



CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U. nº 198, de 14/10/2016
AELBRA EDUCAÇÃO SUPERIOR - GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO S.A.

Rafael Marques dos Santos

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DE *Caesalpinia pyramidalis*

Palmas – TO

2019

Rafael Marques dos Santos

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS
DE *Caesalpinia pyramidalis*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e
apresentado como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina pelo Centro
Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos.

Palmas – TO

2019

Rafael Marques dos Santos

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DE
Caesalpinia pyramidalis

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e
apresentado como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina pelo Centro
Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ernane Gerre Pereira Bastos

Orientador

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. M.e Luís Fernando Albarello Gellen

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Prof. M.e Luís Fernando Sesti

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

Palmas – TO

2019

Dedico este trabalho a minha mãe Orestes, meu pai Tião Boiadeiro (in memoriam) e aos meus irmãos por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A minha família pelo incentivo e por creditarem no meu trabalho.

A esta universidade e seu corpo docente que forneceram informações *sine qua non* a minha vida profissional. Além de terem feito parte dos melhores momentos que vivi.

Aos amigos pelo apoio e momentos alegres.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
2.1 DESENHO DO ESTUDO.....	9
2.2 CONFECÇÃO DOS EXTRATOS.....	9
2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	9
2.4 LEITURA DAS PLACAS.....	10
2.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	10
2.5.1 ALCALÓIDES.....	10
2.5.2 ANTRAQUINONAS.....	10
2.5.3 FLAVONÓIDES.....	10
2.5.4 SAPONINAS.....	11
2.5.5 TANINOS.....	11
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4 CONCLUSÕES.....	14
REFERÊNCIA.....	14
APÊNDICE.....	16

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E PERFIL FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DE
Caesalpinia pyramidalis

ANTIMICROBIAL ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL PROFILE OF *Caesalpinia*
pyramidalis EXTRACTS

Rafael Marques dos Santos^a; Ernane Gerre Pereira bastos^b

^aSANTOS, Av. Teotônio Segurado 1501 Sul, Palmas, CEP 77.019-900, rm87004@gmail.com.

^bBASTOS, Av. Teotônio Segurado 1501 Sul, Palmas, CEP 77.019-900, bastosemne@hotmail.com.

Resumo

Caesalpinia pyramidalis popularmente conhecida como catinga de porco é uma espécie de planta encontrada no Brasil, principalmente na região Nordeste. Seu uso é bem difundido nas populações principalmente para o tratamento de infecções catarrais, diarreicas dentre outras. Diversos componentes químicos descritos na literatura com ação antimicrobiana já foi relatado nesta espécie vegetal. A metodologia aplicada para determinar Concentração Inibitória Mínima foi a microdiluição em microplaca 96 poços em triplicata. Este trabalho teve como objetivo avaliar atividade antibacteriana de extrato da folha de *C. pyramidalis*, bem como verificar o perfil fitoquímico do mesmo. Os resultados demonstraram que os extratos de *C. pyramidalis* possuem atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* 0023, *Staphylococcus epidermidis* 0128 e *Klebsiella pneumoniae* 0083. A triagem fitoquímica demonstrou a presença de taninos, alcalóides, flavona e flavonol o que pode justificar a ação antibacteriana dos extratos desta planta.

Palavras-chave: Bactericida. Fitoquímica. *C. pyramidalis*.

Abstract

Caesalpinia pyramidalis popularly known as pig catinga is a species of plant found in Brazil, mainly in the Northeast region. Its use is widespread in populations mainly for the

treatment of catarrais, diarrheic infections, among others. Several chemical components described in the literature with antimicrobial action have already been reported in this plant species. The methodology applied to determine Minimum Inhibitory Concentration was microdilution in microplate 96 wells in triplicate. This study aimed to evaluate antibacterial activity of *C. pyramidalis* leaf extract, as well as to verify the phytochemical profile of *C. pyramidalis*. The results showed that *C. pyramidalis* extracts have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* 0023, *Staphylococcus epidermidis* 0128 and *Klebsiella pneumoniae* 0083. Phytochemical screening demonstrated the presence of tannins, alkaloids, flavone and flavonol which may justify the antibacterial action of this plant.

Keywords: Bactericidal. Phytochemistry. *C. pyramidalis*.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a terapêutica antimicrobiana convencional é uma prática antiga que segue de acordo com o perfil internacional. Medicamentos são lançados no mercado e o seu uso adotado imediatamente. Alguns prejuízos têm sido atribuídos em função do uso iatrogênico e abusivo de antimicrobianos de origem sintética ou natural. A resistência microbiana e a automedicação são alguns desses (VEGNI, PANCERIB e BIFFIC, 2004).

Por outro lado, estudos etnobotânicos feitos em várias regiões do país têm sinalizado positivamente mostrando a intensificação da medicina tradicional. A vasta biodiversidade vegetal pode ser uma forma alternativa no combate as infecções microbianas (LOCHER, 1995). As plantas sintetizam uma variedade de substâncias com atividade antimicrobiana, que apresentam uma diversidade de estruturas químicas capazes de reconhecerem e se ligarem a alvos moleculares presentes em bactérias patogênicas (BRAGA, 1976).

A *Caesalpinia pyramidalis* faz parte da família das *Leguminosae* (*Fabaceae*), classe das *Dicotyledoneae* endêmica do Sertão Nordeste, popularmente conhecida por “catingueira” e “catinga de porco” (BRAGA, 1976), habitando lugares pedregosos (BAHIA et al., 2005) e podendo atingir até 4 metros de altura. Na medicina popular as flores, folhas e cascas são usadas no tratamento das inflamações rica em exsudato, nas diarreias e disenterias patogênicas (BRAGA, 1976), ainda apresenta ação antipirética e como diurética (BAHIA et al., 2005). Das folhas foram isoladas moléculas com ação antibacteriana

(MENDES et al., 2000). Neste estudo objetivou-se realizar triagem fitoquímica e atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos de folhas de *C. pyramidalis* frente às cepas ATCC de *S. aureus* 0023, *S. epidermidis* 0128 e *K. pneumoniae* 0083.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DESENHO DO ESTUDO

Esta é uma pesquisa aplicada, de natureza quali-quantitativa, com objetivo exploratório. Através de procedimento experimental, foi realizado no laboratório da instituição de ensino CEULP/ULBRA, Palmas-TO, a avaliação do potencial antimicrobiano (frente a bactérias patogênicas) dos extratos das folhas e de *C. pyramidalis*.

2.2 CONFECÇÃO DOS EXTRATOS

As amostras vegetais foram coletadas na fazenda Saltinho em Almas-TO e identificadas pelo herbário da UFT em seguida colocadas em estufa a 40 °C para secagem. As folhas foram trituradas no moinho de facas. Seguidamente, as mostras foram pesadas e submetidas à extração etanólica 70% e metanólica 99.8% em extrator Soxhlet (SIMÕES *et al.*, 2000) para evaporar o solvente, e suspensa em dimetilsulfóxido (DMSO) 1%.

2.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes de concentração inibitória mínima (*minimalinhibitory concentration* – MIC) foram realizados pela metodologia padronizada de microdiluição em microplacas de 96 cavidades em triplicata (BEBEAR, 1996). Primeiramente, foi realizada uma diluição seriada dos extratos de planta, onde 100 µL de meio de cultura foram adicionados 100 µL do extrato 200 mg/mL; e homogeneizados com 100 µL de meio na cavidade seguinte, e assim sucessivamente, desprezando 100 µL do último poço. Em seguida adicionou 5 µL da solução 10^7 conforme escala Mac Farland em todas as cavidades (BENFATTI *et al.*, 2019). Como controle negativo foi feita uma diluição seriada do próprio solvente (DMSO 1%) e o mesmo foi feito com Cloranfenicol 200 mg/mL para positivo, sem extrato de planta. E do meio de cultura com apenas Mueller Hinton e inóculo. Após incubação de 37 °C por 24 horas adicionou-se em todas as cavidades 30 µL de resazurina 0,03% homogeneizando onde, após 24 horas de incubação, realizou leitura.

2.4 LEITURA DAS PLACAS

A leitura do resultado ocorreu pela observação da reação colorimétrica do ensaio com resazurina onde o meio se torna roxo quando há inibição e rosa quando há crescimento. As cores dos poços testes foram comparadas com os controles em relação à concentração Inibitória mínima (CIM). Ver (**Tabela 01**).

2.5 TRIAGEM FITOQUÍMICA

Para a realização da triagem fitoquímica foi utilizada a metodologia apresentada por Costa (2002).

2.5.1 ALCALÓIDES

Foram pesados 2 g da droga vegetal pulverizada e na sequência mediu-se 15 mL de HCL 2% e levou-se ao banho-maria por 5 minutos. Realizou-se outra extração utilizando a mesma quantidade da droga vegetal e HCL 0,1N. Ambas as soluções foram filtradas sob o funil de separação e após, foi adicionado hidróxido de amônia (qsp) para alcalinizar o meio (pH > 8). Foi adicionado o clorofórmio 99.8% para solubilizar e dividido em 3 tubos. Para cada um dos tubos foi adicionado 4 gotas de um reagente, Wagner, Dragendorff e Mayer. É observada a presença de alcaloides por meio da formação de precipitado ou turvação. *Peumus boldus* foi usado como controle positivo das reações.

2.5.2 ANTRAQUINONAS

Em dois tubo de ensaio foi adicionado 1 g da droga vegetal em cada e na sequência 10 mL de éter etílico no primeiro e amônia 10% no segundo, agitou-se cuidadosamente. Observou se houve coloração rosa ou vermelha na porção superior (fase aquosa) para as formas livres ou heterosféricas. E controle usou a *Cassia angustifolia*.

2.5.3 FLAVONÓIDES

Para a identificação da presença de flavonóides, foi realizada a reação de Shinoda e com Sais de Ferro. No qual se pesou 5 g da droga vegetal e foram extraídas as moléculas usando o etanol a 75% no banho-maria por 5 minutos. Retirou-se 8 mL da solução e evaporou totalmente na chapa aquecedora utilizando a cápsula de porcelana até obter-se o extrato seco. O extrato foi lavado com clorofórmio em duas vezes de 10 mL e ressuspenso na cápsula de porcelana com 5 mL de metanol 99.8 %. A solução foi

transferida para um tubo de ensaio e adicionado 10 mg de magnésio em pó e 1 mL de ácido clorídrico P.A. para observar se houve coloração vermelho (flavonol) ou laranja (flavona). O Controle positivo foi a *Calendula officinalis*.

2.5.4 SAPONINAS

A solução extrativa foi obtida por decocção no banho-maria utilizando 2 g da droga vegetal e 100 mL de água destilada. Após 10 minutos, filtrou-se a solução. Posteriormente foram feitos o teste de espuma e reação de Salkowski para triterpênicos ou esteróides. O *Tribullus terrestris* foi empregado como controle positivo.

2.5.5 TANINOS

A solução extrativa foi obtida por decocção no banho-maria utilizando 5 g da droga vegetal e 100 mL de água destilada. Após 10 minutos, filtrou-se a solução. Em seguida realizou os testes de Gelatina, de Sais de Ferro e com Acetato de Chumbo. A presença de taninos condensados ou hidrolisáveis é confirmada por meio da formação de cor e precipitados. Como controle positivo das reações foi usado o *Stryphnodendron barbatiman*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e metanólico, foi evidenciada com a inibição das bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*, todas as diluições testadas neste trabalho inibiram o crescimento das cepas avaliadas, sendo que a menor concentração testada foi de 1,5625 mg/mL como mostra a (**Figura 1**) e (**Tabela 1**).

Os Trabalhos semelhantes realizados por Saraiva *et al* (2012) e Pereira *et al* (2006) com extrato das folhas de *C. pyramidalis* apresentou ação antibacteriana na concentração de 2 mg/mL contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* que está de acordo com os dados aqui relatados, no entanto neste trabalho demonstrou ser mais eficiente por inibir em menores concentrações entre 200 a 1,5625 mg/mL. O achado de concentração inibitória da *C. pyramidalis* frente a *S. epidermidis* é um dado novo que contribui enriquecendo a literatura especializada.

Tais diferenças nas concentrações inibitórias já eram esperadas, pois a *C. pyramidalis* usada neste trabalho foi coletada na região norte, Cerrado, diferente da *C. pyramidalis* dos trabalhos citados anteriormente que são originárias do nordeste, Caatinga. De acordo com Oliveira *et al.* (1998), essa variação pode ter ocorrido devido aos fatores intrínsecos (ex. idade, saúde e carga genética do vegetal) e extrínsecos (ex. incidência solar, temperatura,

Ausência de crescimento bacteriano (-).

De acordo OSTROSKY *et al.*(2008), a Técnica de microdiluição que utiliza microplaca 96 poços é um método barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos descritos na literatura como macrodiluição e difusão em disco, necessita de pouca quantidade amostra, pode ser usado para grande número de amostras e deixa registro permanente. No entanto alta concentração clorofila presente no extrato interfere na interpretação do resultado devido à coloração verde ser a mesma cor observada para inibição do crescimento bacteriano. E outro inconveniente relatado é a adesão de alguns microrganismos a base do poço enquanto outros permanecem em suspensão.

A triagem fitoquímica dos extratos metanólico 99.8% e etanólico 70% das folhas *C. pyramidalis* detectou a presença de diferentes classes de metabólitos secundários como, taninos, alcalóides, flavona e flavonol. Testes para saponinas esteróides /triterpênicas foram realizados embora não tenha sido detectada nestes extratos. (**Tabela 2**).

A atividade antibacteriana demonstrada neste estudo pode ser atribuída aos metabólitos secundários presentes nas folhas como taninos hidrolisáveis devido às três características: complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos (MONTEIRO *et al.*, 2005; MELLO & SANTOS, 2001). Segundo SCALBERT (1991 apud CASTEJON, 2011) afirma que taninos condensados e hidrolisáveis não apresentam diferenças significativas frente a fungos e bactérias, e justifica que o efeito da toxicidade relacionado à estrutura molecular do tanino é ainda desconhecido. E aos polifenóis flavona e flavonol (COWAN, 1999) da classe das isoflavonas (SIMÕES, SHRMKEL, *et al.*, 2017). Ambas as classes fitoquímicas não foram inibidos pelas moléculas produzidas pelas espécies bacterianas no estudo (LIMA *et al.*,2006). Pelos resultados obtidos, Os extratos metanólico e etanólico mostraram ser eficientes na extração de moléculas com ação antimicrobiana, porque preservou o poder antibacteriano dos compostos extraídos, mesmo que estes solventes possam retirar parte do princípio (OLIVEIRA, AKIUE e AKISUE, 1998). De acordo Mendes (2000), o estudo fitoquímico feito nesta espécie revelou compostos fenólicos (ácido glicosil-fenilpropenoídeo), além de ácido 4-O-b-glucopyranosyloxy-Z.-7-ydroxycinnamic e ácido 4-O-b-glucopyranosyloxy-Z.-8-hydroxycinnamic..

Tabela 2-Análises fitoquímica do extrato de *C. pyramidalis*

Ensaio	Reação realizada	Controle positivo	Extrator (E)	Presença da molécula
Taninos	Gelatina	<i>Stryphnodendron barbatiman</i>	Água destilada	Taninos hidrolisáveis
	Sais de ferro			
	Acetato de chumbo			
Alcalóides	Wagner/Dragendoff /Mayer	<i>Peumus boldus</i>	Ácido clorídrico 2%	Alcalóides
Flavonóides	Shinoda	<i>Calendula officinalis</i>	Etanol 75%	Flavona e Flavonol
	Sais de ferro			

4 CONCLUSÕES

Os extratos da folha de *C. pyramidalis* apresentaram atividade antimicrobiana frente às linhagens de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*. Apesar dos dados promissores ainda são necessários estudos mais aprofundados para elucidar melhor as moléculas como cromatografia e espectrofotometria, o seu papel antibacteriano por Concentração Inibitória Mínima, e citotóxica em hemácias e cultura celular.

REFERÊNCIA

BAHIA, M. V. et al. Biflavonoids and other Phenolics from. **J. Braz. Chem. Soc**, 2005. 1402-1405.

BEBEAR, C.; J., R. **Determination of the minimal inhibitory concentration**. San Diego: Academic press, v. 2, 1996. 189-97 p.

BENFATTI, C. S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 2, n. 1, p. 35, 2019.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste - especialmente do Ceará** Fortaleza : Mossoroense, 1976.

CASTEJON, F. V. **TANINOS E SAPONINAS**. Orientador: José Henrique Stringhini. 2011. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade federal de Goiás, Escola de veterinária e zootecnia, Goiânia, 2011.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, n. 12, p. 564-582, 1999.
- LIMA, M. R. F. D. et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 3, n. 16, p. 3002-3004, 2006.
- LOCHER, C. P. et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 23-42, 1995.
- MELLO, J. C. P. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, 2001. Cap. 24, p. 517-543.
- MENDES, C. C. et al. Constituents of *Caesalpinia pyramidalis*. **Fitoterapia**, n. 71, p. 205-207, 2000.
- MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, Pernambuco, v. 28, n. 5, p. 895-896, 2005.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 2, n. 18, p. 301-307, 2008.
- OLIVEIRA, F. D.; AKIUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
- PEREIRA, M. D. S. V. et al. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, Patos, v. 2, n. 1, p. 40-41, 2006.
- ROBBERS, J. E. **farmacognosia e farmacotecnologia**. [S.l.]: Premier, 1997.
- SARAIVA, A. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e perfil fitoquímico de *caesalpinia pyramidalis* TULL. (FABACEAE). **Revista de Viologia e Farmácia**, Recife, v. 7, n. 2, p. 52-58, 2012.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: DA UFCS; Universidade UFRS, 2000.

VEGNI, F. E. . M. L.; PANCERIB, M. L.; BIFFIC, M. Three scenarios of clinical claim reimbursement for nosocomial infection: the good, the bad, and the ugly. **Journal of Hospital Infection**, v. 56150-155, 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE
Caesalpinia pyramidalis