



© 2014

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 13 (5): 477 - 487

ISSN 0717 7917

www.blacpma.usach.cl

Artículo Original | Original Article

Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichia virgilioides* Kunth (Sucupira) – Fabaceae – Papilionoidae

[Study on the chemical composition and antibacterial activity of *Bowdichia virgilioides* kunth (Sucupira) - Fabaceae - Papilionoidae]

Laura HI LEITE¹, Saulo R TINTINO², Fernando G FIGUEREDO², Cícera Datiane de M OLIVEIRA¹, Larissa de OLIVEIRA¹, Ana L de Albuquerque SIEBRA¹, Renata de S SAMPAIO¹, Aline Augusti BOLIGON⁴, Daniele O SOUZA¹, Margareth Linde ATHAYDE⁴, Henrique DM COUTINHO², José GM COSTA³, Irwin RA MENEZES¹ & Marta R KERNTOPF¹

¹Laboratório de Farmacologia e Química Molecular; ²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular,

³Laboratório de Pesquisa em Produto Natural, Universidade Regional do Cariri – URCA, Pimenta 63105-000, Crato, CE, Brazil

⁴Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

Contactos / Contacts: Saulo R TINTINO - E-mail address: saulorelison@gmail.com

Abstract: *Bowdichia virgilioides* (Fabaceae - Papilionoidea), popularly known as Sucupira-preta, is a Brazilian native tree used in the traditional medicine against throat infections. Due this fact and due the interest to validate the traditional use, the objective of this work was evaluates the in vitro antibacterial activity of extracts and fractions of the stem and heartwood of the plant. The phytochemical profile revealed the presence of tannins and flavonoids in the stem and heartwood, and only alkaloids in the stem. The HPLC analysis revealed the presence of flavonoids and phenolic acids, natural products with several biological activities, including the modifying antibiotic activity. All microorganisms were inhibited only with MIC \geq 1024 μ g/mL. However, when associated with aminoglycosides, was demonstrated a potentiation of these antibiotics when associated with almost all products assayed and against one bacterium at least.

Keywords: *Bowdichia virgilioides*; modulation; chemical composition

Resumo: *Bowdichia virgilioides* (Fabaceae - Papilionoidea), popularmente conhecida como Sucupira-preta, é uma espécie arbórea nativa do Brasil utilizadas na medicina popular para infecções de garganta. Com base nessas evidências, e com o interesse para justificar o uso popular, este trabalho teve como objetivo verificar a atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos e fracionados de cascas e cerne da planta. Observou-se pela conclusão do levantamento fitoquímico a presença de taninos e flavonóides nas cascas e no cerne, e alcalóides apenas encontrados na casca. A análise por HPLC revelou a presença de flavonóides e ácidos fenólicos, produtos naturais, com diversas atividades biológicas, incluindo a atividade modificadora antibiótica. Todos os microorganismos foram inibidos apenas com o CIM \geq 1024 μ g/mL. No entanto, quando associado a antibióticos aminoglicosídeos, foi demonstrada potenciação destes em quase todos os produtos testados e em pelo menos uma bactéria foi observada uma atividade moduladora significativa.

Palavras chave: *Bowdichia virgilioides*; modulação; composição química

Recibido | Received: 29 de Julio de 2013.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 7 de Septiembre de 2014.

Publicado en línea | Published online: 30 de Septiembre de 2014.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: LHI Leite, SR Tintino, FG Figueredo, CDM Oliveira, L Oliveira, ALA Siebra, RS Sampaio, AA Boligon, DO Souza, ML Athayde, HDM Coutinho, JGM Costa, IRA Menezes, MR Kerntopf. 2014. Composição química e estudo da atividade antibacteriana de *Bowdichia virgilioides* Kunth (Sucupira) – Fabaceae – Papilionoidae. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 13(5): 477 – 487.

INTRODUÇÃO

Sabe-se hoje, que as bactérias apresentam a capacidade genética para adquirir e transmitir resistência contra agentes antibacterianos atualmente disponíveis. Há vários relatos, sobre isolados bacterianos que são conhecidos por serem sensíveis às drogas rotineiramente utilizadas, mas que se tornaram multirresistente aos outros medicamentos disponíveis no mercado (Nascimento *et al.*, 2000; Sakagami & Kajimura, 2002). Consequentemente, as empresas farmacêuticas buscam novas estratégias para abastecer o mercado com novos antimicrobianos. As mais comuns incluem alterar a estrutura molecular dos medicamentos existentes, a fim de torná-los mais eficientes ou recuperar a atividade perdida devido a mecanismos de resistência bacteriana (Chartone-Souza, 1998).

Nesse contexto, os produtos naturais como os de origem vegetal, tem se destacado tanto por apresentar atividade antibacteriana, como também pela sua capacidade de potencializar a atividade antibiótica (Gibbons, 2004; Tintino *et al.*, 2013). O uso de extratos, provenientes de produtos naturais, como agentes antimicrobianos pode ser uma alternativa relevante, tendo em vista que os mesmos apresentam uma baixa possibilidade de proporcionar resistência microbiana, porque são misturas complexas, fazendo com que a adaptabilidade microbiana seja muito difícil (Daferera *et al.*, 2003).

Produtos naturais podem inibir o crescimento de microorganismos por vários mecanismos, podendo estes serem em parte devido à natureza hidrofóbica de alguns componentes. De modo que, tais componentes podem interagir com dupla camada lipídica da membrana celular e afetar a cadeia respiratória e a produção de energia, (Nicolson *et al.*, 1999) ou até mesmo fazer a célula mais permeável aos antibióticos, levando à interrupção da atividade celular (Burt, 2004).

A espécie *Bowdichia virgilioides* Kunt. (Fabaceae) é conhecida popularmente como "Sucupira", pode ser uma alternativa interessante. É uma árvore de tamanho médio encontrado nas florestas tropicais da América do Sul. Na região do Nordeste do Brasileiro sua casca é comumente utilizadas para o tratamento de feridas, e também como agente anti-úlceras e anti-diabético (Bacchi, 1986; Oliveira & Saito, 1989; Macedo & Ferreira, 2004), assim como também suas sementes são utilizadas no tratamento de reumatismo, artrite, e

doenças de pele (Cruz, 1965). Esta planta hoje devido a sua importância, medicinal foi incluída na farmacopéia brasileira (Brandão *et al.*, 2006). Várias bioatividades desta espécie já foram comprovadas, incluindo antimalárica (Deharo *et al.*, 2001), antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante do extrato aquoso (Thomazzi *et al.*, 2010), hipoglicemia (Barbosa-Filho *et al.*, 2005) e inibidor da enzima acetilcolinesterase (Barbosa-Filho *et al.*, 2006) dos extratos desta planta foram relatados.

Estudos anteriores de Investigação química desta espécie, resultaram no isolamento de diversas substâncias como flavonoides (Veloza *et al.*, 1999a; Veloza *et al.*, 1999b; Arriaga *et al.*, 2000), antocianina (Mell, 1929), benzofuranóides (Melo *et al.*, 2001), triterpenóides (Torre negra *et al.*, 1985; Marinho *et al.*, 1994; Melo *et al.*, 2001) e alcaloides (Torre negra *et al.*, 1985; Torre negra *et al.*, 1989; Marinho *et al.*, 1994; Barbosa-Filho *et al.*, 2004). Estas substâncias são conhecidas por apresentarem atividades biológicas importantes, dentre estas a atividade antimicrobiana assim como potencializadora de antibióticos (Dixon *et al.*, 1983; Ho *et al.*, 2001; Sato *et al.*, 2004).

Contudo o objetivo deste trabalho foi avaliar atividade antibacteriana e modificadora da atividade de antibióticos aminoglicosídeos, pelo extrato etanólico e frações hexânicas da casca do caule e do cerne de *Bowdichia virgilioides*, assim como também sua caracterização química.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal

A casca do caule e cerne de *B. virgilioides* Kunth, foram coletadas na Chapada do Araripe, região do Cariri, no município de Crato, Ceará, no mês de maio de 2010. Após a identificação e produção da exsiccata, esta foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima - HCDAL da Universidade Regional do Cariri - URCA, catalogada sob número de registro 5782.

Material bacteriano

As linhagens bacterianas utilizadas foram: *E. coli* (EC-ATCC10536 e EC27) e *S. aureus* (SA-ATCC25923 e SA358) com perfil de resistência identificado na Tabela 1. Todas as linhagens foram mantidas em *Agar infusão de coração* (HIA, Difco Laboratories Ltda.). Antes dos ensaios, as linhagens

foram cultivadas por 18h a 37° C em caldo *infusão de cérebro e coração* (BHI, Difco Laboratories Ltda).

Tabela 1
Origem das linhagens bacterianas e perfil de resistência a antibióticos.

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i> ATCC10536	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	-	-

Ast – Aztreonam; Ax – Amoxicilina; Amp – Ampicilina; Ami – Amicacina; Amox – Amoxicilina; Ca – Cefadroxil; Cfc – Cefaclor; cf - Cefalotina; Caz – Ceftazidima; Cip – Ciprofloxacina; Clo – Cloranfenicol; Im – Imipenem; Can – Canamicina; Szt – Sulfametrim; Tet – Tetraciclina; Tob – Tobramicina; Oxa – Oxacilina; Gen – Gentamicina; Neo – Neomicina; Para – Paramomicina; But – Butirosina; Sis – Sisomicina; Net – Netilmicina; (-) Ausência de resistência ou resistência sem relevância.

As drogas utilizadas foram: gentamicina, canamicina, amicacina e neomicina foram obtidas do laboratório Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, EUA. As soluções foram preparadas de acordo com as recomendações do NCCLS (2003).

Preparação do extrato etanólico da casca do caule e cerne e suas respectivas frações hexânicas (casca e cerne) de *B. virgilioides* Kunth.

As partes coletadas foram trituradas e submersas em solvente etanol 99,9%, separadamente em temperatura ambiente por 72 h. Após esse período, a solução obtida foi filtrada e submetida à destilação do solvente no aparelho evaporador rotativo a vácuo, onde o produto obtido foi levado ao banho-maria, para evaporação do excedente etanólico. Os extratos etanólicos da casca do caule e cerne de *B. virgilioides* K. foram denominados de EECaBv e EECeBv, respectivamente.

As frações hexânicas da casca do caule e cerne, foram denominadas de FHCaBv e FHCEBv, respectivamente.

Para o fracionamento os extratos foram macerados em sílica gel até obtenção de uma mistura homogênea, onde posteriormente foram tratados com solvente hexano para obtenção das frações FHCaBv e FHCEBv. O tratamento com o solvente realizou-se por filtração a vácuo utilizando funil de Büchner e kitassato acoplado a bomba a vácuo, tabela 2 descreve as massas da casca do caule e do cerne e seus produtos e seus respectivos rendimentos.

Prospecção de constituintes químicos do extrato etanólico da casca e cerne de *B. virgilioides* Kunth.

Os testes fitoquímicos para detectar a presença de heterosídeos, taninos, flavonóides, esteroides, triterpenos, cumarinas, quinonas, ácidos orgânicos e de alcaloides foram realizados seguindo o método descrito por Matos (1997). Os testes se baseiam na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

Química, aparelhos e procedimentos gerais

Todos os reagentes utilizados foram de pureza com grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico, foram obtidos da empresa Merck (Darmstadt, Alemanha). Quercetina, rutina e kaempferol foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi realizada utilizando o sistema CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão), destaque Auto Sampler (SIL-20A), equipado com Shimadzu LC-20AT com duas bombas alternadas ligadas ao desgaseificador DGU 20A5 com o integrador CBM 20^a, UV-VIS com detector DAD (diodo) SPD-M20A e Software LC solução 1,22 SP1.

Quantificação de compostos por CLAE

A Análise cromatográfica com fase reversa foi realizada utilizando colunas C18 (4,6 mm x 250 mm) com partículas medindo 5 µm de diâmetro. A fase móvel continha uma solução de água e 2% de ácido

acético (A) e metanol (B), com composição do gradiente de 5% de B nos primeiros 2 minutos mudando para a obtenção de 25%, 40%, 50%, 60%, 70% e 100% de B nos tempos de 10, 20, 30, 40, 50 e 80 minutos, respectivamente, segundo a metodologia descrita por Laghari *et al.* (2011), com algumas adaptações. Os extratos etanólicos das cascas do caule e dos cernes de *Bowdichia virgilioides* foram dissolvidos em etanol na concentração de 2,4 mg/mL.

A presença de seis compostos fenólicos foi investigada: os ácidos gálico, clorogênico e cafeico e os flavonóides quercetina, rutina e kaempferol. A identificação desses compostos, foi realizada pelo método do padrão pelo qual é realizada a comparação dos seus tempos de retenção e através do espectro de absorção UV comparando-os à compostos de padrão comercial. A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min, injetando um volume de 40 µL e o comprimento de onda foi de 254 nm para o ácido gálico, 325 nm para o ácido cafeico e para o ácido clorogênico, e 365 nm para quercetina rutina e kaempferol. Todas as amostras e a fase móvel foram filtradas por membrana (Millipore) com poros de 0,45 µm, e desgaseificadas por ultrassom antes de serem utilizadas. As soluções padrões de referência foram preparadas na fase móvel do CLAE a um intervalo de concentração entre 0,020 - 0,200 mg/mL para kaempferol, quercetina e rutina; e 0,050 - 0,250 mg/mL para os ácidos gálico, cafeico e clorogênico. Os picos de cromatograma foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 400 nm). Curva de calibração para o ácido gálico: $Y = 10523x + 1478.8$ ($r = 0.9999$); ácido cafeico: $Y = 12765x + 1381.7$ ($r = 0.9995$); rutina: $Y = 12691 - 1165.0$ ($r = 0.9998$); quercetina: $Y = 13495x - 1092.6$ ($r = 0.9999$) e kaempferol: $Y = 15692x - 1218.1$ ($r = 0.9997$). Todas as avaliações cromatográficas foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

Atividade antibacteriana (CIM) e modulação da atividade antibiótica

As CIMs (concentrações inibitórias mínimas) foram determinadas em ensaios de micro diluição em caldo

(NCCLS, 2003) utilizando-se um inoculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentava uma concentração de 10^5 UFC/mL em placas de micro titulação com 96 poços, com diluições em série ½. Em cada poço foi adicionado 100 µL de solução de cada amostra. As concentrações finais dos produtos naturais variaram entre 512 - 8 µg/mL. Para os controles foram utilizados os antibióticos padrões amicacina e gentamicina cujas concentrações finais variaram entre 512 µg/mL - 8,0 µg/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de Resazurina. As CIMs foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento.

Para avaliar as amostras como moduladores da ação antibiótica, a CIM dos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, foram avaliados na presença e na ausência das amostras em microplacas estéreis. Os antibióticos foram avaliados nas concentrações variando de 2500 a 2,5 µg/mL.

As amostras foram misturadas em caldo BHI 10% em concentrações sub-inibitórias, obtidos e determinados após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que para o teste de modulação as concentrações das soluções foram reduzidas 8 (oito) vezes (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídos seriadamente 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura continha a suspensão bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados durante a modulação (Coutinho *et al.*, 2008). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de Resazurina como citado anteriormente no teste de determinação da CIM. Os ensaios antibacterianos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das repetições.

Tabela 2

Rendimento dos Extratos etanólicos da casca do caule, do cerne e das suas respectivas frações hexânicas (g)

Parte da planta	Peso seco (g)	Solvente	Rendimento (%)
EECsBv	15,35	Etanol	6,59
EECeBv	8,75	Etanol	1,96
FHCsBv	7,68	Hexano	0,02
FHCeBv	4,38	Hexano	1,17

EECaBv – Extrato etanólico das cascas de *Bowdichia virgilioides*; EECeBv – extrato etanólico dos cerne de *Bowdichia virgilioides*; FHCaBv – Fração hexânica da casca de *Bowdichia virgilioides*; FHCeBv – Fração hexânica do cerne de *Bowdichia virgilioides*.

RESULTADOS

Os extratos e frações avaliados no presente trabalho, após todo o procedimento de preparação, apresentaram rendimentos que estão descritos na Tabela 2. Um ensaio piloto utilizando apenas o DMSO foi realizado, mas nenhuma atividade antibacteriana ou moduladora foi verificada, indicando não apresentar toxicidade.

A partir da elucidação química dos extratos e frações foi possível identificar a presença de diversas classes de substâncias que apresentam uma extensa diversidade de atividades biológicas (Matias *et al.*, 2010; Figueredo *et al.*, 2013), a prospecção fitoquímica dos extratos revelou a presença de três metabólitos secundários: taninos e flavonoides, encontrados nas cascas do caule e no cerne e alcaloides, encontrados apenas na casca Tabela 3.

Tabela 3

Prospecção fitoquímica dos extratos etanólicos da Casca e do cerne.

METABÓLITOS															
EXTRATOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EECa	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
EECe	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

1 – Fenóis; 2 – Taninos Pirogálicos; 3 – Taninos Flobabênicos; 4 – Antocianinas; 5 – Antocianidinas; 6 – Flavonas; 7 – Flavonóis; 8 – Xantonas; 9 – Chalconas; 10 – Auronas; 11 – Flavononóis; 12 – Leucoantocianidinas; 13 – Catequinas; 14 – Flavononas; 15 – Alcaloides; (+) presença; (-) ausência. EECa – Extrato Etanólico da Casca; EECe- Extrato Etanólico do Cerne.

A análise por HPLC identificou a presença de ácido clorogênico (tR = 23,91 min; pico 1); ácido cafeico (tR = 38,12 min; pico 2); rutina (tR = 41,04 min; pico 3); quercetina (tR = 50,23 min; pico 4) e kaempferol (tR = 59,68 min; pico 5) Figura 1,

revelando que os flavonóides (quercetina, rutina e kaempferol) e fenóis ácidos (ácido clorogênico e cafeico) estão presentes nos extratos etanólicos do caule em diferentes concentrações, conforme observado na Tabela 4.

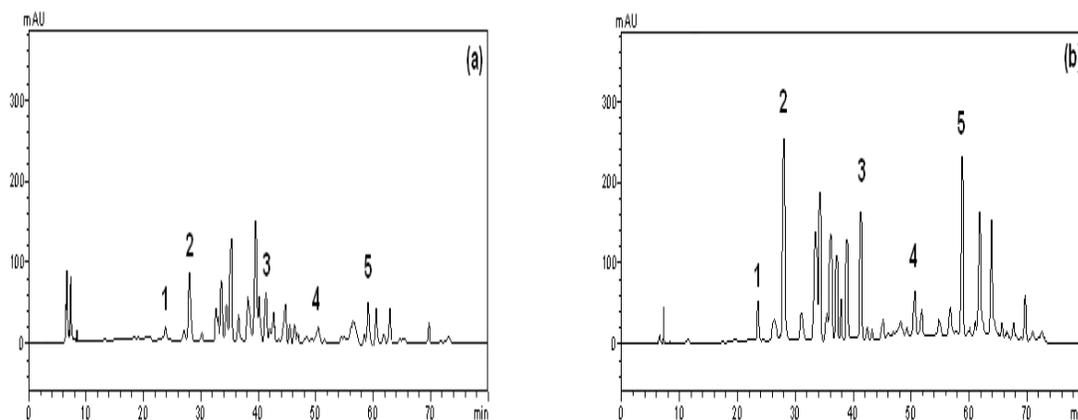


Figura 1

Representação do perfil da cromatografia líquida de alta eficiência (a) extrato da casca e (b) extrato do cerne de *Bowdichia virgilioides*, detecção UV estava em 325 nm. Ácido clorogênico (pico 1), ácido cafeico (pico 2), rutina (pico 3), a quercetina (pico 4) e kaempferol (pico 5). Condições cromatográficas são descritos na secção de Métodos.

Tabela 4

Composição dos compostos fenólicos e flavonoides de *Bowdichia virgilioides* resultados são expressos como média \pm desvio padrão (SD) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,005$.

Compostos	<i>Bowdichia virgilioides</i>			
	Caule externo- EECaBv		Caule interno- EECeBv	
	mg/g	%	mg/g	%
Ácido clorogênico	4.63 \pm 0.01 a	0.46	14.43 \pm 0.01 a	1.45
Ácido cafeico	31.27 \pm 0.17 b	3.12	62.33 \pm 0.17 b	6.23
Rutina	13.76 \pm 0.13 c	1.37	41.95 \pm 0.13 c	4.19
Kaempferol	12.29 \pm 0.05 c	1.22	58.71 \pm 0.05 e	5.87
Quercetina	8.50 \pm 0.06 d	0.85	16.28 \pm 0.06 d	1.62

EEBBV – Extrato Etanólico da casca de *B. virgilioides*;

EESBV – Extrato Etanólico do cerne de *B. virgilioides*.

A prospecção fitoquímica e a HPLC revelaram a presença de flavonoides em maior quantidade em todas as partes do vegetal. O kaempferol foi o metabólito que apresentou maior tempo de retenção, seguido de quercetina e rutina. No entanto, para casca, os resultados podem estar direcionados a presença de alcaloides. Esta parte do vegetal apresentou significativa presença deste metabólito.

Os extratos e as frações apresentaram CIM \geq 1024 μ g/mL frente às linhagens padrões testadas, não demonstrando atividade clínica relevante de acordo com os limites estabelecidos pelo protocolo (Houghton *et al.*, 2007). No entanto, foi observado a interferência das amostras sobre a atividade de aminoglicosídeos, demonstrando uma interferência na atividade dos antibióticos, com redução das CIMs tabelas 5 e 6. Sendo o efeito mais representativo foi na associação do EECeBV na concentração de 128

$\mu\text{g/mL}$ (CIM 1/8) com os antibióticos no meio de cultura, observando um reforço na atividade da gentamicina associada ao EECeBV frente à EC 27 com redução da CIM de 1250 para 156,25 $\mu\text{g/mL}$. Foi observado ainda um aumento da CIM da

amicacina de 625 para 2500 $\mu\text{g/mL}$, quando associada ao EECaBv e ao FHCeBv em uma concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$ (CIM 1/8), frente a linhagem de EC 27.

Tabela 5
Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência das amostras em uma concentração CIM/8 (128 $\mu\text{g/mL}$), frente a linhagem de *E. coli* 27

<i>E. coli</i> 27					
CIM Isolado		CIM Combinado			
ANT/PROD		EECaBv	EECeBv	FHCaBv	FHCeBv
CIM do PROD		≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
Canamicina	625	156,25	625	625	625
Amicacina	625	2.500	625	156,25	2.500
Neomicina	312,5	312,5	78,125	78,125	312,5
Gentamicina	1.250	1.250	156,25	312,5	1.250

EECaBV – Extrato etanólico das cascas de *Bowdichia virgilioides*; EECeBv – extrato etanólico das cernes de *Bowdichia virgilioides*; FHCsBv – Fração hexânica da casca de *Bowdichia virgilioides*; FHCeBv – Fração hexânica do cerne de *Bowdichia virgilioides*. Prod- Produto natural. ANT- Antibiótico

Tabela 6
Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos aminoglicosídeos na presença e na ausência das amostras em uma concentração CIM/8 (128 $\mu\text{g/mL}$), frente a linhagem de *S. aureus* 358.

<i>S. aureus</i> 358					
CIM Isolado		CIM Combinado			
ANT/PROD		EECaBv	EECeBv	FHCaBv	FHCeBv
CIM do PROD		≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
Canamicina	78,13	78,13	78,13	78,13	19,53
Amicacina	39,06	39,06	4,88	39,06	39,06
Neomicina	19,53	19,53	19,53	19,53	2,44
Gentamicina	9,76	2,44	2,44	9,76	2,44

EECaBV – Extrato etanólico das cascas de *Bowdichia virgilioides*; EECeBv – extrato etanólico das cernes de *Bowdichia virgilioides*; FHCsBv – Fração hexânica da casca de *Bowdichia virgilioides*; FHCeBv – Fração hexânica do cerne de *Bowdichia virgilioides*. Prod- Produto natural. ANT- Antibiótico

DISCUSSÃO

Várias plantas medicinais foram utilizadas como fonte de matéria prima para isolamento e purificação de muitos antimicrobianos que são utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Desse modo, é provável cogitar a utilização das plantas como fontes de novas drogas contra bactérias resistentes aos antimicrobianos tradicionais (Buttler & Buss, 2006). Nesse estudo como pode ser observado, o extrato não teve ação antibacteriana com relevância clínica, resultado semelhante ao observado por Agra *et al.* (2013), apesar de que o mesmo tenha sido feito pelo método de difusão em disco. Entretanto na atividade moduladora sobre a ação antibiótico, foi verificada a atividade sinérgica conforme pode ser visto nas tabelas 5 e 6.

É conhecida a ação sinérgica de produtos naturais junto a antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento terapêutico, determinando uma diminuição na sua CIM (Sousa *et al.*, 2011; Figueredo *et al.*, 2013). Estudos indicam que o aumento da kaempferol, pode induzir o aumento da atividade antibacteriana quando associada à quercetina e rutina contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, por meio da neutralização das cargas da proteína de membrana das porinas, facilitando a penetração do kaempferol na célula bacteriana (Arima *et al.*, 2002; Veras *et al.*, 2011). Segundo Teffo *et al.* (2010), o isolado kaempferol possui reconhecida atividade antibacteriana.

Há outros estudos que indicam o potencial antibacteriano do ácido cafeico (Bowels & Miller, 1994; Almajano *et al.*, 2007). Já o composto fenólico ácido clorogênico também presente em ambos os extratos, apresenta atividade antibacteriana associada com o aumento permeabilidade das membranas (Cowan, 1999; Lou *et al.*, 2011). Por esta razão, acredita-se que os flavonóides detectados nos extratos afetam as estruturas das membranas, devido as suas características não polares, aumentando a permeabilidade e absorção dos antibióticos (Tsuchiya *et al.*, 1996; Cowan, 1999). Estes dados corroboram com as combinações de flavonóides para potencialização da ação antibiótica, fato este que não foi observado quando os compostos rutina e quercetina foram ensaiados isolados (Alvarez *et al.*, 2008; Veras *et al.*, 2011), mas foi observada quando os compostos foram ensaiados em associação com outros flavonóides, tais como kaempferol (Teffo *et al.*, 2010; Araruna *et al.*, 2012), podendo assim justificar os resultado de modulação observados neste trabalho.

A atividade sinérgica observada, também pode ser devido a constituição de metabolitos secundários presentes no extrato e nas frações como os taninos, flavonoides e alcaloides que são sintetizados por plantas em resposta a infecções microbianas (Dixon *et al.*, 1983; Ho *et al.*, 2001), sendo capazes de alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática facilitando absorção das drogas (Tsuchiya *et al.*, 1996; Matias *et al.*, 2010; Figueredo *et al.*, 2013).

Algumas das classes dos metabólitos secundários elucidados nesse trabalho já foram caracterizadas como modificadores da atividade antibiótica, tais como taninos (Matias *et al.*, 2010; Figueredo *et al.*, 2013), flavonóides e derivados (Sato *et al.*, 2004).

A atividade dos flavonoides é provavelmente devido à sua capacidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede celular ou ainda o caráter lipofílico dos flavonóides ser responsável pela ruptura da membrana celular dos microrganismos (Tsuchiya *et al.*, 1996). Já a ação dos taninos está relacionada à precipitação de proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico. Algumas bactérias são sensíveis aos taninos, dentre elas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis* e *Shigella dysenteriae* (Castro *et al.*, 1999).

A possível diferença de atividade das amostras na associação com os aminoglicosídeos, provavelmente deve-se as diferenças estruturais destes antibióticos que são moléculas hidrofílicas, formadas por um anel aminociclitol central ligado a um ou mais amino açúcar através de ligação glicosídica. Na maioria destes compostos com utilidade clínica, o grupo aminociclitol é a 2-desoxi-estreptamina, que pode ser dissubstituída na posição 4 e 5, ou 4 e 6 (Magnet & Blanchad, 2005). Assim podendo interferir na polaridade, solubilidade, enfim, na absorção destas drogas.

Já a redução na atividade da amicacina na associação com o EECaBv e o FHCBv, frente a *E. coli*, possivelmente está relacionado ao efeito antioxidante dos flavonoides, que é atribuído à propriedade quelante dos mesmos (Behling *et al.*, 2004). De acordo com Granowitz & Brown (2008), os efeitos antagônicos do uso combinado entre antibióticos podem ser atribuído a quelação mútua.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os extratos etanólicos da casca do caule e do cerne de *B. virgilioides* e suas respectivas frações são uma fonte alternativa de produtos naturais com ação antibacteriana, já que possuem a presença de compostos com reconhecida atividade antibacteriana como taninos, flavonoides e alcaloides, além de indicar a possibilidade do uso desses produtos naturais combinados a antibióticos tradicionais contra linhagens Gram-positivas e Gram negativas. Os dados obtidos no presente trabalho são promissores e poderão incentivar futuras pesquisas sobre os aspectos fitoquímicos e microbiológicos de produtos naturais isolados de *B. virgilioides*, a fim de apoiar a sua possível utilização na terapêutica e no combate à multirresistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

- Almajano MP, Carbó R, Delgado ME, Gordon MH. 2007. Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. **J Food Sci** 72: 258 - 263.
- Agra IK, Pires LL, Carvalho PS, Silva-filho EA, Smaniotto S, Barreto E. 2013. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice. **An Acad Bras Ciên** 945 - 954.
- Alvarez MA, Debattista NB, Pappano NB. 2008. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. **Folia Microbiol** 53: 23 - 28.
- Araruna MK, Brito AS, Morais-Braga, MF, Santos KK, Souza TM, Leite TR, Costa JG, Coutinho HDM. 2012. Evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of pilocarpine and rutin. **Ind J Med Res** 135: 252 - 254.
- Arima H, Ashida H, Danno G. 2002. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteridis*. **Biosci Biotechnol Biochem** 66: 1009 - 1014.
- Arriaga AMC, Gomes GA, Braz-Filho R. 2000. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia** 71: 211 - 212.
- Bacchi EM. 1986. Ação antiúlcera e cicatrizante de algumas plantas brasileiras. **Rev Bras Farmacogn** 1: 93-100.
- Barbosa-Filho JM, Almeida JRGS, Costa VCO, Da-Cunha EVL, Silva MS, Braz-Filho R. 2004. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. **J Asian Nat Prod Res** 6: 11 - 17.
- Barbosa-Filho JM, Vasconcelos THC, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RAG, Guedes DN, Falcão HS, Moura MD, Diniz MFFM, Modesto-Filho J. 2005. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Rev Bras Farmacogn** 15: 392 - 413.
- Barbosa-Filho JM, Medeiros CP, Diniz MFFM, Batista LM, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, Almeida JRGS, Quintans-Júnior LJ. 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Rev Bras Farmacogn** 16: 258 - 285.
- Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi MLP. 2004. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alim Nutr** 15: 285 - 292.
- Bowels BL, Miller AJ. 1994. Caffeic acid activity against *Clostridium botulinum* spores. **J Food Sci** 59: 905 - 908.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM. 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev Bras Farmacogn** 16: 408 - 420.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **Int J Food Microbiol** 94: 223 - 53.
- Buttler MS, Buss AD. 2006. Natural products - the future scaffolds for novel antibiotics? **Biochem Pharmacol** 71: 919 - 929.
- Castro HG, Casali VWD, Barbosa LCA, Cecon PR. 1999. Rendimento de taninos em dois acessos de carqueja (*Baccharis myrcecephala* D. C.), em diferentes épocas da colheita de Viçosa-MG. **Rev Bras de Plant Med** 1: 29 - 33.
- Chartone-Souza E. 1998. Bactérias ultra-resistentes: uma guerra quase perdida. **Cienc Hoje** 23: 27 - 35.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Silva FVS, Siqueira JR. 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy** 54: 328 - 330.
- Cowan M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev** 12: 564 - 582.

- Cruz GL. 1965. **Livro Verde das Plantas Mediciniais e Industriais do Brasil**. Ed. Helmus, Belo Horizonte, Brasil.
- Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection** 22: 39 - 44.
- Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Munoz V, Ruiz G, Sauvain M. 2001. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **J Ethnopharmacol** 77: 91 - 98.
- Dixon RA, Dey PM, Lamb CJ. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol** 55: 1 - 69.
- Figueiredo FG, Ferreira EO, Lucena BFF, Torres CMG, Lucetti DL, Lucetti ECP, Silva JMFL, Santos FAV, Medeiros CR, Oliveira GMM, Colares AV, Costa JGM, Coutinho HDM, Menezes IRA, Silva JCF, Kerntopf MR, Figueiredo PRL, Matias EFF. 2013. Modulation of the antibiotic activity by extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Biomed Res Int** 1 - 5.
- Gibbons S. 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. **Nat Prod Rep** 21: 263 - 277.
- Granowitz EV, Brown RB. 2008. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Crit Care Clin** 24: 421 - 442.
- Ho KY, Tsai CC, Huang JS, Chen CP, Lin TC, Lin CC. 2001. Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitisidaea*. **J Pharm Pharmacol** 53: 187 - 191.
- Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. 2007. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **J Ethnopharmacol** 110: 391 - 400.
- Laghari AH, Memon S, Nelofar A, Khan KM, Yasmin A. 2011. Determination of free phenolic acids and antioxidant activity of methanolic extracts obtained from fruits and leaves of *Chenopodium album*. **Food Chem** 126: 1850 - 1855.
- Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. 2011. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. **J Food Sci** 76: 398 - 403.
- Macedo M, Ferreira AR. 2004. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. **Rev Bras Farmacogn** 14: 45 - 47.
- Magnet S, Blanchard JS. 2005. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chem Rev** 105: 477 - 497.
- Marinho LC, Cunha MTMC, Thomas G, Barbosa-Filho JM. 1994. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia** 65: 475.
- Matias EFF, Santos KKA, Almeida TS, Costa JGM, Coutinho HDM. 2010. Enhancement of antibiotic activity by *Cordia verbenacea* DC. **Lat Am J Pharm** 29: 1049 - 1052.
- Matos FJA. 1997. **Introdução à fitoquímica experimental**, 1ª Edição. UFC Edições, Fortaleza, Brasil.
- Mell CD. 1929. Interesting sources of natural dyestuffs. **Textile Colorist** 51: 453 - 455.
- Melo FN, Navarro VR, Silva MS, Cunha EVL, Barbosa-Filho JM, Braz-Filho R. 2001. Bowdenol, a 2, 3-dihydrobenzofuran constituent from *Bowdichia virgilioides*. **Nat Prod Lett** 15: 261 - 266.
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol** 31: 247 - 256.
- NCCLS. 2003. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard, 6th ed. NCCLS document M7. Wayne, Pennsylvania, USA.
- Nicolson K, Evans G, O'Toole PW. 1999. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. **FEMS Microbiol Lett** 179: 233 - 239.
- Oliveira O, Saito ML. 1989. Alguns vegetais brasileiros empregados no tratamento do diabetes. **Rev Bras Farmacogn** 2: 170 - 196.
- Sakagami Y, Kajimura K. 2002. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin-resistant enterococci. **J Hosp Infect** 50: 140 - 144.
- Sato Y, Shibata H, Arakaki N, Higuti T. 2004. 6, 7-dihydroxyflavone dramatically intensifies the susceptibility to β -lactam antibiotics in methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother** 48: 1357 - 1360.

- Sousa EO, Barreto FS, Rodrigues FFG, Costa JGM. 2011. Atividade antibacteriana e interferência de *Lantana camara* Linn e *Lantana montevidensis* Briq na resistência de aminoglicosídeos. **Rev Bras de Bioci** 9: 1 - 5.
- Teffo LS, Aderogba MA, Eloff JN. 2010. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. **S Afr J Bot** 76: 25 - 29.
- Thomazzi SM, Silva CB, Silveira DCR, Vasconcellos CLC, Lira AF, Cambui EVF, Antonioli AR. 2010. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **J Ethnopharmacol** 127: 451 - 445.
- Tintino SR, Guedes GMM, Cunha FAB da, Santos KKA dos, Ferreira EFM, Morais-Braga MF, Andrade JC, Souza ES, Freitas MA, Alencar LBB, Costa JGM, Coutinho HDM. 2013. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity and modulating the ethanol and hexane extracts of *Costus arabicus* bulb. **Bioscienc J** 29: 732 - 738.
- Torrenegra R, Bauereiss P, Achenbach H. 1989. Homoomosanine-type alkaloids from *Bowdichia virgilioides*. **Phytochemistry** 28: 2219 - 2221.
- Torrenegra R, Escarria S, Bauereiss P, Achenbach H. 1985. The major alkaloid of the bark from *Bowdichia virgilioides*. **Planta Med** 51: 276 - 277.
- Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Jinuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Ethnopharmacol** 50: 27 - 34.
- Veloza LSM, Silva BP, Bernardo RR, Parente JP. 1999a. Odoratin-7-O- β -D-glucopyranoside from *Bowdichia virgilioides*. **Phytochemistry** 52: 1473 - 1477.
- Veloza LSM, Silva BP, Silva BEM, Parente JP. 1999b. Constituents from the roots of *Bowdichia virgilioides*. **Fitoterapia** 70: 532 - 535.
- Veras HN, Santos IJ, Santos AC, Fernandes CN, Matias EF, Leite GO, Souza HH, Costa JG, Coutinho HD. 2011. Comparative evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of quercetin and isoquercetin *in vitro*. **Curr Top Nutraceut Res** 9: 25 - 30.