

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOÃO LUCAS GOMES COSTA

***Stryphnodendron adstringens*: ENSAIOS FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO**

PATOS DE MINAS – MG
DEZEMBRO DE 2018

JOÃO LUCAS GOMES COSTA

***Stryphnodendron adstringens*: ENSAIOS FITOQUÍMICOS E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Prof. Dra. Enyara Rezende Moraes

PATOS DE MINAS – MG

DEZEMBRO DE 2018

JOÃO LUCAS GOMES COSTA

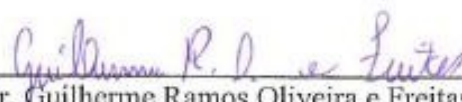
***Stryphnodendron adstringens*: ensaios fitoquímicos e atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico**

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia – Campus Patos de Minas como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

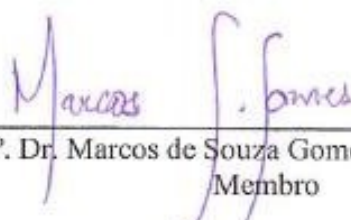
Banca examinadora:



Profª. Dra. Enyara Rezende Moraes - IBTEC – UFU
Presidente



Profª. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas- IBTEC – UFU
Membro



Profª. Dr. Marcos de Souza Gomes – IQUFU – UFU
Membro

Patos de Minas–MG, 3 de dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

A minha amada mãe, **Panda**, por prover sempre todo amor incondicional, por me incentivar aos estudos e pelas abdições e esforços que fez pela minha formação e conforto.

À **Família Mundim** e as minhas tias **Lourdes** e **Anésia** por todo recurso, carinho e assistência e por serem sempre receptivos e amorosos.

À minha estimada orientadora Dra. **Enyara Rezende**, por todo incentivo e oportunidade que me deu durante a graduação, pelos ensinamentos e conselhos que contribuíram para minha formação profissional e pessoal e por ser uma profissional inspiradora.

Aos Professores Dr. **Guilherme Ramos**, Dr. **Marcos de Souza**, Dra. **Terezinha Teixeira** e Dra. **Joyce Guerra** pelo suporte que possibilitaram a realização desse trabalho e por serem profissionais admiráveis e exemplares.

Aos técnicos de laboratório **Renan Guerra** e **Carla Lima** por serem tão prestativos e por toda assistência que foram necessárias para execução desse estudo.

Aos meus queridos companheiros de curso, de laboratório e de vida, em especial, **Gustavo, William, Willow, Leonardo, Isabella, Camila, Dayanne, Pedro Henrique e Thaís, Tamara** pela amizade e apoio, pelos conhecimentos compartilhados e pelos momentos agradáveis e felizes que me proporcionaram.

Aos meus amados irmãos **Ana Clara, Eduardo e Vitória** pelo companheirismo e fraternidade.

Aos meus amados amigos **Agnes, Caio, Larissa e Antônio** por estarem sempre ao meu lado desde o ensino médio, pela amizade e por todo apoio emocional e afetivo.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta e indireta para que eu concluísse essa importante etapa na minha vida.

RESUMO

As plantas medicinais são potenciais recurso para o desenvolvimento de novas drogas, uma vez que os produtos naturais vegetais apresentam ampla bioatividade, tornando-se assim meios terapêuticos alternativos frente ao problema da multirresistência de microrganismos aos antibióticos existente e tratamentos de doenças degenerativas propiciado por estresse oxidativo. O Cerrado detém uma vasta e diversa flora e muitas de suas espécies são utilizadas para fins medicinais, como por exemplo, a *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), popularmente empregada no tratamento e assepsia de lesões cutâneas e vaginais. No presente estudo, foi avaliado a atividade antimicrobiana, a capacidade antioxidante e determinado o teor de fenóis totais do extrato hidroalcoólico (EHA) de cascas caulinares e folhas da *S. adstringens*. Todos os EHAs mostraram efeitos contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, cujos valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) variam de 7,81 a 62,5 µg/mL, considerados significativamente ativos. No ensaio com DPPH, os extratos apresentaram alta atividade antioxidante, acima de 75% na concentração de 100 µg/mL. Usando o reagente fenólico Folin-Ciocalteu, observou-se que o conteúdo de fenóis totais dos EHAs foi mais alto na casca caulinar do que nas folhas. Diante disso, nota-se que os EHAs da casca caulinar, que apresentaram maiores valores para fenóis e maior atividade antioxidante, em 50 µg/mL, é também o que proporciona os menores valores para CIM, sugerindo-se assim que nessa parte existe maior disponibilidade de compostos com ação antimicrobiana e antioxidante. Esses resultados indicam a utilização de *S. adstringens* como antioxidante natural e, também, apontam seu uso como antimicrobiano. Para tanto, mais estudos são necessários para validar e provar que esta espécie possa ser utilizada para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Palavras-chave: Produtos naturais; Farmacognosia; Resistência à antibióticos; Antioxidantes naturais.

ABSTRACT

*The emergence of multi-drug resistant microorganisms for the available medicines are currently the main challenges for human health and thus promote studies aimed at finding new therapeutic agents. Medicinal plants become a potential source for the development of new medicines because the natural plant products have sufficient bioactivity. The Cerrado has a diverse flora and many of its species are used for medicinal purposes, such as *Stryphnodendron adstringens*, popularly used in the treatment and asepsis of cutaneous wounds. In the current study, the antimicrobial activity, the antioxidant capacity and the total phenol content of the hydroalcoholic extract (EHA) of the stem barks and leaves of *S. adstringens* were evaluated. All EHAs showed effects against Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*, whose Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) range from 7.81 to 62.5 µg / mL, considered to be significantly active. In the DPPH assay, the extracts showed high antioxidant activity, above 75% in the concentration of 100 µg / mL. Using the Folin-Ciocalteu phenolic reactant, it was observed that the total phenol content of the EHAs was higher in the stem barks than in the leaves. Therefore, it was observed that the EHAs of the stem barks, which presented higher values for phenols and greater antioxidant activity, at 50 µg / mL, also gives the lowest values for MIC, suggesting that in this part there is a greater availability of compounds with antimicrobial and antioxidant activity. These results indicate the use of *S. adstringens* as a natural antioxidant and also point to its use as an antimicrobial. Therefore, more studies are needed to validate and prove that this species can be used for the development of new therapeutic agents.*

Key words: Natural products; Pharmacognosy; Resistance to antibiotics; Natural antioxidants.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – micrograma
µL – microlitro
µm – micrômetro
°C – graus Celsius
AMC – amoxicilina com ácido clavulânico
AMP – ampicilina
ATB – antibiótico
ATCC – do inglês *American type culture collection*
ATM – aztreonam
AZT - azitromicina
CLSI – do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*
cm – centímetro
DIC – delineamento inteiramente casualizado
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EHA – extrato hidroalcoólico
EROs – espécies reativas de oxigênio
g – grama
IBTEC – Instituto de Biotecnologia
ICBIM – Instituto de Ciências Biomédicas
LB – Luria-Bertani
mg – miligrama
mgEAG – miligramas de equivalente de ácido gálico
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
MG – Minas Gerais
MHA – agar Mueller-Hinton
mL – mililitro
mm – milímetro
nm – nanômetro
Pa – pascal
PCA – agar de contagem padrão
TSA – agar triptona de soja
TSB – caldo triptona de soja
UFC – unidades formadoras de colônia
UFU – Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.	2
2.1	O uso medicinal das plantas do Cerrado	2
2.2	A bioatividade de compostos fenólicos.....	3
2.3	Atividade antioxidante em plantas do Cerrado	4
2.4	Atividade antimicrobiana em plantas do Cerrado	4
3	MATERIAL E MÉTODOS.	6
3.1	Obtenção do material vegetal.....	6
3.2	Preparação dos extratos hidroalcoólicos (EHAs) das amostras	7
3.3	Determinação do teor de compostos fenólicos totais em EHAs	7
3.4	Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH	8
3.5	Avaliação da atividade antimicrobiana dos EHAs	8
3.5.1	Microrganismos	8
3.5.2	Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar	9
3.5.3	Determinação da concentração inibitória mínima dos EHAs	9
3.6	Análises estatísticas.....	10
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
5	CONCLUSÃO	17
	REFERÊNCIAS	19

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a comunidade científica se depara com um dos mais problemáticos desafios a saúde humana, os microrganismos multiresistentes aos fármacos disponíveis. Nessa situação, relata-se que importantes patógenos humanos, principalmente bactérias e fungos, estão se tornando cada vez menos susceptíveis aos medicamentos existentes, tornando-se urgente os estudos para desenvolvimentos de novas estratégias terapêuticas.

Também, nos últimos anos, as áreas médicas têm sido impulsionadas a encontrar moléculas terapêuticas que combatam ou amenizem processos ligados às doenças degenerativas. Cientificamente, já se tem descrito que radicais livres e outros oxidantes estão envolvidos no desenvolvimento de doenças crônicas, uma vez que os efeitos tóxicos dessas moléculas promovem a danificação de componentes celulares. Sendo assim, biocompostos com atividade antioxidante são um dos principais alvos em trabalhos que propõem terapias para patologias degenerativas, pois esses compostos podem neutralizar os oxidantes, consequentemente, contêm-se sua ação degradante.

A utilização de vegetais para fins terapêuticos está presente desde os primórdios da humanidade, sendo muito presente nos registros populares. As plantas medicinais são fonte de compostos com variada atividade biológica, destacando-se aquelas com propriedades interessantes a indústria farmacêutica. Dessa forma, sabe-se que a célula vegetal é capaz de sintetizar metabólitos, como por exemplo, os compostos fenólicos que possuem atividade antimicrobiana e antioxidante, tornando-os potenciais alvos para a prototipagem e desenvolvimento de novas drogas.

O Cerrado brasileiro é detentor de uma grande e diversa flora, sendo uma das maiores do mundo. O uso popular evidência a aplicação das plantas desse bioma para diversos fins, tais como cosméticos, anti-inflamatório, antitérmicos, anti-hipertensivo, entre outros. Também, muitos trabalhos científicos corroboram com o saber popular, uma vez que neles são comprovados a atividade antimicrobiana e, também, antioxidante dos vegetais do Cerrado.

O *Stryphnodendron adstringens*, conhecida como Barbatimão, é uma planta advinda do Cerrado pertencente à família Fabaceae. Popularmente, a casca desse vegetal é usada como cicatrizante de ferimentos e já se tem descrito sua atividade antifúngica no patógeno *Candida albicans*. Sendo assim, o *S. adstringens* torna-se potencial candidato para testes de susceptibilidades em demais microrganismos patogênicos e caracterização fitoquímica.

Portanto, o presente estudo objetiva, quantificar o conteúdo de compostos fenólicos totais e avaliar a atividade e antimicrobiana antioxidante do extrato hidroalcoólico (EHA) da casca caulinar e folha do *Stryphnodendron adstringens*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O uso medicinal das plantas do Cerrado

O Cerrado abrange aproximadamente 22% do território nacional, apresentando-se como o segundo maior bioma brasileiro, sendo superado apenas pela Amazônia. O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo e parte dela tem o Cerrado como habitat. Essa vegetação possui a mais rica flora dentre as savanas do mundo, abrigando mais de 11.000 espécies vegetais, das quais 4.400 são endêmicas (MEDEIROS, 2011). Entretanto, essa vastidão encontra-se em risco, pois verifica-se que nessa área o avanço do crescimento populacional e atividades econômicas, principalmente a pecuária e agricultura, provocam degradação em níveis alarmantes e, conseqüentemente, coloca em perigo a existência da sua diversidade biológica (CUNHA, 2008).

Planta medicinal é a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2011). Assim sendo, o uso da flora do Cerrado para fins medicinais faz parte da cultura da comunidade local desse bioma. Nessa vegetação, muitas plantas são exploradas devido a sua ação curativa, como, por exemplo, o *Echinodorus grandiflorus* (chapéu-de-couro) usado contra problemas renais e para assepsias, e a *Gomphrena macrophala* (para-tudo-do-cerrado) utilizada para tratar febres e diarreia (OLIVEIRA, 2011).

O *S. adstringens* é uma planta medicinal do Cerrado e, anatomicamente, é uma árvore que possui de 2 a 8 metros; seu tronco tem de 20 a 30 cm de diâmetro, com caules e ramos tortuosos; apresenta folhas bipinadas, de 5 a 6 pares de folhas, e sua casca caulinar tem coloração avermelhada (GOULART, 2010; SOUZA-MOREIRA et al., 2018). A espécie *S. adstringens* se destaca no tratamento de feridas cutâneas e micoses vaginais. Como comprovado, as cascas do caule desse vegetal possuem altos teores do metabólito secundário tanino, um composto fenólico com propriedade cicatrizante e atividade micótica contra o fungo patogênico *Candida*

albicans, causador da infecção vulvovaginal candidíase (PASSARETI et al., 2016; HERNANDES et al., 2010; ISHIDA et al., 2006).,

2.2 A bioatividade de compostos fenólicos

Os metabólicos secundários são substâncias de produção restrita a certos organismos, mais presente em vegetais e microrganismo e, em menor quantidade, nos animais. Suas funções estão ligadas a sobrevivência do ser vivo, garantindo defesa a patógenos e adaptação ao meio ambiente. Comprova-se que os produtos secundários estão relacionados com efeito terapêutico para os seres humanos, por exemplo, os metabólitos secundários citotóxicos para patógenos microbianos vegetais podem ser úteis para o tratamento antimicrobiano em humanos. Essas moléculas podem ser divididas em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenos e componentes que contem nitrogênio (SIMÕES et al., 2007; VIZZOTTO et al., 2010).

Os compostos fenólicos são uma vasta classe química que se caracterizam como substâncias que apresentam no mínimo um anel aromático em que pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Nos vegetais, esses compostos conferem proteção a insetos, microrganismos e radiação ultravioleta (VIZZOTTO et al., 2010). Essas moléculas tornam-se interessantes recursos de aplicação biotecnológica, visto que suas atividades antimicrobiana e antioxidante podem ser úteis para o setor farmacêutico na formulação de fármacos e cosméticos (STEFANELLO et al., 2016).

Quanto a atividade biológica dos compostos fenólicos interessantes aos homens, destacam-se os flavonoides e taninos. Os flavonoides têm ação antifúngica e antibacteriana; ainda, essas substâncias são reconhecidas como antioxidantes naturais uma vez que podem estabilizar radicais livres ao doar elétrons para eles (MARKS et. al, 2007; SIMÕES et al., 2007). Já os taninos são polifenóis que possuem propriedade cicatrizante devido a sua capacidade de se complexar com as proteínas do tecido lesionado fazendo com que elas se precipitem formando uma camada protetora sobre a pele. É válido destacar que o *S. adstringens* é reconhecido cientificamente como um potente produtor desse metabólito (PASSARETI et al., 2016).

2.3 Atividade antioxidante em plantas do Cerrado

Os radicais livres são compostos altamente reativos com um ou mais elétrons não pareados, assim sendo, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são importantes representantes desse tipo molecular. Em condições normais, esses elementos são produzidos no organismo e requeridos em alguns processos celulares, como por exemplo, na ação bactericida dos macrófagos. Entretanto, a taxa de geração de EROs pode exceder a capacidade de nos protegermos delas, condição essa denominada de estresse oxidante, acarretando em danos aos componentes estruturais da célula (membrana plasmática, ácido nucleico, proteínas e lipídios). A danificação provocada por EROs propicia o desenvolvimento de cânceres, doenças neurodegenerativas, arterial e autoimunes. (BENDER, 2014; BAYNES; DOMINICZAK, 2010).

Por sua vez, os antioxidantes atuam inibindo e/ou reduzindo os efeitos dos radicais livres, pois esses compostos podem ser oxidados no lugar de componentes importantes para a célula, prevenindo assim o dano celular. Estudos mostram que compostos fenólicos de origem vegetal, tal como, o flavonoide age como antioxidantes, uma vez que essas moléculas podem neutralizar radicais livres e inibir enzimas que estão associadas a geração de EROs (BANJARNAHOR; ARTANTI, 2015)

Os compostos antioxidantes são de grande interesse para a indústria farmacêutica e alimentícia, dessa forma, muitas pesquisas são desenvolvidas a fim de prospectar essas substâncias em vegetais (VANDAMME; REVUELTA, 2016). Frente a isso, vários trabalhos pontuam que as plantas Cerrado são potenciais fontes de antioxidantes. A capacidade antioxidante desses vegetais está correlacionada positivamente aos teores de metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos presentes neles. Estudos comprovaram que plantas nativas do Cerrado, tais como, *Anacardium humile* (cajuzinho-do-cerrado), *Eugenia dysenterica* Dc.(cagaita) e *Hymenaea martiana* Hayne (jatobá), da família Fabacea, possuem significativa atividade antioxidante (ROCHA et al.,2013; ROCHA et al., 2018).

2.4 Atividade antimicrobiana em plantas do Cerrado

De modo geral, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno genético causado por genes do microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dessas drogas (NASCIMENTO; ARAÚJO, 2014). As infecções provocadas por bactérias resistentes aos antibióticos mata, a cada ano e em todo o mundo, cerca de 700.000 pessoas. Alguns especialistas preveem que esse número pode subir para 10 milhões até 2050 se

não forem feitos esforços para reduzir a resistência ou desenvolver novos antibióticos (WILLYARD, 2017).

As bactérias gram-positivas são notáveis agentes infecciosos, tais como, as espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, que apesar de pertencerem a microbiota normal dos seres humanos, se apresentam como um dos principais patógenos humanos. As infecções causadas por esses microrganismos são preocupantes e frequentes no meio nosocomial. O *S. aureus* está associado a uma série de infecções invasivas e toxicogênicas, principalmente aqueles que são resistentes à meticilina, denominado de MRSA (*Methicillin resistant Staphylococcus aureus*), sendo ele o agente de bacteremias, osteomielites, pneumonias e endocardites (TONG et al., 2015). Sobre o *S. epidermidis*, tem-se que em torno de 75% das cepas dessa espécie são resistentes à nafcilina (BROOKS et al., 2014). As enfermidades provocadas por esse bactéria oportunista estão ligadas ao uso de cateteres e próteses, dessa forma, esse microrganismo pode causar, por exemplo, endocardites, septicemias, meningites, artrites e infecções no trato urinário (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

De acordo com Brasil (2007), os bacilos gram-negativos são o principal problema em UTIs brasileiras, devido às altas taxas de resistência de antimicrobianos de última geração disponíveis. Dessa morfologia, o bacilo *Pseudomonas aeruginosa* e a enterobactéria *Escherichia coli* destacam-se como importantes patógenos humanos. A *P. aeruginosa* pode estar envolvida em infecções cutâneas, pulmonares, oculares e auriculares. Já, a *E. coli* é causadora oportunista, principalmente, de infecções gastrointestinais, mas também podem infeccionar o trato urinário e provocar a meningite neonatal (MURRAY et al., 2009). As cepas dessas espécies resistentes aos antibióticos carbapenêmicos são listadas como uma das mais letais ao homem, representando uma ameaça significativa à saúde pública (WHO, 2017).

A bioprospecção de agentes antimicrobianos em plantas medicinais é uma alternativa promissora frente ao problema da multirresistência aos antibióticos em microrganismos patogênicos. Dessa forma, os extratos de plantas de uso medicinal apresentam resultados significativos em ensaios de inibição do crescimento vários patógenos, principalmente, em fungos e bactérias. Esse fato pode ser atribuído aos metabólitos secundários que esses vegetais produzem que possuem atividade antimicrobiana (DUARTE, 2006). Há trabalhos que evidenciam que plantas medicinais do Cerrado possui essa característica de interesse farmacêutico, tendo como exemplo, a espécie *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta), da família Fabaceae, que inibiu o crescimento de *S. aureus*; a *Bowdichia virgilioides* (sucupira-do-cerrado) que se efetivou como um inibidor de fungos do gênero *Candida* e a

Myracrodruon urundeuva (aroeira) que mostrou-se efetiva contra cepas de *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* e *E. coli* (GONÇALVES et al., 2005; SILVA JR et al., 2009; ARÁUJO et al., 2017).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Quantificar fenóis totais e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana nos extratos hidroalcoólicos (EHAs) da casca do caule e folhas de *S. adstringens*.

Objetivos específicos

- Coletar a casca e folhas de *S. adstringens*;
- Obter o EHAs da casca e folhas da espécie em estudo;
- Avaliar entre rotoevaporação e aquecimento em manta qual o melhor processo para retirada de solvente dos EHAs;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais presentes nos EHAs;
- Avaliar a atividade antioxidante dos EHAs;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos EHAs contra os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As amostras de folhas e casca caulinar de *S. adstringens* foram coletados no bioma Cerrado de fitofisionomia campo sujo, zona rural município de Patos de Minas (18°40'57.4 S e 46°28'27.2 W) no dia 5 de dezembro de 2017. A planta foi identificada baseada em suas características morfológicas pela Profa. Dra. Terezinha Aparecida Teixeira, Engenheira Agrônoma e docente do Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Federal de

Uberlândia (UFU) - Campus Patos de Minas. Após a coleta, os órgãos foram levados para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFU - Campus Patos de Minas, onde foram devidamente higienizadas em água corrente e, posteriormente, colocadas no ultrafreezer a -80°C por 24 horas. Passado esse tempo, as amostras seguiram para o liofilizador (marca: Liotop, modelo: L101) e após 48 horas os órgãos liofilizados foram triturados no moinho de facas (marca: Fortinox, modelo: Willye Star FT 50) para obtenção do pó que foi utilizado para a preparação dos extratos hidroalcoólicos.

3.2 Preparação dos extratos hidroalcoólicos (EHAs) das amostras

Os EHAs foram obtidos seguindo a metodologia de Pinho (2012) com adaptações. Separadamente, pesou-se 20 g dos pós de cada órgão que posteriormente foram misturados com 200 mL de etanol 50% em frasco âmbar, após isso, foram incubadas em banho-maria a 60 °C por 1 hora. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel filtro com o auxílio de uma bomba a vácuo, a 200 pascal (Pa). Para fins de comparação metodológicas quanto a retirada do solvente dos extratos, as amostras foram divididas em EHA1 (extrato hidroalcoólico da casca caulinar de *S. adstringens* rotoevaporado), EHA2 (extrato hidroalcoólico da casca caulinar de *S. adstringens* aquecido em manta aquecedora), EHA3 (extrato hidroalcoólico da folha de *S. adstringens* rotoevaporado), EHA4 (extrato hidroalcoólico da folha de *S. adstringens* aquecido em manta). Dessa forma, as amostras que foram rotoevaporadas passaram em um rotoevaporador (marca: Fisatom, modelo: 802), aquecido a 45 °C, sob pressão de 500 Pa. Já as amostras que foram submetidas ao aquecimento em manta foram postas no equipamento a 40 °C, por 30 minutos. Por fim, uma vez retirado o solvente das amostras, a porção aquosa restante seguiu para ultrafreezer a -80 °C por 24 horas. Passado esse tempo, as amostras foram para um liofilizador por 48 h. Após a liofilização, obtivemos uma porção residual de aspecto farináceo, esse seguiu para ser utilizado nos métodos de avaliação de atividade antimicrobiana e antioxidante e dosagem de fenóis totais.

3.3 Determinação do teor dos compostos fenólicos totais em EHAs

O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Reagiu-se 0,5 mL das

diferentes concentrações dos EHAs concentrados a 100 µg/mL com 2,5 mL de 0,2 mol L⁻¹ do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente, 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L⁻¹) foram adicionados à mistura reacional. As leituras de absorbância foram realizadas a 760 nm após incubação à temperatura ambiente durante 1 h. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão de referência (16,125; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/ mL). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de EHA. Todos os testes foram realizados em triplicata.

3.4 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia de Lopes-Lutz e colaboradores (2008), seguidas de pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 µg mL⁻¹. Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada concentração dos extratos (100; 50; 25 e 12,5 µg mL⁻¹). Em paralelo, o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Após 60 minutos, as leituras de absorbância foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte equação:

Equação 1: Porcentagem de atividade antioxidante. Legenda: (AA%) atividade antioxidante; (A^{CN}) absorbância do DPPH com o etanol; (A^{AM}) absorbância do DPPH com a amostra; (100) fator de conversão para porcentagem.

$$AA\% = \frac{A^{CN} - A^{AM}}{A^{CN}} \times 100$$

3.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos EHAs

3.5.1 Microrganismos

As cepas bacterianas utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana dos EHAs foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (cepa isolada de um paciente com infecção de corrente sanguínea identificada pelo método automatizado Vitek II no HC-UFU), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). As cepas foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Rosineide Ribas, coordenadora do Laboratório de Microbiologia Molecular, do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), UFU. A princípio, as bactérias estavam estocadas a -20°C em Caldo Triptona de Soja (TSB) acrescido de glicerol a 20%.

Separadamente, as bactérias foram reativadas utilizando uma alça de platina para inoculação em tubos com 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB). Após 24 horas de incubação a 37°C, os microrganismos foram semeados em placas de petri contendo meio agar Triptona de Soja (TSA), e em seguida, novamente, incubados por 24 horas a 37°C. É válido ressaltar que apenas a cepa de *S. epidermidis* foi incubada por 48 h devido essa apresentar dificuldade em formar colônias. Após esse tempo, a fim de assegurar que não houve contaminação nos cultivos, as colônias crescidas de cada espécie bacteriana foram submetidas ao teste de coloração de Gram (BRASIL, 2011) para avaliação das características morfotinturiais. Ainda, a cepa de *S. aureus* foi cultivada no meio seletivo agar manitol salgado, dando assim mais uma garantia que estávamos realmente trabalhando com essa referida espécie patogênica.

3.5.2 Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar

A fim de determinar a atividade antibacteriana dos EHAs de *S. adstringens* foi realizado o método de difusão em ágar de acordo com a metodologia descrita pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2018). Dessa forma, as bactérias foram reativadas em meio PCA, incubadas por no máximo 48h, e em seguida preparadas suspensões contendo 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL dos microrganismos em solução salina a 0,8%, ajustadas de acordo com o padrão de 0,5 da escala de MacFarland. Com o auxílio de um *swab*, as suspensões bacterianas foram semeadas homogeneamente em ágar Mueller–Hinton (MHA). Após 5 minutos, foram adicionados, em triplicata e, em posições equidistantes, discos de papel filtro de 6 milímetros (mm) de diâmetro, impregnados com os EHAs na concentração 500 µg/mL. Como controle negativo, foram testados discos impregnados em água destilada estéril. Como controle positivo, foram utilizados os antibióticos: amoxicilina + ácido clavulânico (AMC 30 µg) para *S. aureus*; azitromicina (AZT 15 µg) para *S. epidermidis*; aztreonam (ATM

30 µg) para *P. aeruginosa* e ampicilina (AMP 10 µg) para *E. coli*. Após a adição dos discos, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e, posteriormente, medidos os halos de inibição em mm. Halos maiores ou iguais a 7 mm foram considerados como resultados positivos.

3.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima dos EHAs

A determinação da concentração inibitória dos EHAs foi feita de acordo a metodologia descrita por CLSI (2018) com adaptações. Assim sendo, somente os EHAs que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de difusão em Agar seguiram para esse ensaio. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) baseou-se no método de microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços de fundo chato. Os extratos dos diferentes órgãos foram diluídos em água destilada estéril a uma concentração de 500 µg/mL. 100 µL do caldo Luria-Bertani (LB) foi previamente adicionado em todos os poços que foram utilizados da placa. Em seguida, 100 µL dessa mistura (extrato a 500 µg/mL + caldo LB) presente no primeiro poço foi transferido para o segundo poço da placa, atingindo-se então a concentração de 250 µg/mL. A partir daí, foram realizadas diluições seriadas dos extratos até a concentração de 3,91 µg/mL. Dessa forma, na primeira coluna de cavidades, os compostos se encontravam na maior concentração (500 µg/mL) e na oitava coluna na menor concentração (3,91 µg/mL).

O inóculo bacteriano consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em solução salina, com turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC/mL). Assim, 10 µL dessa solução foram inoculadas em cada poço da placa contendo as diluições sucessivas dos extratos em meio de cultura LB. As culturas foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Posteriormente, para avaliar a viabilidade celular das bactérias foram adicionados 10 µL de MTT em cada poço, e em seguida a placa foi incubada novamente por 4 h. O MTT é um sal de tetrazolium, cuja coloração inicial é amarela. No entanto, em células viáveis, as enzimas mitocondriais reduzem esse sal a formazan que apresenta coloração azul, logo, indicando o crescimento bacteriano. Portanto, a menor concentração dos EHAs em que não houve crescimento (amarelo) foi considerada a CIM do extrato.

No experimento foi utilizado meio LB + cloranfenicol (10 µg/mL) + inóculo bacteriano como controle positivo; meio LB + inóculo bacteriano como controle negativo e o meio de cultura sem inóculo bacteriano como controle de esterilidade. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6 Análises estatísticas

Para a avaliação dos dados do teste antioxidante (DPPH) os experimentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (3 x 4), sendo 3 extratos em 4 diferentes concentrações (100; 50; 25 e 12,5 µg/mL), com 3 repetições. Já para o teor de compostos fenólicos totais, o experimento também foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) para 4 tipos de extratos com 3 repetições. O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem antioxidante em relação às concentrações analisadas. Já para a avaliação do teor de compostos fenólicos equivalente ao ácido gálico os resultados foram plotados em gráficos de barras e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg EAG) por grama de extrato. O software empregado foi o GraphPad Prism versão 5.01.

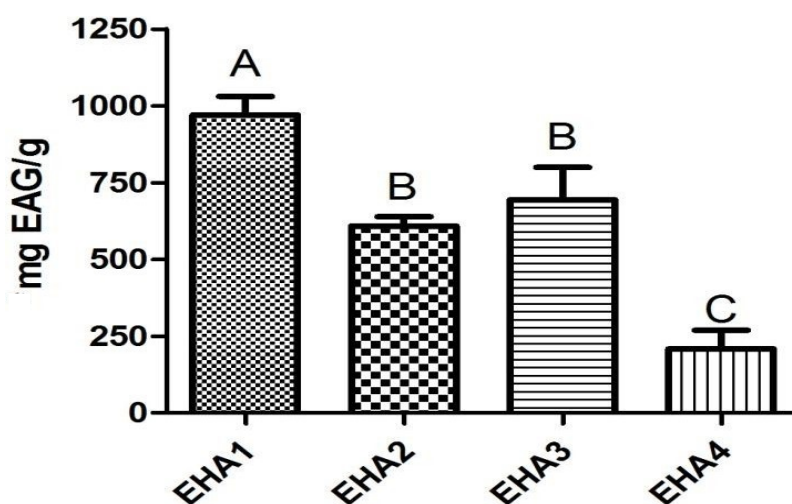
A correlação (r) existente entre os valores de teor de fenóis totais e atividade antioxidante dos EHAs, na concentração de 100 µg/mL, foi calculada utilizando o software Microsoft Excel, no qual os dados foram submetidos a função CORREL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A planta medicinal *S. adstringens* é um destaque no bioma Cerrado devido a ampla biotiividade que possui. Popularmente, esse vegetal é explorado como cicatrizante, antisséptico e anti-inflamatório, sendo usado, sobretudo, em casos de lesões cutâneas. As propriedades terapêuticas desse vegetal estão correlacionadas com metabólitos secundários presentes nele, principalmente, aos taninos (GOULART, 2010; PASSARETTI et al., 2016). Visto isso, o *S. adstringens* torna-se um potencial candidato para estudos que comprovem suas atividades biológicas e identifiquem e caracterizem os produtos naturais presentes nele. No presente estudo, os extratos hidroalcoólicos obtido a partir da casca caulinar e folhas de *S. adstringens* foram submetidos à determinação de fenóis totais, avaliação da atividade antioxidante e testes de susceptibilidade contra microrganismos.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de um amplo espectro de atividade biológica, tais como, ação antimicrobiana e antioxidante, sendo assim, torna-se importante dosá-los nesse estudo. A dosagem de fenóis totais nos extratos, feita por meio do reagente Folin-Ciocalteu, expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g), mostrou que os extratos EHA1, EHA2, EHA3 e EHA4 apresentam 970,4; 608,7; 693,8; 208,7 mg EAG/g de EHA, respectivamente (**Figura 1**).

Figura 1. Dosagem de fenóis totais nos extratos em estudo por meio do reagente Folin-Ciocalteu. O ensaio realizado permitiu o cálculo dos valores das médias dos teores de compostos fenólicos totais nos EHAs de *S. adstringens*. Médias seguidas pela mesma letra, não diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. EHA1: extrato hidroalcoólico da casca caulinar rotoevaporado; EHA2: extrato hidroalcoólico da casca caulinar aquecido em manta; EHA3: extrato hidroalcoólico da folha rotoevaporado; EHA4: extrato hidroalcoólico da folha aquecido em manta.



Observa-se, que entre os órgãos de *S. adstringens* utilizados no estudo, as cascas caulinares, em detrimento das folhas, foram as que apresentaram maiores dosagens de fenóis totais, indicando que nessa parte encontra-se mais desse composto. Ainda, é notável que as amostras que foram submetidas ao aquecimento em manta são aquelas que possuem menores teores de fenóis totais, reduzidos quase pela metade quando comparados as amostras que passaram pelo rotaevaporador. Esse fato pode ser explicado devido ao maior contato que essas amostras tiveram com a fonte de calor na manta, uma vez que os compostos fenólicos são termossensíveis e métodos de extração sob altas temperaturas podem degradar esses metabólitos (CVETANOVIĆ et al., 2017). Ressalta-se ainda que a manta é um equipamento

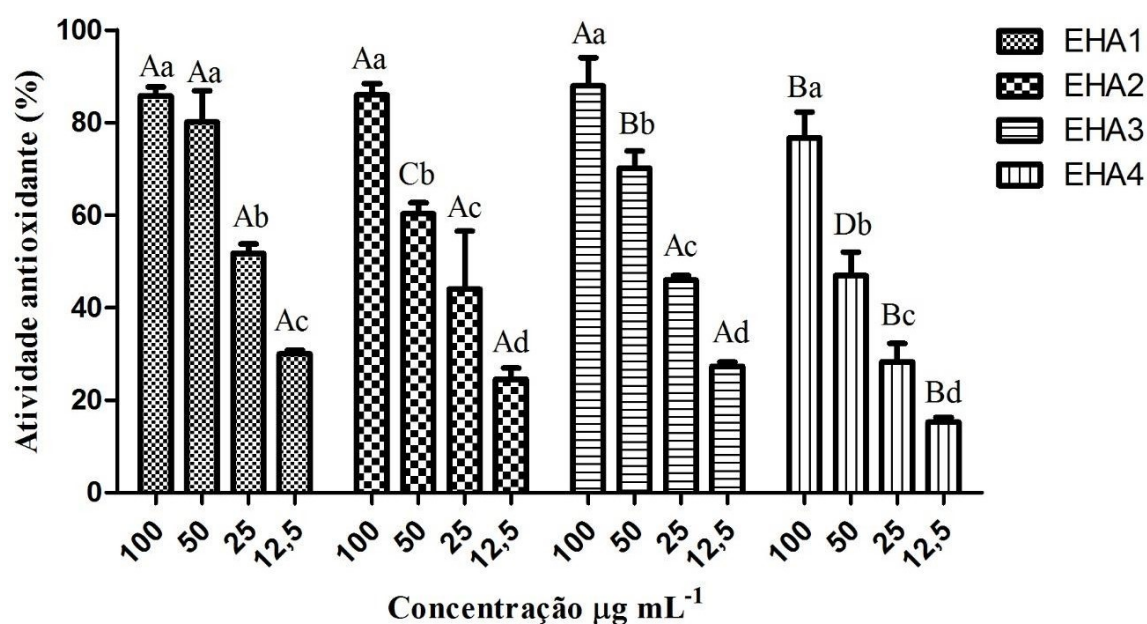
mais instável quanto ao controle de temperatura e rústico quando comparado ao rotoevaporador, isso pode ter influenciado na deterioração dos metabólitos presentes nas amostras.

Até o presente momento, não há trabalhos registrados que mensurem fenóis totais em extrato hidroalcoólico das cascas e folhas de *S. adstringens*. Entretanto, há pesquisas utilizando diferentes solventes que determinam fenóis totais nas cascas desse vegetal para finalidades diferentes desse estudo. Para exemplo disso, Baldivia e colaboradores (2018), tendo como objetivo principal avaliar atividade anticancerígena da casca do Barbatimão em linhagem celular de melanoma, mostrou que o extrato aquoso da casca de barbatimão (SAAE) na concentração de 200 µg/mL, utilizando o reagente Folin–Ciocalteu, apresentou significativa dosagem de fenóis totais, 195,16 mg EAG/g de SAAE. Sendo assim, embora utilizando solventes e concentrações de extrato diferentes, os valores de fenóis totais mantêm-se expressivos, evidenciando-se que a casca caulinar do Barbatimão é um destacável fornecedor de compostos fenólicos.

Os antioxidantes são moléculas capazes de conter a degradação de produtos e componentes pelos radicais livres. Devido a essa propriedade, esses compostos são requeridos tanto pelo setor farmacêutico quanto pelo alimentício. Os efeitos tóxicos de antioxidantes sintéticos têm movido estudos para a prospecção de antioxidantes naturais (ROCHA, 2011), como feito nesse trabalho.

O ensaio de atividade antioxidante dos extratos avaliada pelo método do sequestro dos radicais livres DPPH também apresentou resultados expressivos como observados na **Figura 2**. Na concentração de 100 µg/mL, todos os extratos apresentaram atividade antioxidante acima de 75%. O contrário ocorre em 12,5 µg/mL no qual se têm as menores medições, % AA abaixo 30%. Portanto, observa-se uma relação crescente entre a concentração dos EHAs e a atividade antioxidante, ou seja, quanto maior a concentração do extrato, maiores são as medições para %AA. De modo geral, observa-se que entre os extratos há uma equivalência, pelo teste de Scott-Knott, de valores para atividade antioxidante, com exceção da concentração de 50 µg/mL, na qual a casca (EHA1) se destaca moderadamente da folha (EHA3).

Figura 2. Atividade antioxidante dos extratos de *S. adstringens* em estudo pelo método de DPPH. O ensaio realizado permitiu o cálculo da porcentagem (%) da atividade antioxidante em relação às concentrações analisadas. As médias seguidas por diferentes letras (A, B, C e D), diferem significativamente a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott, as maiúsculas para comparar a concentração entre os extratos e as minúsculas para comparar a concentração dentro de cada extrato EHA1: extrato hidroalcoólico da casca caulinar rotaevaporado; EHA2: extrato hidroalcoólico da casca caulinar aquecido em manta; EHA3: extrato hidroalcoólico da folha rotaevaporado; EHA4: extrato hidroalcoólico da folha aquecido em manta.



Na concentração de 50 µg/mL, verificou-se que as amostras que foram submetidas a rotoevaporação apresentaram maiores valores para % de atividade antioxidante quando comparadas àquelas aquecidas na manta. Essa diferença pode ser explicada devido ao processo de retirada do solvente por aquecimento em manta ser mais deteriorante, que resulta na perda de metabólitos que por sua vez teriam capacidade antioxidante. Também, dentre todos os extratos, observa-se que o EHA1 mostra-se com as melhores %AA, em contra partida, vê-se que EHA4 apresenta as menores, indicando-se assim que há maior preservação dessas moléculas se utilizado o rotoevaporador para remoção do solvente e que a casca caulinar do *S. adstringens* fornece mais compostos antioxidantes do que suas folhas.

Ademais, o IC₅₀ de atividade antioxidante para EHA1, EHA2, EHA3 e EHA4 foram, respectivamente, 24,1; 41,2; 29,2; 58,8. Observa-se que as amostras que foram rotaevaporadas necessitam de menor concentração de extrato para se atingir 50% de capacidade antioxidante. Também, para esse dado, nota-se que as EHAs da casca caulinar se destacam, mais uma vez, dos EHA das folhas. Portanto, reforça-se que a casca caulinar possui maior presença de composto com ação antioxidante do que a folha. Congruente aos objetivos desse trabalho, Sabino e colaboradores (2018), utilizando a folha de *S. adstringens* como objeto de estudo, constatou que é necessária uma baixa concentração do extrato acetônico desse órgão (6,70 µg/mL) para atingir 50% de inibição do radical DPPH (IC₅₀). No presente estudo, para se obter 50% de atividade antioxidante, necessita de aproximadamente 42 µg/mL de extrato hidroalcolico das folhas.

Outra constatação notável nos resultados obtidos é a correlação positiva de $r = 0,82$ entre as dosagens de fenóis totais e capacidade antioxidante, dessa forma, a atividade antioxidante é maior nos extratos em que a quantidade de fenóis totais dosados também é maior. Essa mesma correlação também foi observada no estudo de Sousa e colaboradores (2007), no qual avaliou-se a capacidade antioxidante e fenóis totais do extrato etanólico das plantas medicinais do Cerrado *Terminalia brasiliensis*, *Copernicia cerifera* e *Cenostigma macrophyllum*, sendo essa última espécie pertencente à família Fabaceae, assim como a *S. adstringens*. Sugerindo assim, que as plantas medicinais do Cerrado são interessantes meios para se obter novos compostos terapêuticos que visem conter a ação de oxidantes em processos patológicos e que precisam ser investigadas a fundo.

O surgimento de microrganismo multirresistentes frente aos antibióticos disponíveis no mercado tornou-se um grave problema de saúde pública, consequentemente, as pesquisas que propõe descoberta de novos antimicrobianos são urgentes. No presente trabalho, primeiramente, a atividade antibacteriana dos EHAs foi testada pelo método qualitativo de difusão em ágar contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* e contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana dos extratos de *S. adstringens* em estudo pelo método de difusão em ágar. Tamanho dos halos de inibição dos microrganismos (mm) frente aos EHAs de *S. adstringens*. *: cepa *S. epidermidis* isolada de um paciente com infecção de corrente sanguínea identificada pelo método automatizado Vitek II. EHA1: extrato hidroalcoólico da casca caulinar rotoevaporado; EHA2: extrato hidroalcoólico da casca caulinar aquecido em manta; EHA3: extrato hidroalcoólico da folha rotoevaporado; EHA4: extrato hidroalcoólico da folha de aquecido em manta. Antimicrobianos para controles positivos, AMC: amoxicilina + ácido clavulânico; ATM: aztreonam; AZT: azitromicina). Controle negativo, H₂O destilada estéril. S/A: sem atividade antimicrobiana. N/T: não testado. Os resultados do teste de difusão em ágar são apresentados em mm, como a média de três experimentos e o desvio padrão (valores entre parênteses).

Composto	Concentração / Quantidade	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. epidermidis</i> *	<i>P. aeruginosas</i> (ATCC 27853)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
EHA 1	500 µg/mL	22,7 (±1,5)	26,7 (±1,5)	S/A	S/A
EHA 2	500 µg/mL	23,7 (±2,1)	26,3 (±1,5)	S/A	S/A
EHA 3	500 µg/mL	21,0 (±2)	25,0 (±1)	S/A	S/A
EHA 4	500 µg/mL	19,0 (±1,5)	22,6 (±2)	S/A	S/A
AMC	30 mg/mL	21,6 (±2)	N/T	N/T	N/T
AZT	15 µg	N/T	49,6 (±1)	N/T	N/T
ATM	30 µg	N/T	N/T	22,0 (±1,5)	N/T
AMP	10 µg	N/T	N/T	N/T	19,1 (±1,5)
H ₂ O destilada estéril	10µL	S/A	S/A	S/A	S/A

Verificou-se que todos os extratos na concentração de 500 µg/mL inibiram o crescimento apenas das bactérias Gram-positivas. Possivelmente, essa constatação se deve a diferença morfológica entre as Gram-positivas e negativas. Enquanto a primeira tem a parede

celular mais simples formada basicamente por peptidoglicano (cerca de 75%), as gram-negativas são mais complexas, pois possuem uma membrana externa, uma fina camada de peptídeoglicano e o espaço periplasmático. A membrana externa confere a bactéria uma barreira hidrofóbica, o que dificulta a penetração de substâncias (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Também, por se tratar de um extrato bruto, provavelmente, algum composto que teria atividade antimicrobiana em Gram-negativas pode ter sido inibido por estar misturado com tantos outros. Ou ainda, durante o processo de retirada do solvente pode-se ter perdido determinado metabólito que agiria sobre as bactérias desse tipo.

Anteriormente, Pinho e colaboradores (2012), no seu trabalho com plantas do Cerrado, também verificaram, pelo método de difusão em ágar, que o extrato hidroalcoólico a 300 µg/mL das folhas de *S. adstringens* é capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, nesse caso, os halos de inibição foram de 10 mm. No presente estudo, os halos de inibição dos extratos foliares na concentração de 500 µg/mL de *S. adstringens* foram de > 20 mm. Esse dado reforça que a folha do *S. adstringens* possui propriedades antimicrobianas. Também, ressalta-se que espécie *E. coli* não foi sensível aos extratos uma vez que não houveram halos de inibição mensuráveis contra essa espécie.

Os extratos que mostraram atividade inibitória nas bactérias Gram-positivas no método qualitativo de difusão em disco seguiram para ensaio quantitativo de Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição (**Tabela 2**).

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos hidroalcoólicos de (EHAs) de *S. adstringens*.

*: cepa de *S. epidermidis* isolada de um paciente com infecção de corrente sanguínea identificada pelo método automatizado Vitek II. C+:controle positivo.

Extratos	CIM (µg/mL)	
	Microrganismos	
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>S. epidermidis</i> *
EHA 1	31,25 µg/mL	7,81 µg/mL
EHA 2	31,25 µg/mL	7,81 µg/mL
EHA 3	62,5 µg/mL	15,6 µg/mL
EHA 4	62,5 µg/mL	15,6 µg/mL
Cloranfenicol (C+)	10 µg/mL	10 µg/mL

Os resultados apresentados nessa técnica reafirmam que os extratos da casca são melhores inibidores quando comparados aos extratos das folhas. Também, novamente, reforça-se que o *S. epidermidis*, em relação ao *S. aureus*, é mais sensível aos EHAs.

De acordo com Nayim (2018), um extrato de planta é muito ativo se tem um CIM < 100 µg/mL; significativamente ativo se $100 \leq \text{CIM} < 512$ µg/mL; moderadamente ativo quando 512

$< \text{CIM} \leq 2048 \mu\text{g/mL}$ e fracamente ativo para uma $\text{CIM} > 2048 \mu\text{g/mL}$. Portanto, baseando-se nessa escala, todos os EHAs desse estudo são considerados muito ativos, uma vez que apresentaram $\text{CIM} < 100 \mu\text{g/mL}$.

É importante destacar que o método de retirada do solvente por rotaevaporação ou por aquecimento em manta não interferiram nos resultados dessa técnica, uma vez que as CIMs se mostraram iguais entre os EHAs de folha e casca.

Em estudo anterior, Hasenack e colaboradores (2008), atestaram que o extrato alcoólico da casca de *S. adstringens* tem atividade antimicrobiana contra *S. aureus* isoladas de feridas crônicas de pacientes ambulatoriais, com CIM de 12,5 mg/mL, determinada pela técnica de macrodiluição em caldo. De modo semelhante, Souza e colaboradores (2006) verificaram que o extrato seco da casca de *S. adstringens*, obtido por percolação utilizando-se etanol 50%, apresenta CIM de 75 mg/mL tanto para *S. aureus* quanto para *S. epidermidis*. Sendo assim, apesar de utilizarem diferentes técnicas para extração e determinação de CIM, os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para corroborar que a casca caulinar de Barbatimão possui expressiva atividade antimicrobiana.

Nota-se nesse trabalho que os menores valores para CIM estão presentes nos extratos das cascas caulinares (EHA1 e EHA), que por sua vez foram as amostras que apresentaram maior dosagem de fenóis totais e melhores % para atividade antioxidante, dessa forma, sugere-se que há maior presença e disponibilidade de metabólitos que agem como antimicrobiano e antioxidante na casca caulinar do que na folha do *S. adstringens*.

5 CONCLUSÃO

- O estudo constata que a casca caulinar do *S. adstringens* se destaca em todos os testes que foram realizados, sendo esse órgão o que apresentou maior teor de fenóis totais e melhores valores para atividade antioxidante e antimicrobiana.
- As amostras que foram submetidas a rotaevaporação para retirada do solvente são as que possuem os melhores resultados para fenóis totais e atividade antioxidante. Sendo, portanto, o método mais confiável do que o aquecimento em manta.

- Os EHAs apresentaram atividade antimicrobiana apenas contra as bactérias gram-positiva: *S. aureus* e *S. epidermidis*. Os valores de CIM para todos os EHAs possuem forte atividade microbiana, visto que as concentrações foram menores do que 100 µg/mL.

- Científica e popularmente, em relação a suas propriedades fitoquímicas e atividade biológica, a folha do Barbatimão é pouco explorada em comparação a casca caular, logo os dados apresentados nesse trabalho sobre esse órgão podem contribuir para estudos posteriores, uma vez que evidenciou-se que a folha, não tanto quanto a casca, também é uma notável fonte de fenóis, apresenta interessante atividade antioxidante e expressiva atividade antimicrobiana.

- Os resultados encontrados nesse trabalho indicam a utilização de *S. adstringens* como antioxidante natural e, também, apontam seu uso como antimicrobiano. Para tanto, mais estudos são necessários para validar e provar que esta espécie possa ser utilizada para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, Í. D. et al. Chemical composition and evaluation of the antibacterial and Cytotoxic activities of the essential oil from the leaves of *Myracrodruon urundeuva*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, dez. 2017.
- BALDIVIA, D. et al. Evaluation of In Vitro Antioxidant and Anticancer Properties of the Aqueous Extract from the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens*. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 2432, 2018.
- BANJARNAHOR, S. D. S.; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, [s. l.], p. 239, 2015.
- BAYNES, J.W; DOMINICZAK, M.H. **Bioquímica Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- BENDER, A. D. et al. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 29 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Investigação e controle de bactérias multirresistentes**. Brasília: Anvisa, 2007.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011.
- BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Padrões de desempenho para testes de suscetibilidade ao disco antimicrobiano; Padrão Aprovado – 28ª edição. **NCCLS**. Wayne, Pensilvânia, 2018.
- CVETANOVIĆ, A. et al. Isolation of apigenin from subcritical water extracts: Optimization of the process. **The Journal of Supercritical Fluids**, [s. l.], v. 120, p. 32–42, 2017.
- CUNHA, N.; LIMA, J.; GOMES, M.; et al. A intensidade da exploração agropecuária como indicador da degradação ambiental na região dos Cerrados, Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, n. 2, p. 291–323, 2008.
- DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, n.7, 2006.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES, A. F.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GOULART, S. **Características anatômicas, químicas e densidade do barbatimão**. 2010. 131 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência e Tecnologia da Madeira, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

HASENACK, B. S. et al. Atividade Antibacteriana do Extrato Barbatimão sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* Isoladas de Secreções de Feridas Crônicas de Pacientes Ambulatoriais., **Ciênc. Biol. Saúde**, Londrina, v. 10, n. 1, p. 13-18, abr. 2008.

HERNANDES, L. et al. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 431–436, 2010.

ISHIDA, K.; DE MELLO, J. C. P.; CORTEZ, D. A. G.; et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 942–949, 2006.

MEDEIROS, J. D. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: MMA/SBF, 2011.

MURRAY, P.R. et al. **Microbiologia Médica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NASCIMENTO, E. D.; ARAÚJO, M. F. F. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquatic environments in Brazil: a systematic review. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, [s. l.], v. 9, n. 2, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1980-993X2014000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 4 dez. 2018.

NAYIM, P. et al. Antibacterial and Antibiotic-Potentiating Activities of Thirteen Cameroonian Edible Plants against Gram-Negative Resistant Phenotypes. **The Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2018, p. 1–14, 2018.

PASSARETTI, T.; GUARNIERI, A.; FILIPINI, R.; et al. Eficácia do uso do Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) no processo de cicatrização em lesões: uma revisão de literatura. **ABCS Health Sciences**, v. 41, n. 1, 2016.

PINHO, de L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi, **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326–331, 2012.

OLIVEIRA, H. C. **Cerrado e Plantas Medicinais: Algumas Reflexões sobre o Uso e a Conservação**. 2011. 30 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Naturais, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

ROCHA, L. S. et al. Data on elemental composition of the medicinal plant *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá). **Data in Brief**, [s. l.], v. 19, p. 959–964, 2018.

ROCHA, M. S. et al. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado Piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 933–941, 2013.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA D. B.; et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

SABINO, A. P. L. et al. *Stryphnodendron adstringens* (“Barbatimão”) Leaf Fraction: Chemical Characterization, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Towards Human Breast Cancer Cell Lines. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 184, n. 4, p. 1375–1389, 2018.

SILVA JR, I.F. et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, p. 242-248, Jan./Mar. 2009.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFSC, 2007.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA, M. T. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 17(1): 71-75, jan./mar. 2007

SOUZA-MOREIRA, T.; QUEIROZ-FERNANDES, G.; PIETRO, R. *Stryphnodendron* Species Known as “Barbatimão”: A Comprehensive Report. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 910, 2018.

STEFANELLO, F. S. Efeito da extração de compostos fenólicos sobre a atividade antioxidante e antibacteriana in vitro de cogumelo-do-sol. **Arq. Inst. Biol.**, v. 83, p. 1–7, 2016.

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol, 33, p. 281-301, mai-jun, 2000.

TONG, S. Y. C. et al. Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia, 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VANDAMME, E. J.; REVUELTA, J. L. (EDS.). **Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016.

VIZZOTO, M. et al. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* in health care facilities**. 2017.

WILLYARD, C. Drug-resistant bacteria ranked. **Nature**, v. 543, mar. 2017.