

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO DOUTOR LEÃO SAMPAIO
CURSO DE BIOMEDICINA

WERYSLAN MAXWILL ARAUJO ANDRADE

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULATÓRIO DO EXTRATO AQUOSO DA
CASCA DO CAULE DE *Stryphnodendron rotudifolium* Mart. (BARBATIMÃO)**

Juazeiro do Norte - CE

2019

WERYSLAN MAXWILL ARAUJO ANDRADE

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULATÓRIO DO EXTRATO AQUOSO DA
CASCA DO CAULE DE *Stryphnodendron rotudifolium* Mart. (BARBATIMÃO)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Biomedicina do Centro Universitário Doutor
Leão Sampaio, em cumprimento às exigências
para obtenção do grau de bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Profa. Esp. Maria Dayane Alves
de Aquino

Coorientadora: Ana Carolina Justino de
Araújo

Juazeiro do Norte – CE

2019

WERYSLAN MAXWILL ARAUJO ANDRADE

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULATÓRIO DO EXTRATO AQUOSO DA
CASCA DO CAULE DE *Stryphnodendron rotudifolium* Mart. (BARBATIMÃO)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Biomedicina do Centro Universitário Doutor
Leão Sampaio, em cumprimento às exigências
para obtenção do grau de bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Profa. Esp. Maria Dayane Alves
de Aquino

Coorientadora: Ana Carolina Justino de Araújo

Data de aprovação: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Esp. Maria Dayane Alves de Aquino

Orientadora

Prof. Msc. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

Examinador 1

Erivania Ferreira Alves

Examinador 2

POTENCIAL ANTIBACTERIANO E MODULATÓRIO DO EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO CAULE DE *Stryphnodendron rotudifolium* Mart. (BARBATIMÃO)

Werysllan Maxwill Araujo Andrade¹
Ana Carolina Justino de Araújo²
Esp. Maria Dayane Alves de Aquino³

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antibacteriano do extrato aquoso da casca do caule do *Stryphnodendron rotudifolium* Mart (Barbatimão) frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O extrato da casca do caule liofilizado foi pesado e diluído com uso de solução de água destilada estéril e DMSO em concentração de 10 mg. Foi utilizado meio BHI para que as bactérias fossem acondicionadas em estufa e assim observar o crescimento das cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. As cepas bacterianas foram disponibilizadas pelo laboratório de microbiologia da Universidade regional do cariri - URCA, foram utilizados os medicamentos gentamicina e ciprofloxacino usados nos poços de placas de microdiluição para avaliação da modulação. Foi observado após o período de incubação das bactérias um efeito de sinergismo quando houve a adição do produto natural diluído junto ao medicamento, que conseguiu diminuir a CIM das bactérias. Foi possível observar que o barbatimão conseguiu potencializar a ação dos medicamentos gentamicina e ciprofloxacino frente às cepas bacterianas, o que causou uma diminuição por quase metade da concentração inibitória mínima quando comparado com o medicamento exclusivamente.

Palavras-chave: Barbatimão, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Stryphnodendron rotudifolium Mart. (BARBATIMÃO) POTENTIAL STRAY WATER EXTRACT POTENTIAL ANTIBACTERIAL

ABSTRACT

This study aims to evaluate the antibacterial potential of the stem bark of *Stryphnodendron rotudifolium* Mart (BARBATIMÃO) against bacterial strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The lyophilized stem bark extract was weighed and diluted using sterile distilled water solution and DMSO at a concentration of 10 mg. A synergistic effects was observed after the incubation period of the bacteria when there was the addition of the diluted natural product next to the drug, witch was able to decrease the CIM of the bacteria. It was observed the barbatimão was able to potentiate the action of gentamicin and ciprofloxacin drug against bacterial strains, witch caused a decrease by almost half of the minimum inhibitory concentration when compared with the drug alone.

Keywords: Barbatimão, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

¹ Discente do curso de biomedicina, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, werysllan.maxwill@gmail.com

² Graduada em biomedicina, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, caroljustino@outlook.com

³ Especialista, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, mariadayane@leaosampaio.edu.br

1 INTRODUÇÃO

O barbatimão é utilizado desde a época da colonização indígena, com o objetivo de tratar doenças e lesões de pele e para o tratamento de parasitoses. Seu uso é bastante disseminado em algumas regiões do país mostrando que esta planta medicinal, possui um efeito terapêutico satisfatório no uso em processos inflamatórias e de tratamento de doenças e combate a resistência bacteriana (AUR, 2019).

Stryphnodendron rotundifolium Mart. é bastante utilizado com vários efeitos terapêuticos, como no tratamento de cancro duro, úlceras gástricas, tratamentos anti-inflamatórios, anti - diarréicos, anti - dematogênicas além de tratamento nos casos de algumas afecções vaginais e gonorreia (NOGUEIRA et al., 2008).

O barbatimão possui na sua estrutura taninos e outros constituintes químicos, como alcalóides flavonoides, terpenos, estilbenos, esteroides e inibidores de proteases, o que ajuda no desencadeamento da terapêutica antibacteriana inibindo principalmente cepas do grupo dos *Staphylococcus* (ABIFISA, 2010).

A resistência bacteriana é classificada como problema de saúde pública mundial, mostrando que a população corre riscos em relação ao tratamento contra alguns tipos de bactérias que conseguiram desenvolver mecanismos que impedem a ação de fármacos antimicrobianos. Estes mecanismos estão relacionados às alterações no gene bacteriano, ou até mesmo a capacidade de mudar suas características estruturais (SILVEIRA, 2006).

Isso pode acontecer de duas formas, sendo estas: intrínseca e extrínseca. A intrínseca está envolvida diretamente com os genomas das bactérias, podem acontecer de diversas formas, como por exemplo: bombas de efluxo que excretam substâncias do fármaco que realizaria o combate à bactéria, esse mecanismo pode estar relacionado com adaptações que o genoma bacteriano sofre ao entrar em contato com medicamentos que as combatem sem eficiência, o que causa alteração dos receptores da parede bacteriana. No mecanismo extrínseco a bactéria secreta substâncias que bloqueiam as células alvo (FIO, 2000).

Staphylococcus aureus é um coco gram-positivo, pertencente à flora bacteriana normal em humanos, algumas das cepas desta bactéria pode causar um efeito patológico, que pode gerar desde infecções leves a infecções que possam gerar a morte do indivíduo. O uso de antibióticos para tratamentos de doenças diversas gerou uma resistência desde meados da década de 30. Desde lá, as bactérias vem se mostrando mais resistentes aos mecanismos dos antibióticos usados atualmente (SANTOS, 2007).

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo que está presente na flora intestinal natural do ser humano, assim como outras bactérias, uma desregulação do sistema imune pode desencadear aumento de cepas patogênicas que podem gerar grandes infecções intestinais e urinárias, causando diarreia e outros sintomas característicos de demais infecções (CORDEIRO, 2004).

O uso de plantas medicinais para tratamento de doenças é de conhecimento empírico e dados mostram que na maioria das vezes não se sabe se o medicamento produzido a partir destas plantas funciona para tratamento de doenças. Esta modalidade de tratamento não é considerada totalmente aceita pela medicina, pois é necessário saber se o uso destas plantas tem o objetivo desejado (JUNIOR; PINTO, 2008).

Pesquisas sobre a associação de antibióticos e os produtos naturais estão tendo um crescimento constante, checando o aumento da eficácia do uso de produtos naturais em relação ao tratamento de doenças. Estudos indicam a combinação da gentamicina e penicilina, ou a associação entre antibióticos e produtos naturais, que atuam modificando a ação destes medicamentos, sejam estas alterações em relação ao sinergismo ou atuando nos alvos de resistência, modificando-os.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano do extrato aquoso da casca do caule de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. (barbatimão), frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, além de avaliar de modo comparativo a atividade modulatória decorrente da associação de gentamicina e ciprofloxacino ao produto natural utilizado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As cascas foram obtidas através da compra em um mercado do município de Juazeiro do Norte. Para obtenção do extrato, as cascas do caule de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. foram trituradas para aumentar a superfície de contato, e em seguida foram acondicionadas em um recipiente contendo água em quantidade suficiente para submergir todo o material vegetal, permanecendo assim por 72 horas. Após esse período, foi realizada a concentração do extrato em condensador rotativo a vácuo, obtendo-se o extrato bruto.

Os microrganismos analisados neste trabalho foram bactérias padrão de *Staphylococcus aureus* não resistente ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 6548, resistentes resistentes *S. aureus* 10 e *E. coli* 06. Todas as linhagens foram cedidas pelo Laboratório de microbiologia da Universidade Regional do Cariri - URCA.

Foi utilizado o seguinte meio de cultura: *Brain Heart Infusion* – BHI (Difco Laboratories Ltda) na concentração indicada e a 10%. Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave de vapor quente. As bactérias foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 35 °C, $\pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

As drogas utilizadas para modulação neste trabalho foram o Aminoglicosídeo Gentamicina e a Quinolona Ciprofloxacino. O produto natural e os fármacos foram utilizados em uma concentração de partida de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Essas substâncias foram dissolvidas em água estéril e DMSO.

A determinação da CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo utilizando placas esterilizadas com 96 poços com diluições em série 1:1 (NCCLS, 2003) Culturas microbianas mantidas em ágar estoque sob refrigeração foram repicadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35°C, $\pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h. Após esse período, procedeu-se a padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão em BHI, cuja turvação fosse similar ao tubo 0,5 da escala Mc Farland (1×10^8 UFC/mL). Essa suspensão foi diluída 100 vezes, em meio BHI, o que corresponde aproximadamente a uma suspensão contendo 1×10^6 UFC/mL, da qual foi retirado 100 μL e adicionado em cada poço da placa acrescido de diferentes concentrações do extrato.

A solução teste foi preparada utilizando 10 mg do produto natural solubilizado em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo uma concentração inicial de 10 mg/mL. A partir desta concentração, realizaram-se diluições em água destilada estéril para obter uma solução estoque de 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As concentrações finais das amostras no meio de cultura foram 512, 256, 128, 64, 32, 16 e 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 h. Após esse período, as placas foram reveladas com corante específico, a resazurina. Esta solução foi preparada em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após o período de incubação, 20 μL da solução indicadora foi acrescentada nas placas em cada cavidade e após uma hora em temperatura ambiente foi realizada a leitura do teste. Esta é determinada através da coloração do meio de cultura, sendo considerada positiva para os poços que não apresentaram crescimento microbiano, ou seja, permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha (SALVAT *et al.*, 2001).

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado macroscopicamente.

A realização da atividade moduladora dos antibióticos foi realizada com a cepa de bactéria multirresistente. O antibiótico em uma concentração inicial de 1024 µg/mL foi diluído em um volume de 100 µL seriadamente nos poços contendo o meio de cultura Brain Heart Infusion Broth – BHI a 10% com a suspensão com o inóculo da cepa multirresistente e o produto na concentração subinibitória (CIM/8) (COUTINHO et al., 2010). As concentrações finais foram de 512 a 0,5 µg/mL do antibiótico no meio de cultura e as placas foram incubadas por 24 horas 35 ± 2 °C. Após a incubação foi utilizado a resazurina sódica para evidenciar a atividade moduladora.

Os resultados foram expressos em média geométrica \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pos-test *Bonferroni* utilizando o software *GraphPad Prism.*, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada atividade antibacteriana no extrato em relação às cepas que foram utilizadas neste trabalho. A figura 1 mostra os resultados, onde é observado o efeito sinérgico da modulação feita pela associação do produto natural estudado com a gentamicina, frente às cepas de *S. aureus* 10 e *E. coli* 06, uma vez que o uso do fármaco unido ao produto natural causou redução na concentração inibitória mínima (CIM) quando comparado com a ação da gentamicina isolada sob essas bactérias.

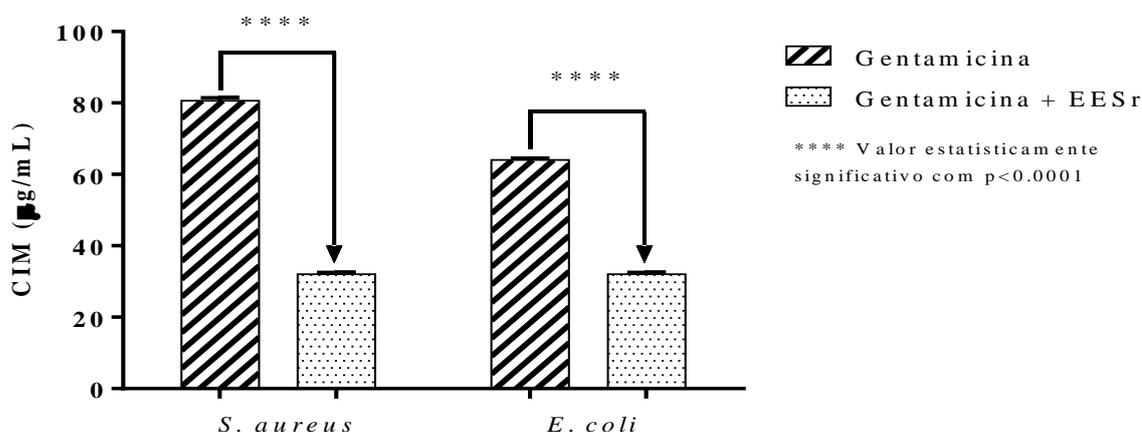


Figura 1- Atividade moduladora do extrato aquoso da casca do caule de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. com gentamicina frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

A partir dos resultados expressos pode-se observar uma relação inibitória semelhante entre as cepas de *S. aureus* e *E.coli* relacionada com o uso da gentamicina quando comparadas com o estudo de Sussmann (2001), ele explica que a resistência pode ser dada por mecanismos intrínsecos ou fatores adquiridos que são expressos fenotipicamente pelas bactérias.

O uso de plantas medicinais com propriedades terapêuticas se dissemina na população em geral para que o sinergismo bacteriano do medicamento sintético seja adquirido e aconteça uma regressão do ataque antimicrobiano. O interesse popular aumenta pelo uso de produtos naturais por conta de princípios ativos que se associam aos antibióticos e aumentam a resposta em relação ao tratamento das doenças (ANVISA, 2013; CALIXTO,2000).

Os mecanismos de resistência das bactérias se devem a partir de estruturas expressas no genoma que possam ser elementos cromossômicos e extracromossômicos que regulam a aparição de resistência aos mecanismos do medicamento (SUSSMANN, 2001). Um exemplo é a gentamicina frente ao uso associado com extrato aquoso da casca do caule de *Stryphnodendron rotudifolium* Mart., que mostra um sinergismo frente aos dois tipos de cepas usadas neste trabalho, mostrando uma eficácia maior que o uso isolado apenas do medicamento antimicrobiano.

Estes dois tipos bacterianos estão relacionados com o desenvolvimento de genes de resistência a antibióticos de diferentes classes. Em uma pesquisa realizada por LOPES (2000), mostrou que os dois tipos de bactérias apresentava-se mais comuns em infecções ao organismo humano e os dois gêneros de bactérias apresentavam semelhança na resistência a antibióticos para tratamento das infecções causadas pelas mesmas.

A figura 2 ilustra uma relação de sinergismo do antibiótico ciprofloxacino junto ao produto natural frente à cepas de *E. coli* 06 e não modificou a ação em relação às cepas de *S. aureus* 10 que mostra uma certa resistência em relação ao antibiótico.

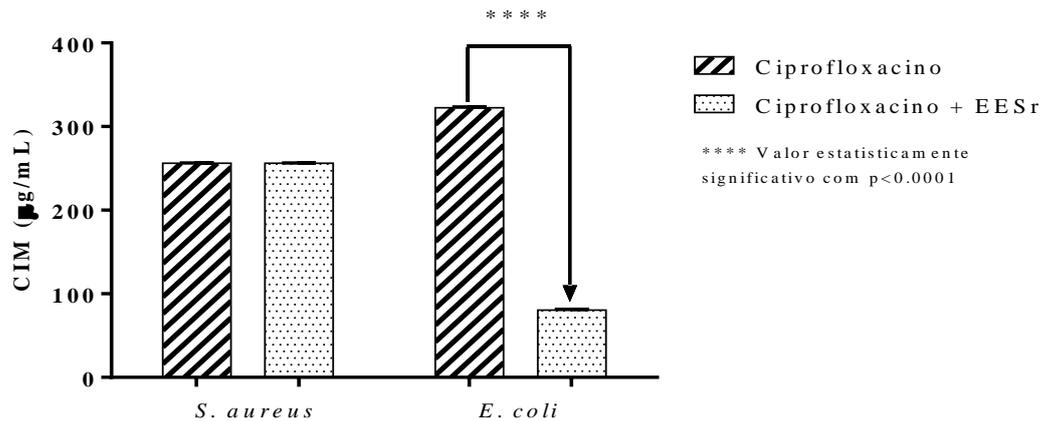


Figura 2- Atividade moduladora do extrato aquoso da casca do caule de *Stryphnodendron rotudifolium* Mart. comciprofloxacino frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Em um estudo, obteve-se como resultado um crescimento do espectro de resistência do *S. aureus* frente às várias classes de antibióticos usados mundialmente, um exemplo a classe das quinolonas. Estes resultados preocupam a saúde mundial, pois este tipo de bactéria é bastante comum em casos de infecções hospitalares, o que agrava o tratamento de alguns pacientes (FILHO, 2000). O que mostra que em relação ao uso de antibióticos relacionado com o uso do produto natural, a gentamicina se mostrou mais efetivo, necessitando de concentrações menores para inibição do crescimento das duas cepas.

A resistência bacteriana em relação à ciprofloxacino, dá-se através de alterações na parede celular da bactéria e alterações no DNA bacteriano, além da produção de bombas que fazem o efluxo do medicamento, fazendo com que o mesmo não atinge o seu alvo farmacológico (SIILVEIRA et al, 2006).

Em um estudo de Ferreira et al. (2009) também constatou que o *S. adstringens* obteve atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus*, verificando uma sensibilidade da bactéria utilizando uma concentração inibitória mínima. Mostrando juntos com este trabalho, que o produto natural também apresenta sensibilidade frente a cepas de *E. coli* e *S. aureus* quando utilizado junto com o barbatimão.

Em estudo utilizando bactérias do gênero *Streptococcus sp.* e *Escherichia coli* foram observados que quando isoladas e tratadas com antibióticos dos tipos eritromicina, lincomicina, oxitetraciclina e a própria tetraciclina, observou-se que apenas 10% das cepas de bactérias foram sensíveis a estes tipos de fármacos, onde a *E. Coli* mostrou-se totalmente resistente à estes tipos de medicamentos, o que mostra uma resistência maior por parte da *E.*

coli. A técnica utilizada foi a de difusão de discos de antibióticos, bastante utilizada em testes de antibiograma (KIMPE et al, 2010).

O *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. é bastante utilizado com vários efeitos terapêuticos, como no tratamento de cancro duro, úlceras gástricas, tratamentos anti-inflamatórios, anti - diarréicos, anti - dematogênicas além de tratamento nos casos de algumas afecções vaginais e gonorreia (NOGUEIRA et al., 2008).

O barbatimão possui na sua estrutura taninos e outros constituintes químicos, como alcalóides flavonoides, terpenos, estilbenos, esteroides e inibidores de proteases, o que ajuda no desencadeamento da terapêutica antibacteriana inibindo principalmente cepas do grupo dos *Staphylococcus* (ABIFISA, 2010).

4 CONCLUSÃO

Foi observado que o uso do produto natural unido aos fármacos usados neste trabalho conseguiu reduzir a concentração inibitória mínima, causando a relação de sinergismo entre os dois produtos, mostrando que o barbatimão atuou de forma a potencializar a ação dos medicamentos, fazendo com que os dois desempenhassem as suas funções driblando os mecanismos de resistência bacteriana e causando um efeito terapêutico considerável.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, A. N.. **Associação Brasileira das Empresas do Setor de Fitoterápicos, Suplemento Alimentar e de Promoção a Saúde**(2012).
- ANVISA, A. N. Nota Técnica N.º 1/2013. **Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes** (2013).
- AUR, & D. **Barbatimão: Todos os benefícios e como usar**. Greenme(2019).
- BUCERRA, G., PLASCENCIA, A., LUÉVANOS, A., et al. **Mecanismos de resistencia a antimicrobianos en bacterias**. (2009).
- CALIXTO, J. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)**. Brazilian Journal and Biological Research (2000).
- CORDEIRO, A., LEITE, S., & DEZOTTI, M., **INATIVAÇÃO POR OXIDAÇÃO FOTOCATALÍTICA DE *Escherichia coli* e *Pseudomonas sp.*** Quimica nova (2004).
- FERREIRA, S. et al. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana in vitro do extrato hidroalcolico de *Stryphnodendrom adstringens* (Mart)** (2009).

FILHO, J. **Resistência bacteriana a antibióticos**. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde . (2000).

FIO, F.S.D., FILHO, T.R.M, GROPPPO, & F.C. **Resistência bacteriana**. Revista brasileira de medicina , V.57, 1129-1140. (2000).

JUNIOR, V., & PINTO, A. **Plantas medicinais**. Cura segura? (2008).

KIMPE, A., et al. **Prevalence of antimicrobial resistance among pigeon isolates of *Streptococcus gallolyticus* , *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium***. 31. (2010).

LOPES. et al. **Aumento da frequência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas**. (2000).

OLIVEIRA, A.C, S., & R.S. **Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão**. Revista eletrônica de enfermagem . (2008).

OLIVEIRA, D.R., et al . **Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*** (2011)..

S.DZIDIC., SUSKOVIC, J., & KOS., B. **Antiotic resistance Mechanisms in Bacteria**. *Biochemical and Genetic Aspects* . (2008).

SANTOS, A. e. ***Staphylococcus aureus***. visitando uma cepa de importancia hospitalar . (2007).

SILVEIRA, G. P., & et al. **Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana**. . (2006).

SILVEIRA, G.P., NOME, F., GESSER, J.C., et al. **Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana**. Departamento de bioquímica , 29. (2006).

SUSSUMANN, O. **Resistência bacteriana**. Hospital Universitario San Ignacio . (2001).