



Artigo Original

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS EXTRATOS HEXÂNICO E ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *ZEYHERIA TUBERCULOSA*\*

*IN VITRO* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HEXANE AND ETHANOL EXTRACTS OF *ZEYHERIA TUBERCULOSA* LEAVES

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRACTOS HEXANO Y ETANÓLICO DE HOJAS DE *TUBÉRCULOS ZEYHERIA*

Robson da Silva Ramos<sup>1</sup>, Patrícia de Albuquerque Sarmiento<sup>2</sup>, Thaís Honório Lins<sup>2</sup>, Ingrid Martins Leite Lúcio<sup>3</sup>, Lucia Maria Conserva<sup>4</sup>, Maria Lysete de Assis Bastos<sup>5</sup>

Analisou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hexânico e etanólico das folhas da *Zeyheria tuberculosa*, conhecida como ipê-felpudo, contra várias cepas de micro-organismos patogênicos. O Estudo experimental *in vitro* foi realizado no Laboratório de Pesquisas em Tratamento de Feridas, do Curso de Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, de maio a outubro de 2011. Os extratos avaliados, tanto pelo método de difusão em disco, quanto pela microdiluição mostraram-se promissores para *Staphylococcus aureus*, porém para as demais cepas bacterianas e fúngicas não houve atividade inibitória. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados mostraram que tanto o extrato hexânico quanto o etanólico apresentaram uma forte atividade antimicrobiana, inibindo a cepa em concentrações maiores que o da gentamicina, padrão de referência utilizado. Não se observou atividade antifúngica com os extratos. Conclui-se que a boa atividade antibacteriana das folhas e caule desta espécie vegetal é promissora para a continuação dos estudos em modelo animal.

**Descritores:** Bioensaios; Plantas Medicinais; Bignoniaceae; Testes de Sensibilidade Microbiana.

We analyzed the *in vitro* antimicrobial activity of ethanol and hexane extracts of *Zeyheria tuberculosa* leaves, known as *ipê-felpudo*, against several strains of pathogenic microorganisms. An *in vitro* experimental study was conducted in the Wound Healing Research Lab of the Nursing Course of Federal University of Alagoas, Brazil, from May to October 2011. The extracts evaluated by both the disk diffusion method and by microdilution have shown promising for *Staphylococcus aureus*, however for other bacterial and fungal strains there was no inhibitory activity. The tests were performed in triplicate. The results showed that both the ethanol and hexane extract showed a strong antimicrobial activity, inhibiting the strain at concentrations greater than the gentamicin, reference standard used. Antifungal activity was not observed with the extracts. It is concluded that the good antibacterial activity of these leaves and stems of this plant species is promising for further studies in animal models.

**Descriptors:** Biological Assays; Plants, Medicinal; Bignoniaceae; Microbial Sensitivity Tests.

Se ha analizado la actividad antimicrobiana de extractos etanolitos y hexano de hojas de *tubérculos Zeyheria*, conocida popularmente como ipe-suave, contra varias cepas de patógenos. Estudio experimental *in vitro* desarrollado en Laboratorio de Investigación en el Cuidado de Heridas, Curso de Enfermería, Universidad Federal de Alagoas, Brasil, de mayo a octubre de 2011. Los extractos evaluados por método de difusión en disco, y por micro dilución se han mostrado prometedores para *Staphylococcus aureus*, pero para otras cepas de bacterias y hongos que no había actividad inhibitoria. Las pruebas se realizaron por triplicado. Los resultados señalaron que tanto el extracto hexano y etanol ha mostrado fuerte actividad antimicrobiana, la inhibición de la cepa en concentraciones superiores a gentamicina, estándar de referencia utilizado. Buena actividad antibacteriana de hojas e tallo de la especie vegetal é promissora para continuación de estudio en modelo animal.

**Descriptores:** Bioensayos; Plantas Medicinales; Puebras de Sensibilidad Microbiana.

\*Pesquisa financiada com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq – Processo Nº 474023/2010 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas/FAPEAL - Processo Nº 00000007/2010.

<sup>1</sup>Graduando do Curso de Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió, Alagoas, Brasil. Membro do Grupo Núcleo de Pesquisa e Inovação Tecnológica em Tratamento de Feridas - CNPq-UFAL. E-mail: robinho\_tcha@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Enfermeira, Doutoranda Renorbio – Ponto Focal Maceió; Professora Assistente do Curso de Enfermagem/UFAL, Maceió –AL. Brasil. E-mail: enfpatricia@hotmail.com/honoriothais@gmail.com

<sup>3</sup>Enfermeira, Doutora em Enfermagem /UFC. Professora Adjunta do Curso de Enfermagem/UFAL, Maceió-AL, Brasil. E-mail: ingrid\_lucio@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Farmacêutica, Doutora em Química Orgânica/USP. Professora Associada do Instituto de Química e Biotecnologia/UFAL, Maceió - AL. Brasil. E-mail: lmc@qui.ufal.br

<sup>5</sup>Enfermeira, Doutora em Ciências/UFAL. Professora Adjunta do Curso de Enfermagem /UFAL, Maceió - AL, Líder do Grupo Núcleo de Pesquisa e Inovação Tecnológica em Tratamento de Feridas - CNPq-UFAL. Brasil. E-mail: lysetebastos@gmail.com

## INTRODUÇÃO

As plantas têm sido usadas ao longo da história da humanidade, por várias culturas como a principal ou até mesmo a única matéria prima no tratamento de diversas afecções. Seu uso terapêutico na saúde humana constitui-se prática milenar, construída conjuntamente à sabedoria do senso comum, articulando-se saúde e cultura, inseridas em um contexto histórico determinado. Muitos avanços foram conquistados envolvendo a fitoterapia para a promoção e recuperação da saúde das pessoas<sup>(1)</sup>. A medicina tradicional chinesa é o grande exemplo desta evolução, sendo que até hoje muitas espécies e preparos vegetais medicinais são estudados para entendimento de seu mecanismo de ação e isolamento dos princípios ativos.

A utilização de plantas medicinais, prática tradicional entre os povos de todo o mundo, tem recebido incentivos da Organização Mundial da Saúde<sup>(2)</sup>. Neste contexto e para o cumprimento de suas atribuições de coordenação do Sistema Único de Saúde (SUS) e de estabelecimento de políticas para garantir a integralidade na atenção à saúde, o Ministério da Saúde apresentou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, integrando justificativas de natureza política, técnica, econômica, social e cultural. Esta política atende, sobretudo, a necessidade de se conhecer, apoiar, incorporar e programar experiências que vêm sendo desenvolvidas na rede pública de muitos municípios e estados, entre as quais se destacam aquelas no âmbito da Medicina Tradicional Chinesa-Acupuntura, da Homeopatia, da Fitoterapia, da Medicina Antroposófica e do Termalismo-Crenoterapia<sup>(3)</sup>.

O Brasil, país continental, é detentor de uma das maiores biodiversidades do planeta possuindo, aproximadamente, 120.000 espécies vegetais. No entanto, somente 10% destas espécies foram estudadas do ponto de vista químico e biológico<sup>(4)</sup>.

Entre milhares de plantas medicinais brasileiras, os ipês ocupam lugar de destaque, dentre eles o Ipê felpudo, cujo nome científico é *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur., que pertence à família das Bignoniaceae<sup>(5)</sup>. A *Zeyheria tuberculosa* é conhecida popularmente como ipê-tabaco, bolsa-de-pastor, ipê-felpudo, ipê-cabeludo, dentre outros. É uma árvore de médio a grande porte, que mede de 15 a 23 metros de altura, com 40 a 60 centímetros de diâmetro em sua fase adulta, com tronco reto, cilíndrico e casca grossa cinza a pardo-amarelada, suas folhas são opostas cruzadas, pentadigitadas, grandes e largas, medindo 50 a 90 cm de comprimento<sup>(4)</sup>.

Plantas desta família não possuem um único tipo de *habitat* no território brasileiro, o qual apresenta alguns táxons endêmicos, sendo considerado o centro da sua diversidade. A exuberância durante o florescimento faz com que muitas espécies de Bignoniaceae sejam utilizadas no paisagismo e arborização urbana. A madeira dos exemplares dessa família é utilizada na construção civil, fabricação de móveis, cabos de ferramenta, instrumentos agrícola e na indústria papelreira<sup>(6)</sup>.

O relato de atividade biológica nas Bignoniaceae brasileiras como antimalárico, antitumoral, antiviral, contra infecções e cicatrizante de feridas tem sido atribuído à presença dos seguintes metabólitos secundários como naftoquinonas, mangiferina que é uma xantona e a vários flavonóides<sup>(7-9)</sup>.

Dentre os estudos no Brasil, no campo de possibilidades de investigação na linha da pesquisa básica experimental e da Enfermagem destaca-se a tese de doutorado no Programa de Pós – Graduação em Química e Biotecnologia/UFAL, na área de concentração de produtos naturais, de uma enfermeira, que isolou quatro flavonóides de extrato do caule de *Zeyheria tuberculosa* (Bignoniaceae) e testou a atividade antimicrobiana desses metabólitos secundários contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, na

perspectiva da sua utilização como matéria prima de um futuro fitoterápico para o tratamento de feridas infectadas encontrando atividade antimicrobiana. O estudo fitoquímico contribuiu para ampliar o perfil quimiotaxonômico do gênero *Zeyheria* e os resultados obtidos foram promissores, uma vez que os extratos, frações e compostos isolados apresentaram capacidade de controlar o crescimento de micro-organismos responsáveis pela contaminação de feridas que afetam o sistema tegumentar<sup>(10)</sup>.

Feridas são rupturas da pele causadas de forma intencional ou acidental, tratadas de acordo com sua etiologia e reação do organismo a esta injúria. Dependendo destes aspectos, as feridas podem tornar-se infectadas. A presença de infecção relaciona-se a diversidade de agentes etiológicos e mecanismos patogênicos múltiplos e classifica-se como primária ou secundária, dependendo da existência ou não de uma porta de entrada anterior à infecção (aguda ou crônica) de acordo com a duração da infecção, podendo ainda ser mono ou polimicrobianas<sup>(11)</sup>.

O cuidado com feridas é uma atividade do cotidiano do enfermeiro e intrínseca aos cuidados desde os primórdios da profissão. Atualmente, a prática de cuidados a pacientes portadores de feridas é reconhecida pela Sociedade Brasileira de Enfermagem Dermatológica (SOBEND) e Associação Brasileira de Estomaterapia (SOBEST), sendo de sua competência a avaliação, tratamento e prevenção de feridas, além da orientação e supervisão da equipe de enfermagem na execução do curativo e seu registro. Neste campo, o enfermeiro vem aperfeiçoando-se nas práticas e tecnologias de cuidado, em busca de mais autonomia, e tendo como meta a promoção de condições que minimizem o tempo de cicatrização da ferida, reduzam os riscos de infecções, previnam as recidivas e garantam a segurança e conforto do paciente<sup>(12)</sup>. Estes aspectos podem ser almejados por meio do desenvolvimento de pesquisas tanto de caráter clínico quanto experimental.

Com o objetivo de contribuir para a investigação de propriedades biológicas de plantas e a potencial utilização no tratamento de feridas infectadas, buscou-se analisar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos hexânico e etanólico das folhas da *Zeyheria tuberculosa*, conhecida como ipê-felpudo, contra várias cepas de micro-organismos patogênicos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo experimental caracterizado pela utilização de testes antimicrobianos *in vitro* realizado no Laboratório de Pesquisa em Tratamento de Feridas da Escola de Enfermagem e Farmácia da Universidade Federal de Alagoas – LpTF/ESENFAR/UFAL, no período de maio a outubro de 2011, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e Banco do Nordeste de Brasil – BNB/FUNDECI.

### Material vegetal

A coleta da planta foi realizada em maio de 2010, no município de Coruripe, Alagoas, Brasil, situado a aproximadamente 85 km de distância de Maceió (Coordenadas geográficas S 10°08'53" e O 36°10'86"). A identificação foi feita por uma botânica do Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas (IMA), exsicatas dos referidos materiais encontram-se depositadas no Herbário do IMA/AL, com a identificação MAC nº 23.816.

### Preparo do extrato

No laboratório, as folhas foram separadas e secas em temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas para facilitar a extração de seus constituintes químicos. Seguiu-se esta linha para a extração dos dois extratos, conforme sua polaridade<sup>(10)</sup>: a) Imersão das amostras vegetais trituradas nos solventes de menor (hexânico 100%) para maior (etanólico 90%) polaridade (primeiro no hexano e depois do etanol); b) Extração da matéria prima por maceração após a permanência por 15 dias no extrator, em temperatura ambiente e imersão

nos solventes; c) Evaporação dos extratos líquidos obtidos até o menor volume possível sob pressão reduzida em rotaevaporador a 40 °C; d) Exposição dos extratos em capela de exaustão até a volatização de todo solvente contido nas amostras vegetais; e) Obtenção do extrato bruto concentrado.

Posteriormente, as amostras vegetais (hexânica e etanólica) foram solubilizadas em etanol e metanol a 50%, na concentração de 50 mg/mL (solução estoque). Para tanto, discos estéreis de papel filtro Whatman nº 1, com 6 mm de diâmetro, foram colocados em microplacas estéreis com 96 orifícios de fundo chato com tampa e impregnados com 20 µL da solução estoque das amostras testes para obter uma concentração de 1000 µg/disco. Após secos em capela de fluxo laminar, à temperatura ambiente, os discos contendo os extratos testes foram mantidos sob refrigeração (aproximadamente 4°C) até o momento do uso<sup>(13)</sup>.

### Micro-organismos

As 14 linhagens microbianas usadas neste estudo foram as padronizadas pelo *American Type Cell Collection* – ATCC/Manassas - VA/USA<sup>(13)</sup>, sendo as bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (25923), *Streptococcus epidermidis* (14990), *Streptococcus pyogenes* (12344); as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* (14942), *Klebsiella pneumoniae* (31488), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Salmonella thyphimurium* (14028), *Enterobacter cloacae* (13047), *Enterobacter aerogenes* (13048); e os fungos *Candida albicans* (10231), *Candida tropicalis* (13803), *Candida parapsilosis* (22019), *Saccharomyces cerevisiae* (9763) e *Aspergillus brasiliensis* (1644). Os micro-organismos foram distribuídos pela CEFAR diagnóstica Ltda., São Paulo/SP, distribuídas pela CEFAR diagnóstica Ltda., São Paulo/SP. As amostras foram mantidas em geladeira em temperatura entre 4 e 8 °C até o uso.

Em um tubo de ensaio contendo cultivo recente (máximo 24 h) preparou-se o inóculo a partir de uma suspensão de cada micro-organismo em solução salina tamponada. A concentração do inóculo foi ajustada de modo a se obter  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Para tanto, comparou-se a turbidez da suspensão com o tubo 5 da escala de MacFarland. Após o ajuste, o inóculo foi distribuído em placas de Petri previamente preparadas com meio de cultivo com auxílio de um *swab* de algodão estéril. As superfícies de cada placa de Ágar Müeller-Hinton (bactérias) ou Sabouraud Dextrose (fungos) foram inoculadas esfregando-se o *swab* em toda a superfície do Ágar. Com o objetivo de assegurar a distribuição uniforme do micro-organismo, o procedimento foi repetido três vezes girando a placa aproximadamente 60° a cada vez<sup>(13)</sup>.

Os antibióticos usados como controle positivo foram gentamicina (10µg/disco) para *S. aureus* e *S. epidermidis*; penicilina G (10µg/disco) para *S. pyogenes*; ciprofloxacina (5 µg/disco) para *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*; ceftriaxona (30 µg/disco) para *S. thyphimurium*, *E. cloacae* e *E. aerogenes*. Os antifúngicos foram Nitrito de Miconazol (50 µg/disco) para *C. albicans* e *A. brasiliensis*; Nistatina (50 µg/disco) para *C. tropicalis*; Tiaconazol (50 µg/disco) para *S. cervisiae* e *C. parapsilosis*. Como controle negativo, discos de papel filtro Whatman nº 1 foram impregnados com metanol para o extrato hexânico e com etanol para o extrato etanólico. As placas inoculadas foram para estufa, permanecendo por 24 horas a 35 °C para as bactérias e 48 horas a 30 °C para fungos<sup>(10,13)</sup>.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

A leitura das placas foi realizada com o auxílio de um paquímetro manual. O halo de inibição de cada amostra teste foi comparado de acordo com a dimensão do halo dos controles positivos. Os resultados ao produto vegetal foram expressos em termos de tamanho do diâmetro do halo de inibição do crescimento

microbiano, de acordo com o padronizado<sup>(14)</sup> por que consideraram os seguintes critérios: menor que 9 mm – não ativo; 9 - 14 mm – parcialmente ativo; maior que 14 a 17 mm – ativo e maior que 17 mm – muito ativo<sup>(14)</sup>.

Com os resultados do teste pelo método de difusão em disco os extratos vegetais que apresentaram atividade para cepas microbianas e halos de inibição iguais ou maiores que 9 mm foram submetidos ao teste de microdiluição para o cálculo da Concentração Inibitória Mínima - CIM<sup>(14)</sup>.

Neste teste foi colocado inicialmente, 100 µL do caldo BHI 2 vezes concentrado em cada poço das colunas de 1 a 6 da microplaca de 96 orifícios com o auxílio de uma pipeta multicanal. Um volume de 100 µL da solução estoque (4.400 µg/mL) das amostras hexânica e etanólica foi adicionado nos poços de 1 a 3 e de 4 a 6 da linha A, respectivamente<sup>(14)</sup>. A seguir houve a homogeneização do conteúdo de cada orifício da linha A, transferido 100 µL deste conteúdo até a linha H, com o auxílio de uma pipeta multicanal, desprezando-se 100 µL do conteúdo dos poços desta última linha.

Em seguida, adicionou-se em cada um destes poços mais 100 µL do caldo BHI e 20 µL do inóculo microbiano previamente preparado em tubo de ensaio e

comparado com a turvação do tubo 5 da Escala de McFarland.

Nos poços as colunas de 7 a 9 foram usados para o controle de crescimento, controle negativo e controle positivo, respectivamente. Neles foram adicionados 150 µL do caldo BHI e 20 µL do inóculo. Nos poços da coluna 7 foram adicionadas 50 µL de solução salina. Nos poços da coluna 8 foram adicionados 50 µL dos solventes utilizados na preparação dos extratos (nas linhas de A a D – etanol; nas linhas de E a H – metanol).

Nos poços da coluna 9 foram adicionados ¼ de disco do antimicrobiano padrão. Em seguida a placa foi para estufa a 35° C durante 24 horas. Decorrido este período foi acrescentado 20 µL da solução reveladora, Cloreto de Trifenil Tetrazolium (TTC) a 0,5% e reincubada durante 3 horas, sob a mesma temperatura. A leitura qualitativa dos resultados considerou a mudança de cor da solução reveladora, sendo o resultado positivo (ausência de coloração) e negativo (presença de coloração rosa-avermelhada).

Por tratar-se de estudo *in vitro* e não envolver seres humanos e/ou animais o estudo não apresenta protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

disco, realizados com os extratos hexânico e etanólico das folhas da *Z. tuberculosa* contra as 9 cepas bacterianas.

## RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados dos ensaios antimicrobianos *in vitro*, pelo método da difusão em

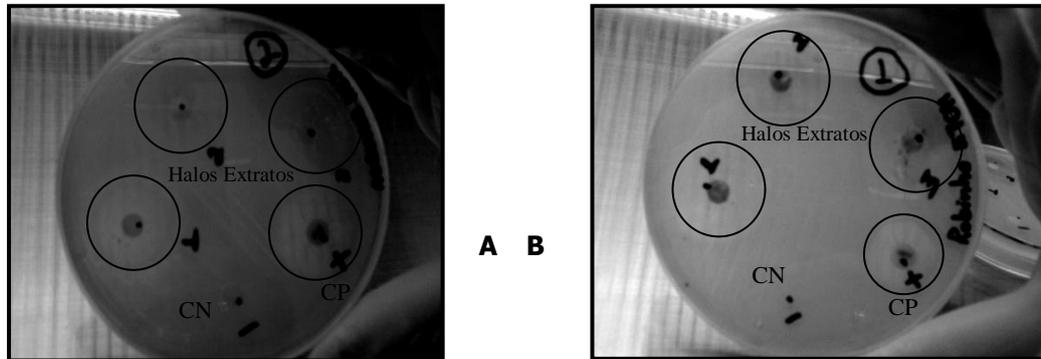
**Tabela 1** - Testes de difusão em disco com os extratos das folhas da *Z. tuberculosa* contra as bactérias. Testes realizados em triplicata. Maceió, AL, Brasil, 2011

Micro-organismos	Amostras testadas/tamanho do halo (mm)			
	CP	Extrato hexânico	CP	Extrato etanólico
<i>S. aureus</i>	28	31	19	29
<i>S. epidermidis</i>	22	-	25	-
<i>S. pyogenes</i>	16	-	14	-
<i>E. coli</i>	33	-	33	-
<i>K. pneumoniae</i>	30	-	31	-
<i>P. aeruginosa</i>	35	-	35	-
<i>S. thyphimurium</i>	28	-	29	-
<i>E. cloaceae</i>	22	-	22	-
<i>E. aerogenes</i>	13	-	16	-

Legenda: Ausência de halo de inibição de crescimento bacteriano (-). Todos os controles negativos também apresentaram ausência do halo de inibição, Controle positivo (CP=Gentamicina 10 µg).

Observou-se que, para ambos os extratos, a média dos halos de inibição foram maiores que os do controle para *Staphylococcus aureus*. Destacou-se, que o cálculo do percentual de inibição dos extratos em relação ao controle positivo foi maior em 10% e 50% para o extrato hexânico e o extrato etanólico, respectivamente.

A Figura 1 mostrou os halos de inibição dos extratos em triplicata, o halo do controle positivo e a ausência de halo no controle negativo. Observa-se que os halos dos extratos são maiores que o dos controles positivos (gentamicina).



**Figura 1** - Testes da difusão em disco em triplicata com os extratos hexânico (A) e etanólico (B) das folhas da *Z. tuberculosis* contra *S. aureus*.

Legenda: Controle Positivo (CP) e Controle Negativo (CN)

A Tabela 2 relacionou a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada extrato. O extrato etanólico apresentou uma CIM de 500 µg/mL, enquanto a CIM do extrato hexânico foi de 1000 µg/mL, corroborando o

teste de difusão em disco, no qual o halo de inibição do crescimento microbiano do extrato etanólico obteve um percentual superior ao do extrato hexânico.

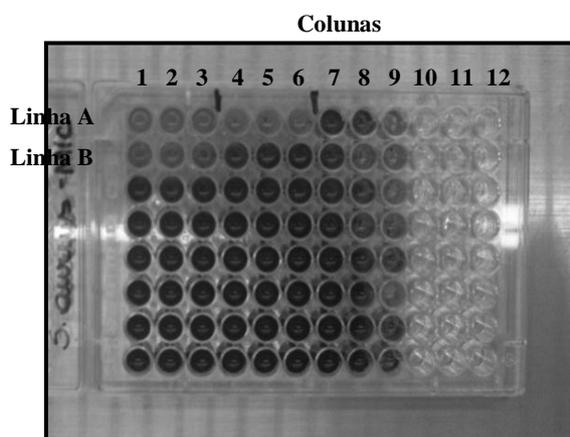
**Tabela 2** - Testes de microdiluição com os extratos das folhas da *Z. tuberculosis* contra a bactéria ativa nos testes de difusão em disco. Testes realizados em triplicata. Maceió, AL, Brasil, 2011

Micro-organismo	Concentração inibitória mínima (µg/mL)							
	Extrato hexânico							
<i>S. aureus</i>	1000	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8
	+	-	-	-	-	-	-	-
	Extrato etanólico							
	1000	500	250	125	62,5	>31,2	>15,6	≥7,8
	+	+	-	-	-	-	-	-

Legenda: Presença de atividade dos extratos (+). Ausência de atividade dos extratos (-).

A Figura 2 mostrou a ausência de crescimento microbiano no teste de microdiluição para os extratos

etanólico na linha A com uma CIM de 500 µg/mL e o hexânico na linha B, com uma CIM de 1000 µg/mL.



**Figura 2** - Teste de microdiluição em triplicata com os extratos etanólico (Linha A, coluna 1 a 3) e hexânico (Linha B, coluna 4 a 6), controle de crescimento (Coluna 7), controle negativo (Coluna 8) e Controle positivo (Coluna 9) das folhas da *Z. tuberculosa* contra *S. aureus*.

A Tabela 3 apresenta o resultado dos testes de difusão em disco realizado com os extratos da *Z. tuberculosa* com as 5 cepas fúngicas. Os dados

mostram que todos os micro-organismos foram resistentes ao extrato testado.

**Tabela 3** - Resultado dos testes de difusão em disco com os extratos das folhas da *Z. tuberculosa* contra os fungos. Testes realizados em triplicata. Maceió, AL, Brasil, 2011

Micro-organismos	Amostras testadas/tamanho do halo (mm)			
	CP	Extrato hexânico	CP	Extrato etanólico
<i>Candida albicans</i>	16	-	13	-
<i>Candida tropicalis</i>	17	-	18	-
<i>Candida parapsilosis</i>	31	-	33	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16	-	15	-
<i>Saccharomices cerevisiae</i>	22	-	25	-

Legenda: Ausência de halo de inibição de crescimento bacteriano (-). Todos os controles negativos também apresentaram ausência do halo de inibição, Controle positivo (CP=Miconazol 50 µg/disco).

## DISCUSSÃO

Estudos biológicos com espécies da família Bignoneaceae têm revelado atividade antimicrobiana em alguns dos gêneros, dentre os quais: *Dolichandrone*, *Kigelia*, *Arrabidaea*, *Newbouldia*, *Oroxylum* e *Stereospermum*, *Mayodendron*, no entanto, poucos são os relatos na literatura deste tipo de estudo com espécies do gênero *Zeyheria*. Na literatura, das dez espécies que compõem o gênero *Zeyheria*: *Z. barbata* Miq., *Z. digitada* Miq., *Z. fluviatilis* Miq., *Z. hamburiana* Corr. Mello, *Z. kuntzei* K. Shum., *Z. montana* Mart., *Z.*

*digitalis* (Vell.) Hoehne, *Z. surinamensis* Miq., *Z. tuberculosa* (Vell.) Bur. e *Z. velloziana* Miers, apenas em quatro encontra-se atividade antimicrobiana incluindo a *Z. tuberculosa*<sup>(10)</sup>.

A resistência aos antimicrobianos sintéticos representa grande desafio no tratamento das infecções. O uso indiscriminado e irregular de antibióticos faz com que as bactérias se adaptem e se multipliquem, aumentando o problema da resistência aos antimicrobianos<sup>(15)</sup>.

Esta situação tem impulsionado a busca de novas formas terapêuticas mais eficientes e menos agressivas

ao organismo humano. Os produtos naturais representam uma alternativa extremamente viável, uma vez que sempre serviram de protótipo para o descobrimento de novas drogas, pelas propriedades encontradas em seus constituintes químicos<sup>(16)</sup>.

Foi verificado, no presente estudo, que o extrato etanólico das folhas da *Z. tuberculosa* apresentou melhor atividade antimicrobiana que o extrato hexânico em ambos os testes antimicrobianos *in vitro*, contra a bactéria Gram positiva *S. aureus*. Também foi constatado que nos dois métodos de avaliação da atividade antimicrobiana os extratos testados se comportaram com perfil de sensibilidade superior ao fármaco padrão (gentamicina) utilizado como controle positivo.

Para as outras bactérias Gram positivas *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, e as Gram negativas *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. thyphimurium*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* o extrato foi inativo, conferindo resistência das bactérias aos extratos testados. Como nos testes de difusão em disco somente o *S. aureus* apresentou atividade antibacteriana, então, o teste de microdiluição somente foi realizado com esta bactéria.

Neste experimento os resultados da atividade antibacteriana com o extrato etanólico se mostraram superiores contra a bactéria *S. aureus*, tanto no teste de difusão em disco, quanto no da microdiluição, com halos de inibição de 29 mm e CIM de 500 µg/mL (corresponde a 0,5 mg/mL), aos encontrados em estudo com o extrato das folhas da *Memora nodosa*, uma planta pertencente à mesma família da *Z. tuberculosa* (Bignoniaceae) que apresentou halo inibitório na difusão em disco de 11 mm e uma CIM de 25 mg/mL, o que vem corroborar a literatura.

Para as demais bactérias os resultados da presente pesquisa revelaram a ausência de atividade antibacteriana, diferindo daqueles encontrados no estudo da atividade antimicrobiana do extrato das folhas da *M. nodosa*, que encontrou para *S. epidermidis* uma

CIM de 25 mg/mL, para *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* uma CIM de 50 mg/mL<sup>(17)</sup>.

Em estudo que investigou a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de outra espécie da família Bignoniaceae (*Jacaranda decurrens*), os resultados mostraram atividade contra algumas bactérias, dentre elas, o *S. aureus* com inibição do halo de 19,6 mm e uma CIM de 4,37 mg/mL, elegendo-a como fortemente susceptível para o extrato. Entretanto quando comparado com os resultados do extrato da *Z. tuberculosa*, esta susceptibilidade mostrou-se mais acentuada<sup>(18)</sup>.

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas humanas vem apresentando expressivo aumento, sendo as dermatomicoses as principais infecções responsáveis por esse aumento. Dentre os fungos patógenos oportunistas estão a *Candida albicans* e o *Cryptococcus neoformans*). O tratamento das micoses humanas não sempre é eficaz, pois os fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem importante toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes<sup>(1-10)</sup>

No que diz respeito à atividade antifúngica, os extratos hexânico e etanólico das folhas da *Z. tuberculosa* apresentaram-se inativos, ou seja, não houve formação de halo de inibição nos testes de difusão em disco para as cepas *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida parapsilosis*, *Aspergillus brasiliensis* e *Saccharomices cervisiae*. Estes resultados corroboram resultados apresentados no estudo da espécie vegetal *Jacaranda cuspidifolia* (Bignoniaceae)<sup>(19)</sup>.

Em outro experimento com este espécie vegetal, foram obtidos extratos, frações e subfrações, provenientes das plantas *Z. tuberculosa* e *P. hayneanum*

considerados promissores como antimicrobianos, uma vez que foram capazes de inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus* e de *Candida albicans*<sup>(10)</sup>.

Outros estudos com espécies vegetais desta mesma família têm relato de atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans*<sup>(20)</sup>. Pesquisa sobre a atividade antimicrobiana do extrato, frações e substâncias isoladas do caule da *Z. tuberculosa* identificou atividade antifúngica pelo teste de difusão em disco com CIM de 62,5 µg/disco<sup>(8)</sup>.

## CONCLUSÃO

São poucos os estudos que descrevem a atividade antimicrobiana da espécie vegetal *Z. tuberculosa*, constatando, assim, a necessidade de novas investigações para que se tenha mais conhecimento sobre a sua capacidade de inibição frente a micro-organismos patogênicos, em perspectiva de que se possa estudar a sua ação inibitória de uma forma contínua, mais especificamente, para tratamento de infecções. Porém, é necessário citar a necessidade de realização de estudos de cunho toxicológico e clínico como suporte de segurança para o uso destes produtos como fármacos.

A partir dos resultados foi verificado que os extratos (hexânico e etanólico) das folhas da *Z. tuberculosa* foram capazes de promover halos de inibição contras cepas de *S. aureus* bem maiores, que o controle positivo, com o melhor resultado para o extrato em etanol, enquanto que, as demais espécies de cepas bacterianas e fúngicas foram todas resistentes aos extratos testados.

Portanto, os extratos (hexânico e etanólico) das folhas da *Z. tuberculosa* apresentaram efeito antimicrobianos contra cepas de *S. aureus* em modelos *in vitro*. Os resultados obtidos neste estudo são promissores e estimulam sua continuidade, na perspectiva de que se possa isolar e caracterizar compostos com atividade antimicrobiana, que sirvam no

futuro como fonte para preparo de um novo fitoterápico e posteriormente um fitofármaco.

## REFERÊNCIAS

1. Alvim NAT, Ferreira MA, Cabral IE, Almeida Filho AJ. The use of medicinal plants as a therapeutical resource: from the influences of the professional formation to the ethical and legal implications of its applicability as an extension of nursing care practice. *Rev Latinoam Enferm.* 2006; 14(3):316-23.
2. Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova.* 2005; 28(3):519-28.
3. Ministério da Saúde (BR). Portaria nº 97/GM de 3 de maio de 2006. Divulga a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. *Diário Oficial da União, Brasília, 04 maio de 2006. Seção 1, p. 20.*
4. Pagano MC, Scotti MR. Effect of hosphorus fertilization on arbuscular mycorrhizal colonization of *Zeyheria tuberculosa* a native species in Brazil's forest. *Middle-East J. Sci Res.* 2010; 6(6):604-11.
5. Bastos MLA, Lima MRF, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae). *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 8(1):16.
6. Chagas Jr JM, Carvalho DA, Esteves MM. A família Bignoniaceae Juss. (Ipês) no município de Lavras/MG. *Cerne.* 2010; 16(4):517-52.
7. Moraes SKR, Silva SG, Portela CN, Numoruma SM, Quignard ELJ, Pohlit AM. Bioactive dihydroxyfuranonaphthoquinones from the bark of *Tabebuia incana* A.H. Gentry (Bignoniaceae) and HPLC analysis of commercial pau d'arco and certified *T. incana* bark infusion. *Acta Amaz.* 2007; 37(1):99-102.
8. Brandão GC, Kroon EG, Santos JR, Stehmann JR, Lombardi JA, Oliveira AB. Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. Part 2.

Screening Bignoniaceae species. Rev Bras Farmacogn. 2010; 20(5):742-50.

9. Martins MBG, Castro AA, Cavalheiro AJ. Caracterização anatômica e química de folhas de Jacaranda puberula (Bignoniaceae) presente na Mata Atlântica. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(4):600-5.

10. Bastos MLA, Houly RLS, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. Antimicrobial and wound healing activities of *Piper hayneanum*. J Chem Pharm Res. 2011; 3(4):213-22.

11. Potter PA, Perry AG. Fundamentos de enfermagem. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

12. Ferreira AM, Bogamil DDD, Tormena PC. O enfermeiro e o tratamento de feridas: em busca da autonomia do cuidado. Arq Ciênc Saúde. 2008; 15(3):105-9.

13. National Committee for Clinical Laboratory Standards/NCCLS. Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana - 15º Suplemento Informativo. 2005; 25(1):18-76.

14. Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. Rev. Bras. Farmacogn. 2008; 18(4):90-7.

15. Chaves EMC, Queiroz MVO, Almeida PC, Moreira TMM, Vasconcelos SMM. Problemática da administração

de antimicrobiano em recém-nascidos. Rev Rene. 2008; 9(3):62-7.

16. Silva JG, Souza IA, Higino JS, Siqueira-Jr JP, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Farmacogn. 2007; 17(4):572-7.

17. Tresvenzol LMF, Fiuza TS, Pimenta FC, Zatta DT, Bara MTF, Ferri PH et al. Composição química do óleo essencial e atividade antimicrobiana da *Memora nodosa* (Bignoniaceae). Lat Am J Pharm. 2009; 28(4):513-9.

18. Zatta DT, Bara MTF, Garrote CFD, Pimenta FC, Tresvenzol LMF, Fiuza TS et al. Antibacterial activity of the crude ethanol extract from *Jacaranda decurrens* Leaves. Lat Am J Pharm. 2009; 28(2):293-7.

19. Pereira EM, Machado TB, Leal ICR, Jesus DM, Damaso CRA, Pinto AV, et al. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2006; 5(1):5.

20. Owolabi OJ, Omogbai EKI, Obasuyi O. Antifungal and antibacterial activities of the ethanolic and aqueous extract of *Kigelia africana* (Bignoniaceae) stem bark. Afr J Biotechnol. 2007; 6(14):1677-80.

Recebido: 30/11/2011

Aceito: 30/08/2012