ao extrato etanólico determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) através da técnica de microdiluição em caldo descrita no documento M07-A10 proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015).

4.5 Avaliação da atividade antibacteriana

4.5.1 Meio de cultura

Para realização dos testes de sensibilidade dos microrganismos ao extrato vegetal foram utilizados o caldo Mueller-Hinton e caldo BHI (*Brain Heart Infusion*). Para a determinação da CBM utilizou-se o meio de cultura *Agar Mueller Hinton*.

4.5.2 Preparação da Suspensão Microbiana

O inóculo microbiano foi padronizado antes do uso, conforme descrito no CLSI (2015) e na Farmacopéia Brasileira V edição (BRASIL, 2010) com adaptações. Assim, dilui-se a suspensão preparada com solução salina estéril de modo a obter a transmitância de 85%, no comprimento de onda de 625 nm, em fotocolorímetro, marca BIOESPECTRO, modelo SP-22 a fim de obter-se uma preparação microbiana com uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL.

4.5.3 Inóculo Microbiano

Partindo do pó liofilizado de cada uma das cepas, inoculou-se uma alça em 5mL de caldo BHI, após 18 horas, distribui-se os microorganismos em estrias de ágar BHI para observar o crescimento e morfologia das mesmas. Após mais 18h na estufa bacteriológica, as cepas bacterianas foram repicadas em 10mL de caldo BHI e incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C, 18h antes da realização do experimento. Após esse período, utilizou-se 300µL desse inóculo diluído em 4mL de caldo BHI para medirmos a absorbância com auxílio de um espectrofotômetro com comprimento de onda graduado em 625nm. Ao obtermos absorbância de 0.08 a 0.1 obtivemos a quantidade de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Transferiu-se 1 mL desta solução para um tubo contendo 9mL de caldo BHI, homogenizou-se e desta nova solução transferiu-se novamente 1mL para mais 9mL de caldo BHI, homogenizou-se e transferiu-se, finalmente, 8mL para um tubo com mais 4mL de caldo BHI. Após essa série de diluições obtivemos um inóculo com $1,0 \times 10^6$ UFC/mL (CLSI, 2015; BRASIL, 2010b).

4.5.4 Microdiluição:

A técnica da microdiluição é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada desta maneira porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas estéreis de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou chato, próprias para microdiluição (ALVES et al., 2008).

Foram utilizadas microplacas contendo 96 poços com fundo em forma de “U”, distribuídos em colunas enumeradas de 1 a 12 e linhas em letras de “A” a “H”, para realizar o teste de microdiluição em caldo utilizando o documento M07-A10 proposto pelo CLSI (CLSI, 2015).

Após o preparo do inóculo e das demais substâncias envolvidas prosseguiu-se com o procedimento em microplacas (utilizamos microplacas com 96 poços). Foram adicionados 100 µL de meio em toda placa com exceção das colunas 5, 10, 11 e 12. A coluna 1 representou o controle do meio, contendo apenas 100 µL do meio. A coluna

2 representou o controle do extrato, contendo 100 µL de meio e 100 µL extrato. A coluna 3 representou o controle do inóculo, contendo apenas 100 µL de meio e 100 µL de inóculo. A coluna 4 representou o controle negativo contendo 100 µL de meio, 100 µL de inóculo e 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) que foi microdiluído e os últimos 100 µL foram desprezados. O DMSO é a substância utilizada para diluição do extrato. Dessa forma, é necessário demonstrar que esta substância não apresenta atividade antibacteriana o que poderia gerar questionamentos quanto a validade dos resultados do estudo. Na coluna 5 não foi depositado nenhuma amostra com objetivo de evitar contaminação entre as colunas da microplaca. Nas colunas 6, 7 e 8 foram colocados 100 µL de meio, 100 µL de inóculo e 100 µL de extrato que foram microdiluídos, dessa maneira os resultados foram obtidos em triplicata. A concentração inicial do extrato etanólico foi de 4000 µg/ml que foi microdiluído ao longo dos poços da microplaca de forma que as concentrações testadas foram de 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL. A coluna 9 representou o controle positivo na qual foram colocados 100 µL de meio, 100 µL de inóculo e 100 µL de cefalexina no experimento com o *Staphylococcus aureus* e 100 µL de meropenem no experimento com a *Pseudomonas aeruginosa*. Foram utilizadas duas microplacas, cada uma para uma cepa bacteriana. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° por 24 horas e após acrescentou-se 20 µL de resazurina em todos (CLSI, 2015).

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO et al., 2002). Logo, a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano enquanto que as variações de rosa e roxo são indicativos da presença de células viáveis para crescimento. Após a adição de resazurina e 15 minutos mais tarde foram realizadas as análises da mudança de cor. Em seguida foram colocados 10 µL dos poços da microplaca em placas de Petri. Cada placa de Petri foi dividida em quadrantes. Como em cada coluna da microplaca haviam 8 poços foram utilizadas 2 placas para cada coluna de forma que para cada poço da microplaca havia um quadrante correspondente na placa. Estas foram posteriormente incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. Foi considerada a CBM a região da placa incubada com a menor concentração do extrato de *Erytroxylum subrotundum* na qual não se observou crescimento bacteriano (CLSI, 2015)

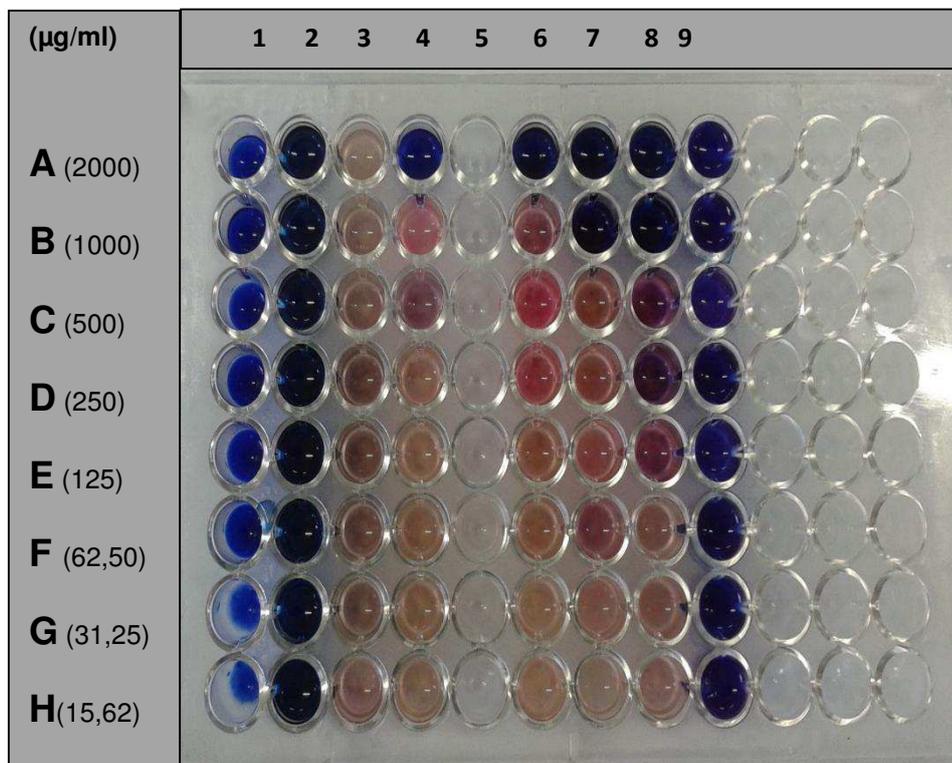
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235) foram submetidas à ação do extrato etanólico de *Erythroxyllum subrotundum* de acordo com a metodologia descrita.

Foi observada presença de coloração azul nas colunas 1, 2 e 9 da microplaca o que indica ausência de atividade respiratória e, por conseguinte, ausência de crescimento bacteriano. Esses resultados eram esperados uma vez que essas colunas representavam o controle do meio, do extrato e controle positivo respectivamente. O que nos mostra que o meio e o extrato não estavam contaminados e que a bactéria é sensível ao antimicrobiano utilizado.

Nos poços das colunas 3, 4, 6, 7 e 8 foi observada coloração róseo-avermelhada o que indicou a presença de atividade respiratória e, por conseguinte, crescimento bacteriano no meio (Fotografia 1).



Fotografia 1 - Microplaca com *S.* após adição de resazurina.

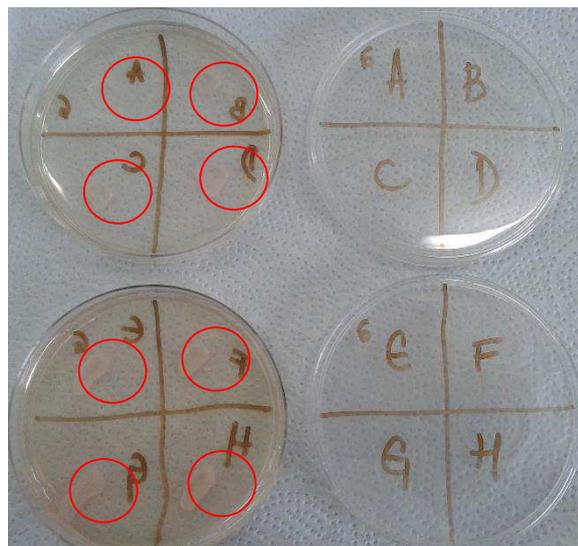
Na coluna 3 e 4 era esperado o crescimento bacteriano, pois representavam o controle do inóculo e o controle negativo respectivamente. O que nos mostra que nosso inóculo foi viável e que o DMSO, diluente do extrato, não apresentou atividade bactericida. Nas colunas 6, 7 e 8 que continham meio, inóculo bacteriano e extrato botânico foi observado crescimento bacteriano em todos os poços o que indicou que o extrato botânico não apresentou ação antimicrobiana.

Após a leitura da microplaca 10 µl do conteúdo de cada um dos poços das colunas de 1 a 9 foram depositados em cada um dos quadrantes das placas de Petri (A, B, C, D, E, F, G e H).

Após 24 horas em estufa bacteriológica não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos quadrantes das placas 1, 2, e 9 o que está de acordo com os resultados obtidos pela coloração da microplaca.

Nas placas 3, 4, 6, 7 e 8 o crescimento bacteriano ocorreu, o que também está em concordância com os resultados obtidos na microplaca. Nas placas 3 e 4 o crescimento bacteriano era esperado uma vez que representavam o controle do inóculo e controle negativo do experimento.

O crescimento bacteriano em todos os quadrantes da placas 6, 7 e 8 (Fotografia 2) confirmou que o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* não apresentou ação inibitória sobre o crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235) nas concentrações utilizadas em nosso estudo.



Fotografia 2 - Crescimento de *S. aureus* na placa 6.

Diante destes resultados podemos concluir que o extrato etanólico de *Erythroxyllum subrotundum* não apresentou ação antibacteriana contra espécies do gênero *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235) como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato *Erythroxyllum subrotundum* em diferentes concentrações frente cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235)

	Concentrações (µg/ml)							
	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62
<i>S. aureus</i> (ATCC® 23235)	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle do meio	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle do extrato	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle do inóculo	+	+	+	+	+	+	+	+
Cotrole negativo	+	+	+	+	+	+	+	+

* (-) sem crescimento visível **(+) crescimento visível

Fonte: Dados da pesquisa. Elaborado pelo autor.

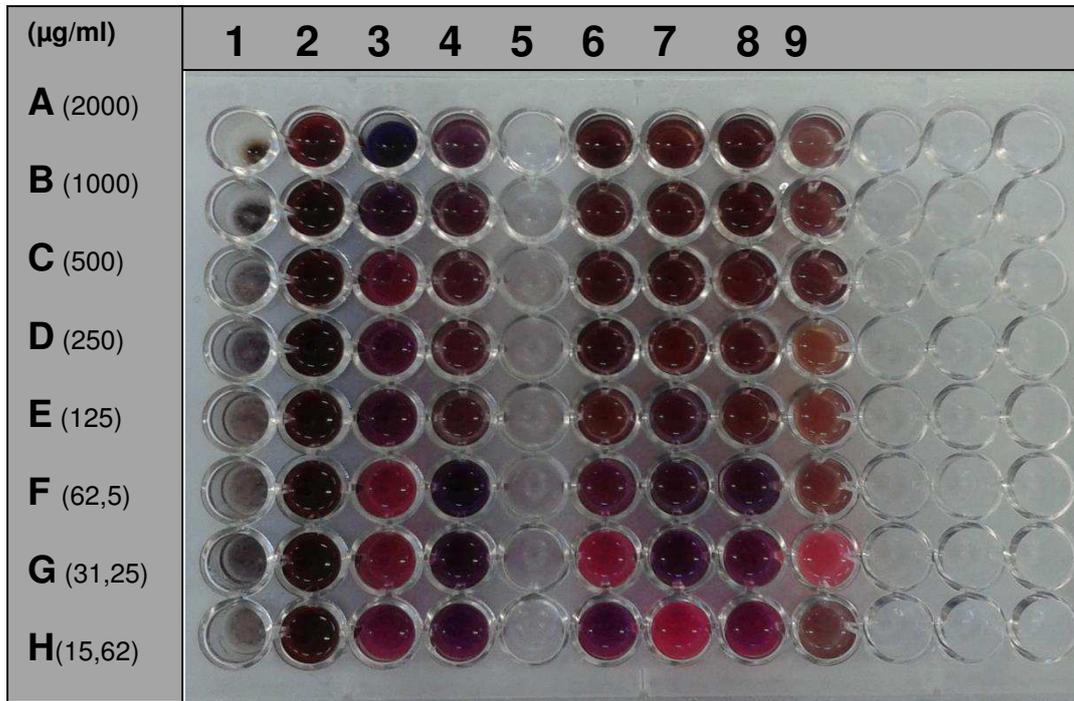
5.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Os microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 29336) foram submetidos à ação do extrato etanólico de *Erythroxyllum subrotundum* de acordo com a metodologia descrita.

Foi observada presença de coloração azul apenas nos poços da coluna 1 da microplaca o que indicou ausência de atividade respiratória e, por conseguinte, ausência de crescimento bacteriano. Este resultado era esperado e nos mostra ausência de contaminação no meio utilizado.

Nos poços das colunas 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9 foram observadas colorações diversas desde tons terrosos ao róseo. Esse fato pode ter ocorrido uma vez que a espécie bacteriana testada produz pigmento e este pode ter se misturado aos pigmentos do corante utilizado o que gerou as colorações observadas. Este evento causou dúvidas em relação ao crescimento bacteriano e, por conseguinte inviabilizou a determinação

da CIM. Estas dúvidas foram sanadas com o plaqueamento em placa de Petri. Os resultados obtidos na microplaca podem ser observados na Fotografia 3.



Fotografia 3 - Microplaca com *P. aeruginosa* após adição do corante resazurina.

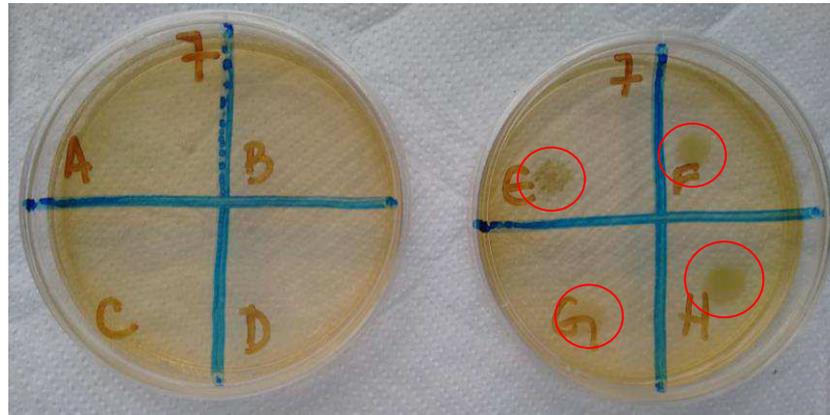
Após a leitura da microplaca 10 μl do conteúdo de cada um dos poços das colunas de 1 a 9 foi depositado nos quadrantes (A, B, C, D, E, F, G e H) das placas de Petri previamente preparadas com meio de cultura. As placas foram incubadas em uma estufa por 24 horas.

Após o tempo decorrido não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos quadrantes das placas 1, 2 e 9, o que se esperava uma vez que estas colunas representavam o controle do meio, do extrato e controle positivo respectivamente. O que nos confirma que o meio ou o extrato não apresentavam contaminação e que a cepa bacteriana foi sensível ao antimicrobiano utilizado.

Nas placas referentes as colunas 3 e 4 foi observado crescimento em todos os quadrantes, o que era esperado uma vez que estas colunas representam o controle do inóculo e o controle negativo respectivamente. O que confirmou que o inóculo era viável e que o DMSO não apresentou atividade antimicrobiana.

Nas placas 6, 7 e 8 realizadas em triplicata contendo meio, inóculo e extrato, o crescimento bacteriano ocorreu apenas a partir do quadrante E, nas três microplacas,

mostrando que nas concentrações do extrato nos poços de A a D o crescimento bacteriano foi inibido como evidenciado na Fotografia 4.



Fotografia 4 - Crescimento de *P. aeruginosa* a partir do quadrante E na placa de número 7.

Dessa forma podemos verificar que o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* inibiu o crescimento do microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 29336) e que a CBM foi de 250µg/ml conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato *Erythroxylum subrotundum* em diferentes concentrações frente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 29336).

	Concentrações (µg/ml)							
	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC® 29336)	-	-	-	-	+	+	+	+
Controle do meio	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle do extrato	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle do inóculo	+	+	+	+	+	+	+	+
Cotrole negativo	+	+	+	+	+	+	+	+

* (-) sem crescimento visível **(+) crescimento visível

Fonte: Dados da pesquisa. Elaborado pelo autor.

Aguiar (2011) ao estudar a ação bactericida do extrato metanólico das partes aéreas de *Erythroxylum subrotundum* encontrou que a fração acetato de etila apresentou ação contra *Staphylococcus aureus* e não apresentou ação frente a bactérias gram negativas. Esses resultados, contrários aos que encontramos, nos levam a crer que o extrato botânico utilizado por esses pesquisadores continha substâncias diferentes. Essa hipótese apresenta plausibilidade, uma vez que Aguiar utilizou como solvente o metanol o que pode ter extraído do vegetal outros compostos diferentes dos extraídos pela solução etanólica utilizada neste estudo. Outro ponto a ser analisado entre os dois estudos é o fato de Aguiar ter utilizado partes aéreas do vegetal enquanto nos utilizamos apenas as folhas, o que gera o questionamento de que poderia haver substâncias presentes nas demais estruturas analisadas responsáveis pelos resultados encontrados por estes pesquisadores.

Holetz e colaboradores (2002) ao estudarem a atividade antibacteriana e antifúngica de treze espécies vegetais utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas consideraram os seguintes valores de CIM: menor que 100µg/ml significou boa atividade antimicrobiana; entre 100µg/ml e 500µg/ml atividade antimicrobiana moderada; entre 500µg/ml e 1000µg/ml atividade antimicrobiana fraca; e maior que 1000µg/ml ausência de atividade antimicrobiana. Considerando os valores considerados por estes pesquisadores podemos concluir que o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* apresentou moderada atividade antibacteriana frente à *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que a CBM foi de 250 µg/ml e foi inativo contra *Staphylococcus aureus*, tendo o microorganismo crescido em todas as concentrações testadas.

6. CONCLUSÃO

O extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* apresentou atividade antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa* com CBM de 250 µg/ml e não apresentou atividade sobre *Staphylococcus aureus*.

O reino vegetal é uma fonte inesgotável e promissora de novas moléculas. A diversidade orgânica dos compostos produzidos pelo metabolismo secundário desses seres vivos precisa ser explorada e reproduzidas em escala industrial para que possam ser aplicadas na terapêutica das mais variadas doenças.

É necessário que novos trabalhos sejam conduzidos para que a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* seja avaliada frente á cepas clínicas dos microorganismos estudados. Além disso, é importante estudar a atividade antimicrobiana de outras frações do extrato, uma vez que este estudo demonstrou haver diferenças terapêuticas quando diferentes solventes são utilizados como meio extrator.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, J. S. *Estudos das atividades antimicrobiana e anticâncer de Erythroxylum caatingae Plowman e Erythroxylum subrotundum A. St-Hil.* Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível em: < <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/2203>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

ALVES, E.G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, São Paulo, v.31, n.5, p. 1224-1229, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500052>

ANTUNES, R. M. P. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Rev Bras Farmacogn* v. 16, p. 517-524, 2006. Disponível em: < https://www.researchgate.net/publication/242230184_Atividade_antimicrobiana_in_vitro_e_determinacao_da_concentracao_inibitoria_minima_CIM_de_fitoconstituintes_e_produtos_sinteticos_sobre_bacterias_e_fungos_leveduriformes >. Acesso em: 02 jun. 2019.

ARAUJO, L. D. C. et al. Avaliação da atividade antioxidante in vitro e determinação de fenóis totais de espécies do gênero *Erythroxylum*. *VII Reunião Regional da FeSBE – Regional*. Resumo 10.012, 2012. . Disponível em< http://www.fesbe.org.br/regional2012/resumos/sexta/farmacologia_toxicologia_produtos_naturais_quimica_medicinal.pdf>. Acesso em: 02 jun. 2019.

BARBOSA, C. C. et al. Aspectos gerais e propriedades farmacológicas do gênero *Erythroxylum*, *Revista Saúde e Ciência (on line)*, v.3, n.3, p. 207-216, 2014. Disponível em: < <http://www.ufcg.edu.br/revistasaudeeciencia/index.php/RSC-UFCG/article/download/185/122>.> Acesso em: 02 jun.2019.

BELLOSO, W. H. Historia de los antibióticos. *Rev. Hosp. Ital. B.Aires*, v. 29, n. 2, p. 102-111, 2009. Disponível em: < <https://www.academia.edu/36100310/Belloso>>. Acesso em: 02 jun. 2019.

BOHM, B. A. et al. Flavonoid variation in *Erythroxylum*. *Phytochemistry*, v. 27, n. 3, p. 833-837, 1988. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)84102-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)84102-5).

BIERI, S. et al. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 103, n. 3, p. 439–447, Feb., 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.021>

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim. Nova*, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 44 de 26 de outubro de 2010*. 2010a Disponível em: < <http://www.cff.org.br/userfiles/file/noticias/RDC%20ANVISA%20N%C2%BA%20%2044%20DE%2026%20DE%20OUTUBRO%20DE%202010%20CONTROLE%20DE%20ANTIMICROBIANOS.pdf>>. Acesso em: 15 maio. 2019.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Farmacopéia Brasileira*, ed. 5, v. 1, Brasília, 2010b.

BRITO, M. A.; CORDEIRO, B. C. Necessidade de novos antibióticos. *J Bras Patol Med Lab*, v. 48, n. 4, p. 247-249, Ago., 2012. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v48n4/v48n4a02.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2019.

CATÃO, R. M. R. et al. Atividade antimicrobiana "in vitro" do extrato etanólico de *Punica granatum* Linn (romã) sobre cepas isoladas ambulatoriais de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. Anal. Clín.*, v. 38, n. 2, p. 111-114, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2014000700003>

CHIN, Y. et al. Drug discovery from natural sources. *AAPS J.*, Jun; n. 8, v. 2, p. 239–253, June., 2006. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3231566/>>. Acesso em: 02 jun. 2019.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. *M07-A10*, v. 35. n. 2, 2015. Disponível em: < https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf>. Acesso em: 03-06-2019.

CORDEIRO, C. H. G. C. et al. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulações para higiene bucal. *Rev. Bras. Cienc. Farm*, v. 42, n. 3, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000300008>.

CORREIA, A. F. et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 16, n. 203, July., 2016. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1164-3>.

COSTA-LIMA, J. L.; LOIOLA, M. I. B.; JARDIM, J. G. Erythroxyloaceae no Rio Grande do Norte, *Rodriguésia*, v. 65, n. 3, p. 659-671, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201465306>.

CRAGG, M. G.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads, *Pure Appl. Chem.*, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites*, v.2, p. 303-336, 2012. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>.

DIAS, M.; MONTEIRO, M. S.; MENEZES, M. F. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. *Cadernos de otorrinolaringologia. Clínica investigação e Inovação*, p. 1-10, 2010. Disponível em: <<http://www.cadernosorl.com/artigos/1/2.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2019.

FEITOSA, R. J. P. *Prevalência de infecções hospitalares por bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose, em um hospital de Campina Grande, Paraíba*. Trabalho de conclusão de curso de Graduação em Farmácia. Campina Grande: Universidade Estadual da Paraíba, 2012. Disponível em: <<http://dspace.bc.uepb.edu.br:8080/jspui/handle/123456789/331>>. Acesso em: 15/05/2014.

FUENTEFRIA, D. B. et al. Pseudomonas aeruginosa: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, n. 41, n. 5, p. 470-473, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000500007>

FURST, A. L.; FRANCIS, M. B. Impedance-Based Detection of Bacteria. *Chem. Rev.* v. 119, n. 1, p. 700-726, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00381>

GONZÁLES-GUEVARA, J. L. et al. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxyllum* species, *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 539-542, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2006.01.003>

GUO, H. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. *Eur J Med Chem.* v. 164, p. 678-688, Feb., 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.017>

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq. ciências saúde UNIPAR.* v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v11i3.2007.2037>

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, Oct., 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

JAWETZ, E. et al. *Microbiologia Médica* 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

_____. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, p. 182, 2005.

JELJASZEWICZ, L.; MLYNARCZYK, G.; MLYNARCZYK, A. Antibiotic resistance in gram-positive cocci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.16, p.473-478, 2000.

KURUPPU, A. I.; PARANAGAMA, P.; SILVA, R. Anticancer potential of natural products: a review focusing on Sri Lankan plants. *Front Biosci (Schol Ed)*, v. 11, p. 161-177, 2019. <http://dx.doi.org/10.2741/s532>.

LEDERMANN, W. D. La historia de la penicilina y de su fabricación en Chile. *Revista Chilena de infectología*, v. 23, n. 2, p. 172-176, 2006. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182006000200012>.

LOIOLA, M. I. B. et al. Flora da Paraíba, Brasil: *Erythroxylaceae* Kunth. *Acta bot. bras.* v. 21, n. 2, p. 473-487, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-33062007000200020>.

MARK, C. E. et al. The evolutionary history of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PNAS*, v. 99, n. 4, p.7687-7698, 2002. <https://doi.org/10.1073/pnas.122108599>.

NEVES, P. R., et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab*, v. 47, n. 4, p. 409-420, Ago., 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442011000400004>.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Resp.*, n. 17, v. 3, p. 215-234, June., 2000.

_____. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. *J. Nat. Prod.*, n. 66, v.7, p. 1022–1037, 2003. <https://doi.org/10.1021/np030096l>.

NÓBREGA, M. S.; CARMO FILHO, J. R.; PEREIRA, M. S. Evolução da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva. *Revista eletrônica de enfermagem, da Universidade Federal de Goiás*, v.15, n.3, p. 696-703, 2013. <http://dx.doi.org/10.5216/ree.v15i3.22031>.

OLIVEIRA, S. L. et al. Tropane Alkaloids from *Erythroxylum caatingae* Plowman *Chemistry & Biodiversity*, n.8, v.1, p. 155–165, 2011. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900400>

ORANTES-GARCIA, C. et al. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de comunidades campesinas e indígenas de la Selva Zoque, Chiapas, México. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*, v. 17, n. 5, p. 503- 521, 2018. Disponível em:< <http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/3515/26002830>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

PALOMINO, J. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, Aug., 2002. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.46.8.2720-2722.2002>.

PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. *Infarma* v.15, p. 66-70, 2004. Disponível em: <<http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/84/i03-perfil.pdf>>. Acesso em: 02 jun 2019.

PEREIRA, A. L.; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955). Da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1955). *Revista da Faculdade de Letras História Porto*, III série, v. 6, p. 129-151, 2005. Disponível em:< <http://ojs.letras.up.pt/index.php/historia/article/view/3787/3541>>. Acesso em: 02 jun. 2019.

RODEIRO, I. et al. Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic compounds in rat hepatocytes, *Chem Biol Interact*, v. 1, n. 172, p. 1-10, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.10.004>.

SILVA, G. L. et al. Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*, *J. Nat. Prod.*, v. 64, n. 12, p. 1514-1520, 2001. <https://doi.org/10.1021/np010295+>

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria

com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, n.1, p. 35-40, 2002.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2002000100005>

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quim. Nova*, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>.

VIOLANTE, I. M. P. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.43, n. 4, p. 1302-1308, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000400009>

WHO. World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*. Geneva, Switzerland, 2015. Disponível em: < <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>>. Acesso em: 15/05/2019.

YOSHIKAWA, T. T. Antimicrobial resistance and aging: beginning of the end of the antibiotic era? *JAGS*, n. 50, v. 7, p. 226–S229, 2002.
<https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.50.7s.2.x>

ANEXO 1. MODELO DE ARTIGO

Estudo *in vitro* da ação antibacteriana de *Erythroxylum subrotundum* sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Carlos César da Silva¹, Cristina Ruan Ferreira de Araújo²

Resumo

Desde as civilizações primitivas as potencialidades terapêuticas das espécies do reino vegetal são conhecidas e exploradas, seja na forma de chás, unguentos ou mesmo como os modernos medicamentos de hoje. As espécies do gênero *Erythroxylum* são conhecidas e utilizadas na medicina popular para o tratamento das mais diversas infecções. *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são microrganismos patogênicos presentes em nosso meio e responsáveis por grande parte das infecções comunitárias e hospitalares. Sua habilidade em adquirir resistência aos antimicrobianos tem conduzido profissionais de saúde a uma busca incessante por novos fármacos que possam contornar esse problema. Esta pesquisa avaliou atividade antibacteriana *in vitro* do extrato de etanólico de *Erythroxylum subrotundum* sobre as espécies *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Utilizando-se a técnica da microdiluição o extrato etanólico da espécie vegetal foi testado nas concentrações de 2000µ/ml a 15,62 µg/ml. Verificou-se ausência de atividade antimicrobiana contra as cepas de *Staphylococcus aureus*. As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* testadas apresentaram sensibilidade à ação do extrato sendo a concentração inibitória mínima observada de 250 µg/ml. É necessário que novos estudos sejam conduzidos para que se avalie a ação de outras frações do extrato e que este possa ser testado frente a cepas clínicas destes microorganismos.

Unitermos: Resistência microbiana a medicamentos. Testes de sensibilidade microbiana. Extratos vegetais.

¹ Graduando em Medicina, Unidade Acadêmica de Medicina, UFCG, Campina Grande, PB, e-mail: carloscesar--@hotmail.com

² Odontóloga – Universidade Estadual da Paraíba. Professora Doutora do curso de Medicina e de Enfermagem, Unidade Acadêmica de Ciências de Enfermagem, UFCG, Campina Grande, PB, e-mail: crisruan@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é resultado do íntimo contato do homem com a natureza. Este saber e prática, acumulado pela sociedade há gerações, possibilitou o desenvolvimento de civilizações e ainda permite a sobrevivência de comunidades que habitam regiões isoladas e onde há carência de recursos em saúde (ORANTES-GARCIA et al., 2018).

No âmbito acadêmico é histórica a convicção das potencialidades do uso de espécies vegetais para o desenvolvimento de novos medicamentos. As plantas fizeram e ainda fazem parte da vida do homem desde os primórdios da humanidade sendo inegável sua importância em seus diversos estágios evolutivos (SIMÕES, SCHENKELL, 2002).

A diversidade das estruturas químicas de produtos naturais fornece inúmeras oportunidades para a descoberta de novos compostos que apresentem atividade biológica. Os metabólitos secundários produzidos por bactérias, organismos marinhos e plantas são uma fonte promissora para exploração de novos medicamentos (KURUPPU, PARANAGAMA, SILVA, 2019).

A família Erythroxylaceae comporta aproximadamente 240 espécies divididas em quatro gêneros: *Aneulophus*, *Erythroxylum*, *Nectaropetalum*. e *Pinacopodium*. No Brasil são encontradas mais de cem espécies com prevalência na Mata Atlântica e região nordeste (COSTA - LIMA, LOIOLA, JARDIM, 2014; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

As espécies do gênero *Erythroxylum* são utilizadas na medicina popular para o tratamento de piодermites, ausência de fluxo menstrual, hemorragias, infecções renais e respiratórias (BARBOSA et al., 2014; ARAUJO et al., 2012; SILVA et al., 2001; RODEIRO et al., 2008).

Os antibióticos representam um grupo de medicamentos indispensável a vida. Sem eles crianças prematuras teriam pouca chance de vida, muitas cirurgias e transplantes se tornaria inviável, tratamentos oncológicos e imunossupressores causariam infecções graves e os hospitais se tornariam redutos de germes letais. Em suma, sem eles a humanidade voltaria à era pré-antibiótica e perderia anos preciosos na expectativa de vida conquistados ao longo da história (BRITO, CORDEIRO, 2012).

A alta prevalência de infecções justifica a preocupação na busca de recursos que permitam o desenvolvimento de novos métodos de controles específicos para estas patologias (ANTUNES et al., 2006; HAIDA, 2007).

Estima-se que aproximadamente 700.000 mortes relacionadas a patógenos resistentes a antimicrobianos ocorram anualmente. Número esse que pode chegar a 10 milhões na metade do século, caso as tendências atuais se confirmem.

Microorganismos resistentes a antimicrobianos já representam uma das mais sérias ameaças à saúde pública (GUO, 2019; FURST, FRANCIS, 2019).

Diante dessa problemática, vários pesquisadores têm intensificado seus estudos no campo da medicina alternativa e voltado seu olhar para a natureza em busca de espécimes animais e vegetais que possam ser fonte de novos compostos bioativos a serem utilizados nessa luta constante contra a resistência bacteriana. (COSTA-LIMA, LOIOLA, JARDIM, 2014; GONZÁLEZ-GUEVARA et al., 2006).

Aguiar (2011) ao estudar a ação antibacteriana do extrato metanólico de partes aéreas de *Erythroxylum subrotundum* encontrou que a fase acetato de etila inibiu crescimento de *Staphylococcus aureus* e não apresentou ação inibitória a gram negativos. O que nos levou a questionar se outros tipos de extrato do vegetal apresentaria os mesmos resultados.

Esta pesquisa teve por intento estudar a ação antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico de folhas de *Erythroxylum subrotundum* sobre bactérias das espécies *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios laboratoriais da atividade antimicrobiana dos extratos da planta a ser pesquisada, foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Preparo do extrato de *Erythroxylum subrotundum*

O material botânico coletado na região de Maturéia no estado da Paraíba foi submetido a lavagem, imerso em solução de hipoclorito de sódio 0,01%, promovendo-se dessa forma sua desinfecção. As partes da planta utilizadas nos experimentos foram as folhas. Estas foram expostas à temperatura ambiente sobre bancadas higienizadas, após ter sido realizada previamente sua antiseptia. Em seguida, foram

pesadas e colocadas em estufa de circulação de ar, a 45°C a cada 24 horas até a estabilização da umidade. Após este processo foram colocadas em um moinho de facas da marca Solab Científica e em seguida peneiradas no *tamis* de 10 *mash* para padronização granulométrica (CORDEIRO et al., 2006).

Para o preparo do extrato etanólico as folhas foram submetidas à maceração durante 15 dias em solução etanólica á 96%. O extrato botânico foi fornecido pelo laboratório de Fitoquímica Experimental do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) que tem como coordenador o Prof. Dr. Josean Fechine Tavares.

Linhagens bacterianas testadas

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos, a partir da espécie vegetal coletada, foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC®) de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235) e *Pseudomona aeruginosa* (ATCC® 29336) disponibilizadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ). Posteriormente, verificou-se a sensibilidade das bactérias frente ao extrato etanólico determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) através da técnica de microdiluição em caldo descrita no documento M07-A10 propostos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2015).

Meio de cultura

Para realização dos testes de sensibilidade dos microrganismos aos extrato vegetal foram utilizados o caldo *Mueller-Hinton* e caldo BHI (*Brain Heart Infusion*). Para a CBM utilizou-se o meio de cultura *Agar Mueller Hinton*.

Preparação da Suspensão Microbiana

O inóculo microbiano foi padronizado antes do uso, conforme descrito no CLSI (CLSI, 2015) e na Farmacopéia Brasileira V edição (BRASIL, 2010), com adaptações. Assim, diluir-se-á a suspensão preparada com solução salina estéril de modo a obter a transmitância de 85%, no comprimento de onda de 625 nm, em fotocolorímetro, marca BIOESPECTRO, modelo SP-22 a fim de obter-se uma preparação microbiana com uma concentração final entre 10^6 UFC/mL.

Inóculo Microbiano

Partindo do pó liofilizado de cada uma das cepas, inoculou-se uma alça em 5mL de caldo BHI, após 18 horas, distribui-se os microorganismos em estrias de ágar BHI para observar o crescimento e morfologia das mesmas. Após mais 18h na estufa bacteriológica, as cepas bacterianas foram repicadas em 10mL de caldo BHI e incubadas em estufas bacteriológicas a 37°C, 18h antes da realização do experimento. Após esse período, utilizou-se 300µL desse inóculo diluído em 4mL de caldo BHI para medirmos a absorbância com auxílio de um espectrofotômetro com comprimento de onda graduado em 625nm. Ao obtermos absorbância de 0.08 a 0.1 obtivemos a quantidade de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Transferiu-se 1 mL desta solução para um tubo contendo 9mL de caldo BHI, homogenizou-se e desta nova solução transferiu-se novamente 1mL para mais 9mL de caldo BHI, homogenizou-se e transferiu-se, finalmente, 8mL para um tubo com mais 4mL de caldo BHI. Após essa série de diluições obtivemos um inóculo com $1,0 \times 10^6$ UFC/mL (CLSI, 2015; BRASIL, 2010) .

Microdiluição

A técnica da microdiluição é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É denominada desta maneira porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas estéreis de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou chato, próprias para microdiluição (ALVES et al., 2008).

Foram utilizadas microplacas contendo 96 poços com fundo em forma de “U”, distribuídos em colunas enumeradas de 1 a 12 e linhas em letras de “A” a “H”, para realizar o teste de microdiluição em caldo utilizando o documento M07-A10 proposto pelo CLSI (CLSI, 2015).

Após o preparo do inóculo e das demais substâncias envolvidas prosseguiu-se com o procedimento em microplacas (utilizamos microplacas com 96 poços). Foram adicionados 100 μ L de meio em toda placa com exceção das colunas 5, 10, 11 e 12. A coluna 1 representou o controle do meio, contendo apenas 100 μ L do meio. A coluna 2 representou o controle do extrato, contendo 100 μ L de meio e 100 μ L extrato. A coluna 3 representou o controle do inóculo, contendo apenas 100 μ L de meio e 100 μ L de inóculo. A coluna 4 representou o controle negativo contendo 100 μ L de meio, 100 μ L de inóculo e 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) que foi microdiluído e os últimos 100 μ L foram desprezados. O DMSO é a substância utilizada para diluição do extrato. Dessa forma, é necessário demonstrar que esta substância não apresenta atividade antibacteriana o que poderia gerar questionamentos quanto a validade dos resultados do estudo. Na coluna 5 não foi depositado nenhuma amostra com objetivo de evitar contaminação entre as colunas da microplaca. Nas colunas 6, 7 e 8 foram colocados 100 μ L de meio, 100 μ L de inóculo e 100 μ L de extrato que foram microdiluídos, dessa maneira os resultados foram obtidos em triplicata. A

concentração inicial do extrato etanólico foi de 4000 µg/ml que foi microdiluído ao longo dos poços da microplaca de forma que as concentrações testadas foram de 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL. A coluna 9 representou o controle positivo na qual foram colocados 100 µL de meio, 100 µL de inóculo e 100 µL de cefalexina no experimento com o *Staphylococcus aureus* e 100 µL de meropenem no experimento com a *Pseudomonas aeruginosa*. Foram utilizadas duas microplacas, cada uma para uma cepa bacteriana. As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° por 24 horas e após acrescentou-se 20 µL de resazurina em todos (CLSI, 2015).

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) é um composto indicador de óxido-redução de cor azul que, na presença de células viáveis, é oxidado a resofurina, substância de coloração vermelha (PALOMINO et al., 2002). Logo, a coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano enquanto que as variações de rosa e roxo são indicativos da presença de células viáveis para crescimento. Após a adição de resazurina e 15 minutos mais tarde foram realizadas as análises da mudança de cor.

Em seguida foram colocados 10 µL dos poços da microplaca em placas de Petri. Cada placa de Petri foi dividida em quadrantes. Como em cada coluna da microplaca haviam 8 poços foram utilizadas 2 placas para cada coluna de forma que para cada poço da microplaca havia um quadrante correspondente na placa. Estas foram posteriormente incubadas a 37°C em estufa bacteriológica por 24 horas. Da mesma forma que na microplaca os resultados foram obtidos em triplicata. Foi considerada a CBM a região da placa incubada com a menor concentração do extrato de *Erytroxylum subrotundum* na qual não se observou crescimento bacteriano (CLSI, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Staphylococcus aureus

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235) foram submetidas à ação do extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* de acordo com a metodologia descrita.

Foi observada presença de coloração azul nas colunas 1, 2 e 9 da microplaca o que indica ausência de atividade respiratória e, por conseguinte, ausência de crescimento bacteriano. Esses resultados eram esperados uma vez que essas colunas representavam o controle do meio, do extrato e controle positivo respectivamente. O que nos mostra que o meio e o extrato não estavam contaminados e que a bactéria é sensível ao antimicrobiano utilizado.

Nos poços das colunas 3, 4, 6, 7 e 8 foi observada coloração róseo-avermelhada o que indicou a presença de atividade respiratória e, por conseguinte, crescimento bacteriano no meio.

Na coluna 3 e 4 era esperado o crescimento bacteriano, pois representavam o controle do inóculo e o controle negativo respectivamente. O que nos mostra que nosso inóculo foi viável e que o DMSO, diluente do extrato, não apresentou atividade bactericida. Nas colunas 6, 7 e 8 que continham meio, inóculo bacteriano e extrato botânico foi observado crescimento bacteriano em todos os poços o que indicou que o extrato botânico não apresentou ação antimicrobiana.

Após a leitura da microplaca 10 µl do conteúdo de cada um dos poços das colunas de 1 a 9 foram depositados em cada um dos quadrantes das placas de Petri (A, B, C, D, E, F, G e H).

Após 24 horas em estufa bacteriológica não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos quadrantes das placas 1, 2, e 9 o que está de acordo com os resultados obtidos pela coloração da microplaca.

Nas placas 3, 4, 6, 7 e 8 o crescimento bacteriano ocorreu, o que também está em concordância com os resultados obtidos na microplaca. Nas placas 3 e 4 o

crescimento bacteriano era esperado uma vez que representavam o controle do inóculo e controle negativo do experimento.

O crescimento bacteriano em todos os quadrantes da placas 6, 7 e 8 confirmou que o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* não apresentou ação inibitória sobre o crescimento do *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235) nas concentrações utilizadas em nosso estudo.

Diante destes resultados podemos concluir que o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* não apresentou ação antibacteriana contra espécies do gênero *Staphylococcus aureus* (ATCC® 23235) como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração Bactericida Mínima (CIM) do extrato *Erythroxylum subrotundum* em diferentes concentrações frente cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235).

	Concentrações (µg/ml)							
	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62
S. aureus (ATCC® 23235)	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle do meio	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle do extrato	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle do inóculo	+	+	+	+	+	+	+	+
Cotrole negative	+	+	+	+	+	+	+	+

* (-) sem crescimento visível **(+) crescimento visível

Pseudomonas aeruginosa

Os microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 29336) foram submetidos à ação do extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* de acordo com a metodologia descrita.

Foi observada presença de coloração azul apenas nos poços da coluna 1 da microplaca o que indicou ausência de atividade respiratória e, por conseguinte, ausência de crescimento bacteriano. Este resultado era esperado e nos mostra ausência de contaminação no meio utilizado.

Nos poços das colunas 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 9 foram observadas colorações diversas desde tons terrosos ao róseo. Esse fato pode ter ocorrido uma vez que a espécie bacteriana testada produz pigmento e este pode ter se misturado aos pigmentos do corante utilizado o que gerou as colorações observadas. Este evento causou dúvidas em relação ao crescimento bacteriano e, por conseguinte inviabilizou a determinação da CIM. Estas dúvidas foram sanadas com o plaqueamento em placa de Petri. Os resultados obtidos na microplaca podem ser observados na.

Após a leitura da microplaca 10 µl do conteúdo de cada um dos poços das colunas de 1 a 9 foi depositado nos quadrantes (A, B, C, D, E, F, G e H) das placas de Petri previamente preparadas com meio de cultura. As placas foram incubadas em uma estufa por 24 horas.

Após o tempo decorrido não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos quadrantes das placas 1, 2 e 9, o que se esperava uma vez que estas colunas representavam o controle do meio, do extrato e controle positivo respectivamente. O que nos confirma que o meio ou o extrato não apresentavam contaminação e que a cepa bacteriana foi sensível ao antimicrobiano utilizado.

Nas placas referentes as colunas 3 e 4 foi observado crescimento em todos os quadrantes, o que era esperado uma vez que estas colunas representam o controle do inóculo e o controle negativo respectivamente. O que confirmou que o inóculo era viável e que o DMSO não apresentou atividade antimicrobiana.

Nas placas 6, 7 e 8 realizadas em triplicata contendo meio, inóculo e extrato, o crescimento bacteriano ocorreu apenas a partir do quadrante E, nas três microplacas, mostrando que nas concentrações do extrato nos poços de A a D o crescimento bacteriano foi inibido como evidenciado na.

Dessa forma podemos verificar que o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* inibiu o crescimento do microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 29336) e que a CBM foi de 250µg/ml conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentração Bactericida Mínima (CIM) do extrato *Erythroxylum subrotundum* em diferentes concentrações frente cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 29336).

	Concentrações (µg/ml)							
	2000	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,62
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 29336)	-	-	-	-	+	+	+	+
Controle do meio	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle do extrato	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle do inóculo	+	+	+	+	+	+	+	+
Cotrole negativo	+	+	+	+	+	+	+	+

* (-) sem crescimento visível **(+) crescimento visível

Aguiar (2011) ao estudar a ação bactericida do extrato metanólico das partes aéreas de *Erythroxylum subrotundum* encontrou que a fração acetato de etila apresentou ação contra *Staphylococcus aureus* e não apresentou ação frente a bactérias gram negativas. Esses resultados, contrários aos que encontramos, nos levam a crer que o extrato botânico utilizado por esses pesquisadores continha substâncias diferentes. Essa hipótese apresenta plausibilidade, uma vez que Aguiar utilizou como solvente o metanol o que pode ter extraído do vegetal outros compostos diferentes dos extraídos pela solução etanólica utilizada neste estudo. Outro ponto a ser analisado entre os dois estudos é o fato de Aguiar ter utilizado partes aéreas do vegetal enquanto nos utilizamos apenas as folhas, o que gera o questionamento de que poderia haver substâncias presentes nas demais estruturas analisadas responsáveis pelos resultados encontrados por estes pesquisadores.

Holetz e colaboradores (2002) ao estudarem a atividade antibacteriana e antifúngica de treze espécies vegetais utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas consideraram os seguintes valores de CIM: menor que 100µg/ml significou boa atividade antimicrobiana; entre 100µg/ml e 500µg/ml

atividade antimicrobiana moderada; entre 500µg/ml e 1000µg/ml atividade antimicrobiana fraca; e maior que 1000µg/ml ausência de atividade antimicrobiana. Considerando os valores considerados por estes pesquisadores podemos concluir que o extrato etanólico de *Erythroxylum subrotundum* apresentou moderada atividade antibacteriana frente à *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que a CBM foi de 250 µg/ml e foi inativo contra *Staphylococcus aureus*, tendo o microorganismo crescido em todas as concentrações testadas.

CONCLUSÃO

O extrato etanolico de *Erythroxylum subrotundum* apresentou atividade antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa* com CBM de 250 µg/ml e não apresentou atividade sobre *Staphylococcus aureus*.

O reino vegetal é uma fonte inesgotável e promissora de novas moléculas. A resistência bacteriana aos antimicrobianos é uma realidade que coloca em risco a saúde da população mundial nos dias atuais e futuros e deve ser combatida em varias frentes.

ABSTRACT

From early civilizations the therapeutic potential of the species of the plant kingdom are known and exploited, either in the form of teas, ointments, or even as modern medicine today. The species *Erythroxylum* are known and used in folk medicine for the treatment of various infections. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are pathogenic microorganisms present in our country and responsible for much of the community and hospital infections. Its ability to acquire resistance to antibiotics has led health professionals to an unceasing search for new drugs that can work around this problem. This research was intended to evaluate the in vitro antibacterial activity of *Erythroxylum subrotundum* extract on the species *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Using the technique of microdilution the hydroethanol extract of the plant species tested at concentrations of 2000 µg/mL to 15,62 µg/mL. There was no antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The tested *Pseudomonas aeruginosa* strains showed sensitivity to the action of extract with an

observed minimum inhibitory concentration of 250 µg/ml. The plant kingdom is an inexhaustible and promising source of new molecules. The organic diversity of the compounds produced by the secondary metabolism of these living beings needs to be explored. It is necessary that new studies be conducted to evaluate the action of other fractions of the extract and that they can be tested against clinical strains of these microorganisms.

UNITERMS: Drug resistance microbial, Microbial sensitivity tests, Plant extracts

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, que financiou o projeto e concedeu a bolsa PIBIC/CNPq/UFCG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, J. S. *Estudos das atividades antimicrobiana e anticâncer de Erythroxylum caatingae Plowman e Erythroxylum subrotundum A. St-Hil.* Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível em: <
<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/2203>>. Acesso em: 17 jun. 2019.

ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FURTADO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G.M Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, São Paulo, v.31, n.5, p. 1224-1229, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500052>

ANTUNES, R.M.P.; EDELTRUDES, O.L.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATAO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. *Rev Bras Farmacogn* v. 16, p. 517-524, 2006. Disponível em: <
<https://www.researchgate.net/publication/242230184> Atividade antimicrobiana in vitro e determinacao da concentracao inibitoria minima CIM de fitoconstituintes e produtos sinteticos sobre bacterias e fungos leveduriformes >. Acesso em: 02-06-19.

ARAÚJO, L.D.C.; FILHO, J.M.T.D.A.; SILVA, E.E.D.S.; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L.; ALMEIDA, J.R.G.D.S.; CAVALCANTI, L.S.; ARAÚJO, E.C. D.C. Avaliação da atividade antioxidante in vitro e determinação de fenóis totais de espécies do gênero *Erythroxylum*, VII Reunião Regional da FeSBE – Regional, 2012. Disponível em: <http://www.fesbe.org.br/regional2012/resumos/sexta/farmacologia_toxicologia_produtos_naturais_quimica_medicinal.pdf>. Acesso em: 02-06-19.

BARBOSA, C.C.; SILVA, F.D.; SANTOS, A.M.; VAZ, M.R.F.; NOBREGA, F.F.F. Aspectos gerais e propriedades farmacológicas do gênero *Erythroxylum*, *Revista Saúde e Ciência (on line)*, v.3, n.3, p. 207-216, 2014. Disponível em: <<http://www.ufcg.edu.br/revistasaudeeciencia/index.php/RSC-UFCG/article/download/185/122>>. Acesso em: 02-06-19.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Farmacopéia Brasileira*, ed. 5, v. 1, Brasília, 2010.

BRITO, M.A.; CORDEIRO, B.C. Necessidade de novos antibióticos. *J Bras Patol Med Lab*, v. 48, n. 4, p. 247-249, Ago.,2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v48n4/v48n4a02.pdf>>. Acesso em: 02-06-2019.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. *M07-A10*, v. 35. n. 2, 2015. Disponível em: <https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf>. Acesso em: 03-06-2019.

CORDEIRO, C.H.G.C.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORREA, M.A.; PIZOLLITTO, A.C.; BAUB, T.M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulações para higiene bucal. *Rev. Bras. Cienc. Farm*, v. 42, n. 3, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000300008>.

COSTA-LIMA, J.L.; LOIOLA, M.I.B.; JARDIM, J.G. Erythroxylaceae no Rio Grande do Norte, Rodriguésia, v.65, n.3, p. 659-671, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/2175-7860201465306>

FURST, A.L.; FRANCIS, M.B. Impedance-Based Detection of Bacteria. *Chem. Rev.* v. 119, n. 1, p. 700–726, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00381>

GONZALES-GUEVARA, J.L.; VÉLEZ-CASTRO, H.; GONZÁLES-GARCIA, K.L.; PAYO-HILL, A.L.; GONZÁLES-LAVAUT, J.A.; MOLINA-TORRES, J.; PRIETO-GONZÁLES, S. Flavonoid glycosides from Cuban *Erythroxylum* species, *Biochemical Systematics and Ecology*. 34(6): 539-542, 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2006.01.003>

GUO, H. Isatin derivatives and their anti-bacterial activities. *Eur J Med Chem.* v. 164, p. 678-688, Feb., 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.017>

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D.R.; Inácio, C.V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. *Arq. ciências saúde UNIPAR.* v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v11i3.2007.2037>

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* v. 97, n. 7, p. 1027-1031, Oct., 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

KURUPPU, A.I.; PARANAGAMA, P.; SILVA, R. Anticancer potential of natural products: a review focusing on Sri Lankan plants. *Front Biosci (Schol Ed),* v. 11, p. 161-177, 2019. <http://dx.doi.org/10.2741/s532>

ORANTES-GARCIA, C.; MORENO-MORENO, R.A.; CABALLERO-ROQUE, A.; FERREIRA-SARMIENTO, O. Plantas utilizadas en la medicina tradicional de comunidades campesinas e indígenas de la Selva Zoque, Chiapas, México. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat,* v. 17, n. 5, p. 503- 521, 2018. Disponível em: <<http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/view/3515/26002830>>. Acesso em: 01-06-2019.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.,* v. 46, n. 8, p. 2720-2722, Aug., 2002. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.46.8.2720-2722.2002>

RODEIRO, I.; DONATO, M.T.; LAHOZ, A.; LAGUNA, A.; CASTELL, J.F.; DELGADO, R.; GOMEZ-LECHON, M.J. Modulation of P450 enzymes by Cuban natural products rich in polyphenolic compounds in rat hepatocytes, *Chem Biol Interact,* v. 1, n. 172, p. 1-10, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.10.004>

SILVA, G.L. CUI, B.; CHAVEZ, D.; YOU, M.; CHAI, H.; RASOANAIVO, P.; LYNN, S.M.; O'NEILL, J.M.; LEWIS, J.A.; BESTERMAN, J.M.; MONKS, A.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, D.A. Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*, *J. Nat. Prod.,* v. 64, n. 12, p. 1514-1520, 2001. <https://doi.org/10.1021/np010295+>

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia,* v. 12, n.1, p. 35-40, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2002000100005>

WHO. World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*. Geneva, Switzerland, 2015. Disponível em: < <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>>. Acesso em: 15/05/2019.