



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ÍTALO CAIO LOURENÇO DA SILVA

**Avaliação Fitoquímica e Antimicrobiana de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.  
(mussambê)**

Recife  
2021

ÍTALO CAIO LOURENÇO DA SILVA

**Avaliação Fitoquímica e Antimicrobiana de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.  
(mussambê)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Elba Lucia Cavalcanti de Amorim

Recife

2021

Catálogo na Fonte  
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

S586a Silva, Ítalo Caio Lourenço da.  
Avaliação fitoquímica e antimicrobiana de tarenaya spinosa (Jacq.) Raf.  
(mussambê) / Ítalo Caio Lourenço da Silva. – 2021.  
83 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Elba Lucia Cavalcanti de Amorim.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas. Recife, 2021.

Inclui referências e anexo.

1. Infecções Respiratórias. 2. Etnofarmacologia. 3. Farmacognosia. 4.  
Teste de Sensibilidade Antimicrobiana. 5. Permeabilidade da Membrana  
Celular. I. Amorim, Elba Lucia Cavalcanti de (Orientadora). II. Título.

617.6

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2022-028)

ÍTALO CAIO LOURENÇO DA SILVA

**“Avaliação Fitoquímica e Antimicrobiana de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.  
(mussambê)”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Aprovada em: 28/10/2021.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim (Presidente)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Patrícia Cerqueira Macedo (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Umberto Pereira Souza Júnior (Examinador Externo)

Faculdade Maurício de Nassau

Este trabalho é totalmente dedicado aos meus excelentíssimos pais, José Severino da Silva e Maria Ivaneide Lourenço da Silva, que se dedicam ao máximo na realização das minhas conquistas. Obrigado!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por ser tão bom na minha vida, por permitir cada conquista alcançada, tudo da forma certa e como deveria de fato acontecer e aos meus pais **José Severino da Silva** e **Maria Ivaneide Lourenço da Silva** por me ajudarem a tornar realidade os planos de Deus!

Agradeço a professora Doutora **Elba Lucia Cavalcanti de Amorim** por ter me ensinado tantas coisas, ter me ouvido falar bastante sobre as minhas idealidades na pesquisa e principalmente por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório **LAPRONAT**, assim como todas as pessoas que fazem parte dessa família linda, sem exceções, que irei levar comigo para sempre. Em especial, uma integrante dessa família não pode deixar de ser citada porque é uma pessoa muito especial a quem todos recorrem sempre, **Jenifer Rodrigues de Oliveira**, mais conhecida como “Jeninha”. Obrigado!

Agradeço ao meu pupilo **Linaldo José Soares**, por ter realizado algumas etapas da pesquisa junto comigo. Obrigado!

Agradeço aos meus amigos que torceram e sempre acreditaram em mim, em especial **Emmanuel Carneiro da Silva** que me incentivou muito, principalmente no dia anterior ao encerramento das inscrições (que eu já tinha desistido de fazer, kkkk), o que me fez ter ânimo para participar da seleção e felizmente ter sido classificado, além de ter me ajudado em algumas etapas ao longo da pesquisa. Sou-lhe imensamente grato por isso! Além disso, agradeço muito pela força que sempre recebi da minha melhor amiga **Mirele Pereira da Silva**, com quem sempre posso contar. Muito obrigado também, Baquinha!

Agradeço a professora Doutora **Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo** por ser uma pessoa tão simpática e alto astral, além de ter me cedido seu espaço **LAM**, pelo qual passei um bom tempo da minha pesquisa. Obrigado!

Por fim, agradeço a minhas irmãs **Tarcila Lourenço da Silva** e **Tassyanna Kelly Lourenço da Silva** que, junto com meus pais, compõem minha família linda que é meu porto seguro sempre. Muito obrigado, amo vocês! Além de todos os meus parentes mais próximos, tias, primas e primos. Obrigado!

O Senhor fez a terra produzir os medicamentos: o homem sensato  
não os despreza  
Uma espécie de madeira não adoçou o amargor da água? Essa  
virtude chegou ao conhecimento dos homens  
O Altíssimo deu-lhes a ciência da medicina para ser honrado em  
suas maravilhas  
E dela se serve para acalmar as dores e curá-las  
O farmacêutico faz misturas agradáveis, compõe unguentos úteis à  
saúde, e seu trabalho não terminará  
Até que a paz divina se estenda sobre a face da terra.  
(Ecles, 38, 4-8).

## RESUMO

O estudo da atividade biológica de plantas medicinais utilizadas pela população de uma determinada região, caracterizado como etnofarmacologia, correlaciona o uso popular com estudos farmacológicos, permitindo com isso a confirmação de seus efeitos para a promoção de um uso mais racional e seguro dessas plantas, além de gerar informações científicas sobre a flora de determinados biomas, como a caatinga, que é pouco explorada neste sentido. *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf é um exemplo de planta medicinal do bioma caatinga, utilizada principalmente para problemas respiratórios como gripe, asma, bronquite, tosse, tuberculose, otite, pneumonia e inflamações em geral. O presente trabalho objetivou estudar a atividade antimicrobiana e fitoquímica desta espécie. As partes aéreas da planta foram coletadas em Malhada de Pedra, área rural de Caruaru, Pernambuco, pelo qual foram processadas e submetidas a maceração com utilização de solventes com polaridade crescente (hexano, acetato de etila e metanol), obtendo-se três extratos secos. O rendimento dos extratos foi calculado em percentual com os valores da droga vegetal seca pulverizada e o peso dos extratos secos. Para a atividade antimicrobiana dos extratos foi realizada as técnicas de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Ensaio de Permeabilidade Membranar. Já a análise fitoquímica ocorreu por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Bioautografia e Doseamentos por espectrofotometria. Obteve-se um rendimento de 6,87 %, 2,28 % e 10,22 % para os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico, respectivamente. O extrato de acetato de etila se mostrou mais significativo que os demais nas análises biológicas, apresentando uma CIM de 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1031 B e 1033 B e *Acinetobacter baumannii* ATCC 49606 e UFPEDA 1020 A, se mostrando moderadamente ativo. Usando mesma CIM o extrato se mostrou bactericida no teste de CBM, inibindo o crescimento bacteriano por retrocultivo. Não se mostrou ativo na alteração da permeabilidade da membrana das bactérias, o que se presume sua atuação em um outro mecanismo de ação. O extrato ativo, apresentou em sua composição fitoquímica, a presença de triterpenos e esteroides e derivados cumarínicos. Esses metabólitos secundários se mostraram ativos com a formação de halo de inibição do crescimento bacteriano no teste de bioautografia, corroborando com os resultados das análises biológicas realizadas e com estudos relacionados, realizados por outros autores. Na análise

quantitativa, o extrato de acetato de etila apresentou uma concentração de  $39,38 \pm 4,89$  mg EC/g de derivados cumarínicos. Já o teor de triterpenos e esteroides foi de  $338,48 \pm 28,48$  mg EEstg/g. Presume-se que ambos os metabólitos secundários atuam em sinergismo para a atividade biológica, seja em um único mecanismo de ação, agindo em conjunto, ou em mais de um, agindo separadamente. Os resultados encontrados mostram que o mussambê pode atuar em bactérias responsáveis por infecções do sistema respiratório, corroborando com seu uso popular. Porém são necessários mais estudos da ação do mussambê em outras vertentes dos problemas respiratórios como antiinflamatório, antitussígeno, expectorante, broncodilatador, entre outros, uma vez que os extratos possuem metabólitos secundários com essas características farmacológicas.

**Palavras-chave:** infecções respiratórias; etnofarmacologia; farmacognosia; teste de sensibilidade antimicrobiana; permeabilidade da membrana celular.

## ABSTRACT

The study of the biological activity of medicinal plants used by the population of a given region, characterized as ethnopharmacology, allows us to correlate popular use with pharmacological studies, thus allowing the confirmation of their effects to promote a more rational and safe use of these plants, in addition to generating scientific information about the flora of certain biomes, such as the caatinga, which is little explored in this regard. *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf is an example of a medicinal plant from the Caatinga biome, used mainly for respiratory problems such as flu, asthma, bronchitis, cough, tuberculosis, otitis, pneumonia and inflammation in general. The present work aimed to study the antimicrobial and phytochemical activity of this species. The aerial parts of the plant were collected in Malhada de Pedra, a rural area of Caruaru, Pernambuco, where they were processed and subjected to maceration using increasing polarity solvents (hexane, ethyl acetate and methanol), obtaining three dry extracts. The yield of extracts was calculated as a percentage with the values of the sprayed dry plant drug and the weight of the dry extracts. For the antimicrobial activity of the extracts, the techniques of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (CBM) and Membrane Permeability Assay were performed. The phytochemical analysis was carried out by Thin Layer Chromatography (TLC), Bioautography and spectrophotometric assays. A yield of 6.87%, 2.28% and 10.22% was obtained for the hexane, ethyl acetate and methanol extracts, respectively. The ethyl acetate extract was more significant than the others in the biological analyses, presenting a MIC of 250 µg/mL for *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1031 B and 1033 B and *Acinetobacter baumannii* ATCC 49606 and UFPEDA 1020 A, showing moderately active. Using the same MIC, the extract proved to be bactericidal in the CBM test, inhibiting bacterial growth by retroculture. It was not shown to be active in changing the permeability of the bacteria membrane, which presumably acts in another mechanism of action. The active extract, presented in its phytochemical composition, the presence of triterpenes and steroids and coumarin derivatives. Such secondary metabolites were shown to be active with the formation of a halo of inhibition of bacterial growth in the bioautography test, corroborating the results of the biological analyzes carried out and related studies carried out by other authors. In the quantitative analysis, the ethyl acetate extract showed a concentration of 39.38±4.89 mg EC/g of

coumarin derivatives. The content of triterpenes and steroids was  $338,48 \pm 28,48$  mg EEStg/g. It is assumed that both with phytochemical groups act in synergism for biological activity, either in a single mechanism of action, acting together, or in more than one, acting separately. The results found show that mussambê can act on bacteria responsible for respiratory system infections, corroborating its popular use. However, more studies are needed on the action of mussambê in other aspects of respiratory problems such as anti-inflammatory, antitussive, expectorant, bronchodilator, among others, since the extracts have secondary metabolites with these pharmacological characteristics.

**Keywords:** respiratory tract infections; ethnopharmacology; pharmacognosy; microbial sensitivity tests; cell membrane permeability.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Aspectos da vegetação que deu origem ao nome do bioma	20
Figura 2 –	Localização geográfica do bioma caatinga	21
Figura 3 –	Ilustração botânica de <i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf., mussambê	23
Figura 4 –	Mapa de distribuição da espécie <i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf. no mundo (I), na América do Sul (II) e na região nordeste do Brasil (III), através da platadorma <i>Global Biodiversity Information Facility</i> (GBIF), entre o período de 1837 – 2021	24
Figura 5 –	Comparativo entre os sinônimos buscados para encontrar informações sobre o mussambê pela plataforma <i>Global Biodiversity Information Facility</i> (GBIF)	25
Figura 6 –	Fluxograma da rota biossintética dos fenilpropanóides e terpenoides	33
Figura 7 –	Esquema das vias biossintéticas, resumidas, da formação de terpenoides	34
Figura 8 –	Esquema das vias biossintéticas, resumidas, da formação de fenilpropanoides	35
Figura 9 –	Esquema da síntese de cumarinas simples	36
Figura 10 –	Esquema da via biossintética, resumida, dos flavonóides	36
Figura 11 –	Representação dos taninos condensados	37
Figura 12 –	<i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf. (A) e suas partes aéreas (B: folhas, C: inflorescências, D: flor)	39
Quadro 1 –	Sistemas eluentes e reagentes reveladores congruentes aos metabólitos secundários investigados	41
Quadro 2 –	Cepas bacterianas utilizadas nos experimentos	43
Figura 13 –	Representação da microdiluição em placa para a técnica de CIM	44
Figura 14 –	Redução da resazurina em resorufina	45

Figura 15 –	Cromatografia em Camada Delgada para pesquisa de metabólitos secundários dos extratos de <i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf.	52
Figura 16 –	Teste confirmatório da presença de saponinas no extrato	54
Figura 17 –	Estrutura química do cristal violeta	60
Gráfico 1 –	Concentração de cristal violeta não absorvido (livre)	62
Gráfico 2 –	Concentração de cristal violeta absorvido	62
Figura 18 –	Exemplo dos resultados do teste de bioautografia	64
Figura 19 –	Exemplo da revelação do teste de bioautografia	64
Figura 20 –	Curva de calibração do doseamento de triterpenos/esteroides	66
Figura 21 –	Curva de calibração do doseamento de cumerinas	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Prospecção fitoquímica e rendimento dos extratos das partes aéreas de <i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf.	51
Tabela 2 –	Resultado do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressos em µg/mL	56
Tabela 3 –	Resultado do teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) a partir dos resultados da CIM	59
Tabela 4 –	Concentração de cristal violeta não absorvido (livre) e absorvido	61
Tabela 5 –	Quantificação de triterpenos e esteroides e cumarinas nos extratos de <i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf.	67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>18</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Etnobotânica e Etnofarmacologia</b>	<b>19</b>
<b>3.2</b>	<b>Bioma Caatinga</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Mussambê: Aspectos Botânicos</b>	<b>21</b>
3.3.1	Família Capparaceae	21
3.3.2	Gênero <i>Cleome</i> e <i>Tarenaya</i>	22
3.3.3	Espécie <i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf.	23
<b>3.4</b>	<b>Infecções Respiratórias</b>	<b>26</b>
3.4.1	Infecções das Vias Aéreas Superiores (IVAS)	27
3.4.1.1	<i>Nasofaringite</i>	27
3.4.1.2	<i>Faringite</i>	27
3.4.1.3	<i>Laringite</i>	28
3.4.1.4	<i>Epiglotite</i>	29
3.4.1.5	<i>Sinusite</i>	29
3.4.1.6	<i>Otite Média</i>	30
3.4.2	Infecções das Vias Aéreas Inferiores (IVAI)	31
3.4.2.1	<i>Bronquite</i>	31
3.4.2.2	<i>Pneumonia</i>	32
<b>3.5</b>	<b>Metabólitos Secundários Com Atividade Antimicrobiana</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>4.1</b>	<b>Material Vegetal</b>	<b>39</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtenção dos Extratos</b>	<b>40</b>
<b>4.3</b>	<b>Rendimento</b>	<b>40</b>
<b>4.4</b>	<b>Triagem Fitoquímica Qualitativa</b>	<b>40</b>
<b>4.5</b>	<b>Atividade Antimicrobiana</b>	<b>43</b>
4.5.1	Microrganismos	43
4.5.2	Preparação dos Inóculos	43

4.5.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	44
4.5.4	Concentração Bactericida Mínima (CBM)	45
4.5.5	Ensaio de Permeabilidade Membranar – Cristal Violeta	46
<b>4.6</b>	<b>Bioautografia</b>	<b>47</b>
4.6.1	Confecção das Placas de CCD (Cromatografia em Camada Delgada)	47
4.6.2	Preparação dos Inóculos	48
4.6.3	Procedimento	48
<b>4.7</b>	<b>Doseamento de Cumarinas</b>	<b>48</b>
<b>4.8</b>	<b>Doseamento de Triterpenos e Esteróides</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Triagem Fitoquímica Qualitativa</b>	<b>51</b>
<b>5.2</b>	<b>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b>	<b>55</b>
<b>5.3</b>	<b>Concentração Bactericida Mínima (CBM)</b>	<b>58</b>
<b>5.4</b>	<b>Ensaio de Permeabilidade Membranas – Cristal Violeta</b>	<b>59</b>
<b>5.5</b>	<b>Bioautografia</b>	<b>63</b>
<b>5.6</b>	<b>Doseamento de triterpenos/esteroides e cumarinas</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXO A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA (EXSICATA)</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Etnobotânica se destina a realizar levantamentos de dados sobre plantas, sejam elas medicinais, alimentícias ou usadas para outros fins, por indivíduos de uma determinada localidade. Quando essas plantas são medicinais, os dados obtidos podem servir de base para o desenvolvimento de estudos químicos e farmacológicos para se traçar uma associação entre o uso popular e efeito terapêutico esperado, na tentativa de se comprovar, ou não, sua utilização, sendo assim um estudo etnofarmacológico (CORDEIRO & FELIX, 2014; SALES et al., 2015).

A caatinga é uma região semiárida que se encontra exclusivamente no nordeste brasileiro, e possui uma biodiversidade muito vasta. Esse bioma se destaca por sua vegetação, contendo uma grande variedade de espécies, que são utilizados pela população local de diversas formas, sendo uma delas a prática do uso caseiro de plantas para o tratamento e/ou cura de doenças (SOUZA et al., 2015). Dentre essa variedade se destacam, principalmente, as árvores de pequeno porte e arbustos, na maioria das vezes contendo espinho ou acúleos e folhas pequenas (FERNANDES & QUEIROZ, 2018).

*Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. é um exemplo de planta usada como medicinal pertencente a esse bioma, sendo uma das 30 espécies do gênero *Tarenaya* (SOARES NETO, 2017). Essa espécie já fez parte do gênero *Cleome* como uma das cerca de 200 espécies, presentes em países tropicais, mais adaptados à seca sazonal (SHARAF et al., 1997; MABBERLEY, 2008). Quanto à sua família já foi tratada como pertencente à Cleomaceae e Brassicaceae, mas atualmente, pertence à família Capparaceae (NOZOLILLO et al., 2010; LEAL et al., 2007; ANDRADE et al., 2014).

Popularmente conhecida como mussambê, é muito utilizada para problemas respiratórios tais como gripe, asma, bronquite, tosse e tuberculose; otite; mas também como anti-séptico; dor de cabeça; flatulência; febre; inflamações em geral e anti-helmíntico (CASTRO & CAVALCANTE, 2011; MESSIAS et al., 2015). Suas raízes são utilizadas, na forma de garrafada, para infecções do trato geniturinário feminino e a planta toda usada como cicatrizante e digestiva (AGRA et al., 2007; COELHO-FERREIRA, 2009). As partes da planta utilizadas são as flores, folhas, caule ou raízes, na forma de decocção, infusão, lambedores (xaropes) ou tinturas (CARTAXO et al., 2010; MESSIAS et al., 2015).

Dos males citados, pelo qual se destina o uso do mussambê, se destacam as doenças que acometem o sistema respiratório. Uma parte delas é causada por agentes virais e outra parte (sinusite, otite média, pneumonia pneumocócica, amigdalite, faringite, laringite, epiglote e tuberculose) por bactérias, principalmente do gênero *Streptococcus* e *Staphylococcus* (KONEMAN et al., 2008; PERNA et al., 2015; VARGHESE et al., 2017; XIONG et al., 2018).

Um dos exemplos citados, a pneumonia é a principal causa de morte em crianças de até 5 anos de idade e uma das principais causas de internação hospitalar mundialmente. No Brasil, só entre o período de janeiro a agosto de 2018, foram hospitalizados 417.924 pacientes com a doença, gerando um gasto de mais de 378 milhões de reais em serviços hospitalares (SBPT, 2018).

A pneumonia adquirida na comunidade causada por bactérias ocorre mais comumente por *Streptococcus pneumoniae* (cerca de 60% dos casos), mas pode ocorrer também por *Haemophilus influenzae* (10%), *Mycoplasma pneumoniae* (10%), *Chlamydia pneumoniae* (5%) e *Legionella pneumophila* (2%). Já a pneumonia adquirida em ambiente hospitalar ocorre por *Staphylococcus aureus* (20%) seguido de *Streptococcus pneumoniae* (15%) (ROGAN, 2017).

A ação antibacteriana de extratos de plantas é atribuída, principalmente aos flavonoides, taninos, terpenoides e cumarinas (SIMOES et al., 2017). A presença de flavonoides é algo marcante nos estudos com exemplares da família Brassicaceae (família a qual pertenceu o mussambê) (PELOTTO et al., 1998; SHARAF et al., 2000) e do gênero *Cleome* (SHARAF et al., 1997; NASSAR et al., 2003).

Mediante o exposto, no que se refere a etnofarmacologia da espécie apresentada, pressupõe-se que extratos de suas partes aéreas possam apresentar atividade antimicrobiana contra bactérias causadoras de infecções respiratórias, que são consideradas desafiadoras para a saúde pública, já que ocorrem com frequência em regiões tropicais e subtropicais do Brasil, que geram grande número de internações e elevados custos com serviços hospitalares. Além disso, a busca por agentes antimicrobianos, sejam eles de origem natural ou sintética, se faz necessário mediante o aumento do número de cepas multirresistentes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo fitoquímico e antimicrobiano dos extratos das partes aéreas de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos de baixa, média e alta polaridade das partes aéreas de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.;
- Analisar, qualitativamente, as classes de metabólitos secundários contidos nos extratos;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das cepas bacterianas causadores de infecções respiratórias;
- Predizer um possível mecanismo de ação do extrato ativo nas cepas sensíveis à Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo método de permeabilidade membranas;
- Realizar bioautografia dos extratos ativos;
- Quantificar os grupos de metabólitos secundários que apresentarem melhor de atividade no teste de Bioautografia;

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Etnobotânica e Etnofarmacologia**

Etnobotânica, denominação criada em 1895, pelo botânico taxonomista John William Harshberger, é uma ciência que se detém a estudar a interligação do ser humano enquanto sociedade, com as plantas que o cerca, levando em consideração aspectos ecológicos, evolutivos, genéticos, culturais e simbólicos, obtendo-se através disso informações sobre o máximo dos possíveis usos dessas plantas. Essa ligação pode ser estudada tanto de sociedades primitivas quanto das atuais, pelo qual os dados sobre plantas medicinais, alimentícias ou usadas para fins recreativos e manufaturas, são de grande importância para o estabelecimento de uma comunhão saudável entre os seres humanos e os recursos naturais, bem como a biodiversidade (MESSIAS et al., 2015; SALES et al., 2015).

Os dados obtidos pela etnobotânica, pelo qual geralmente geram publicações científicas, se faz necessário tendo em vista que as informações sobre as plantas de uma determinada localidade são repassadas de geração em geração através da comunicação oral, raramente sendo registrada documentalmente, o que faz com que muitas informações venham se perdendo ao longo da história (LEAL et al., 2007; MESSIAS et al., 2015; SALES et al., 2015).

Se tratando das plantas medicinais, os estudos etnobotânicos assumem um papel importante no recolhimento e registro de informações quanto ao manejo dessas plantas, no que diz respeito ao cultivo (quando há), extração, partes da planta utilizada, tipos de preparações, formas de uso e finalidade terapêutica. A partir disto, abre-se caminho para estudos laboratoriais utilizando espécimes da flora medicinal com finalidade de analisar sua toxicidade, perfil químico e efeito farmacológico, na tentativa de se comprovar, ou não, seu uso tradicional, caracterizando dessa forma a etnofarmacologia (CORDEIRO & FELIX, 2014; SALES et al., 2015).

### **3.2 Bioma Caatinga**

Derivado da língua tupi-guarani, o termo caatinga que significa “floresta/mata branca”, faz menção ao fato de que sua vegetação, predominantemente arbustos e árvores de pequeno porte de comportamento decíduo, apresentam seus

caules/troncos de coloração branca e brilhante que se tornam destaque nos períodos de seca quando perdem suas folhas (Figura 1) (LEAL et al., 2003).

Figura 1 – Aspecto da vegetação que deu origem ao nome do bioma.



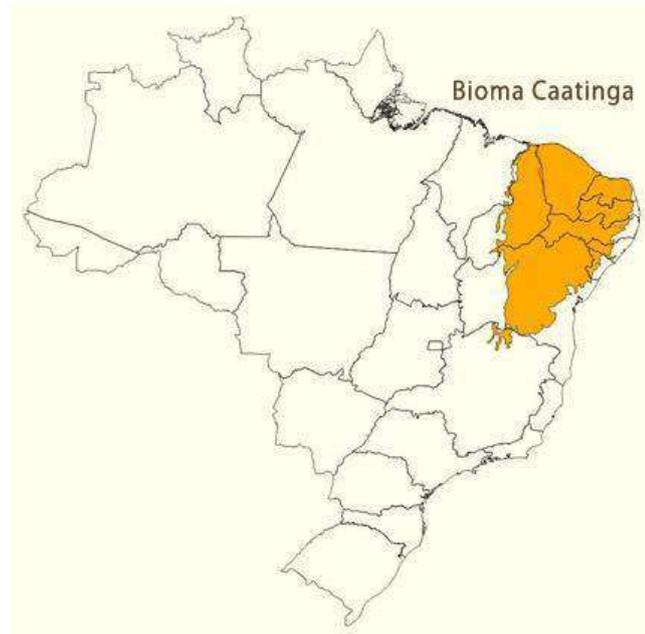
Fonte: ACAATINGA, 2019.

Disponível em :<<https://www.acaatinga.org.br/sobre-a-caatinga/>>. Acesso em: 23.06.2021.

A caatinga é uma região semiárida que se localiza, geograficamente, exclusivamente no nordeste brasileiro (Figura 2), ocupando cerca de 800.000 Km<sup>2</sup> de extensão, equivalente a aproximadamente 10% do território nacional, pelo qual é geralmente dividida em agreste, região leste de transição que devido aos resíduos de umidade advindas do sudeste sofre menos com as secas intensas apresentando períodos de chuvas mais abundantes, e sertão, regiões interiores mais secas apresentando grandes extensões territoriais não cultivadas (LEAL et al., 2003; SOUZA et al., 2015).

Possuindo uma biodiversidade muito vasta, esse bioma se destaca por sua vegetação, contendo uma grande variedade de espécies, que são utilizadas pela população local de diversas formas, sendo uma delas a prática de uso de forma caseira para o tratamento e/ou cura de doenças (SOUZA, et al., 2015). Dentre a flora catingueira se destacam, principalmente, as árvores de pequeno porte e arbustos que, na maioria das vezes, contém espinhos ou acúleos e folhas pequenas (FERNANDES & QUEIROZ, 2018).

Figura 2 – Localização geográfica do Bioma Caatinga.



Fonte: CERAATINGA, 2019.

Disponível em: <<http://www.cerratinga.org.br/caatinga/>>. Acesso em: 23.06.2021.

Existem publicações nas quais mostram o potencial da flora da caatinga com características medicinais (CARTAXO et al., 2010), porém a região caatinga ainda é, entre os biomas brasileiros, a mais desvalorizada, possuindo poucos estudos científicos de suas espécies (RICARDO et al., 2018).

### **3.3 Mussambê: aspectos botânicos**

#### **3.3.1 Família Capparaceae**

Distribuída nas áreas tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul e na região do mediterrâneo, a família Capparaceae compreende em cerca de 50 gêneros dentre os quais contém aproximadamente 700 espécies, reconhecida amplamente por suas plantas se relacionarem com as plantas da família Brassicaceae. Dos 50 gêneros citados, em torno de 9 destes estão presentes no Brasil, contendo 46 espécies (LEAL et al., 2007; PEREIRA et al., 2007).

Apesar de sua ocorrência em locais de clima tropical, nota-se uma adaptação de gêneros e espécies dessa família em regiões sazonalmente secas, estando, por exemplo, como uma das principais famílias do bioma caatinga, tanto por estar

amplamente distribuído pela região quanto pela variedade das espécies (NETO et al., 2014; NETO & JARDIM, 2015).

De forma geral, as plantas da família Capparaceae são árvores e arbustos, podendo raramente ser lianas, na maioria das vezes lenhosos, glabros ou pubescente, contendo ou não estípulas diminutas. As folhas trifoliadas podem se apresentar como simples ou compostas, pecioladas, frequentemente alternas dispostas em espiral ou dísticas, raramente opostas. Inflorescências terminais e/ou laterais, cimosas, corimbosas ou racemosas, compostas de panículas corimbosas terminais ou ramificadas. As flores são vistosas, hipóginas, actinomorfas ou zigomorfas, bissexuadas, diclamídeas ou raramente monoclamídeas. Os frutos carnosos ou secos sem repto, normalmente são bagas ou drupas alongadas, globosos ou linear-cilíndricos a oblongoides, deiscentes ou indeiscentes, contendo de uma a várias sementes, cocleares a reniformes (PEREIRA et al., 2007; NETO et al., 2014; NETO & JARDIM, 2015; CARVALHO et al., 2016).

### 3.3.2 Gêneros *Cleome* e *Tarenaya*

Possuindo cerca de 200 espécies, as plantas do gênero *Cleome* são bem distribuídas territorialmente, ocorrendo por todo o Brasil, tendo preferência por regiões de clima tropical e subtropical, estando com menos frequência em localidades de clima temperado. Normalmente são herbáceas de caráter anual ou perene, raramente de porte arbustivo (CASTRO et al., 2014; AKEMI-BORGES & PIRANI, 2017). Esse gênero já foi tratado como sendo Cleomaceae, uma família separada (NOZOLILLO et al., 2010) e Brassicaceae (LEAL et al., 2007), mas atualmente faz parte família Capparaceae (ANDRADE et al., 2014)

Como mencionado, podem se apresentar como ervas ou arbustos (subarbustos), hirsutos, glanduloso-pubescente ou glabros, espinescente e aculeado ou inermes. Suas folhas contêm de 1 a 13 folíolos e são palmadas. As inflorescências se mostram como corimbo ou racemo, geralmente terminal em que flores isoladas são raras, e possui evidentes brácteas. As flores possuem sépalas livre iguais, frequentemente zigomorfas, pétalas iguais agrupadas reunidas na região superior floral, contém de 6 a 10 estames. Os frutos, contendo profusas sementes, são ceráceos unidas a carpóforos (AKEMI-BORGES & PIRANI, 2017).

O gênero *Tarenaya* compreende 30 espécies, dentre as quais 29 delas estão distribuídas na região Neotropical (Partes da América Central e América do Sul) e 1 presente na África Tropical. Suas espécies se diferenciam muito pouco botanicamente em relação às do gênero *Cleome*. As plantas desse gênero são ervas espinhentas, ocasionalmente escandentes. As folhas contendo de 5 a 9 folíolos são palmadas, possui espinhos derivados de estípulas modificadas. Inflorescências terminais em corimbo ou racemosas, contendo brácteas conspícuas. Suas flores possuem as mesmas características que as do gênero *Cleome*, diferindo apenas no número de estames, que chega a 6. Os frutos também possuem características iguais aos frutos das plantas do gênero *Cleome* (AKEMI-BORGES & PIRANI, 2017; SOARES NETO, 2017).

### 3.3.3 Espécie *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.

Figura 3 – Ilustração botânica de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf., mussambê.



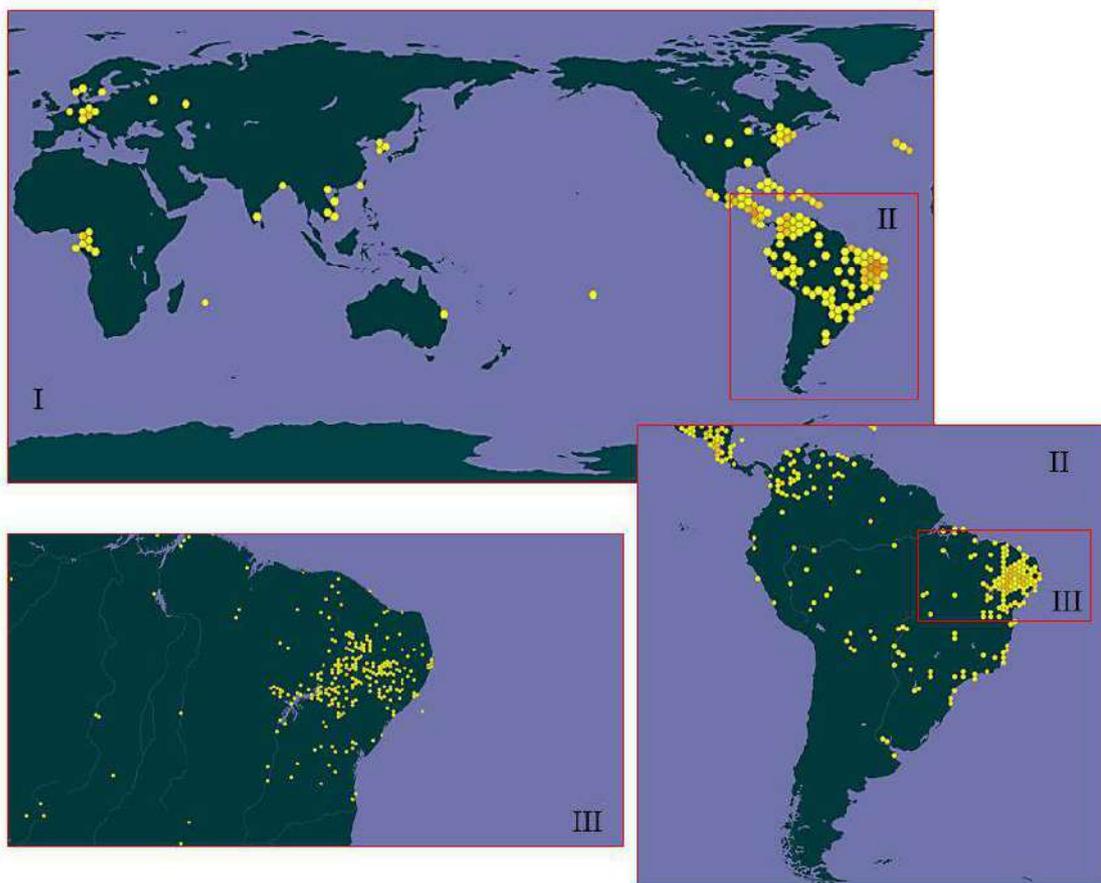
Fonte: SWEETGUM, 2019.

Disponível em: <<http://sweetgum.nybg.org/science/world-flora/monographs-details/?irn=21403>>.

Acesso em: 01.05.2021.

*Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. (Figura 3), é uma espécie herbácea do bioma caatinga, pertencente a família *Capparaceae*, de porte arbustivo, podendo atingir de 1 a 1,8 metros (ANDRADE et al., 2014). Suas folhas são divididas em 5-7 folíolos e suas flores contêm quatro pétalas alvas e seis estames com filetes de cor vinho que desabrocham ao entardecer. Os frutos são longos e finos, contendo cerca de 200 sementes que, por sua vez, têm sabor picante (CASTRO & CAVALCANTE, 2011). A distribuição desta espécie pelo mundo está mostrada na Figura 4.

Figura 4 – Mapa de distribuição da espécie *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. no mundo (I), na América do Sul (II) e na região nordeste do Brasil (III), através da plataforma *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF), entre o período de 1837 – 2021.



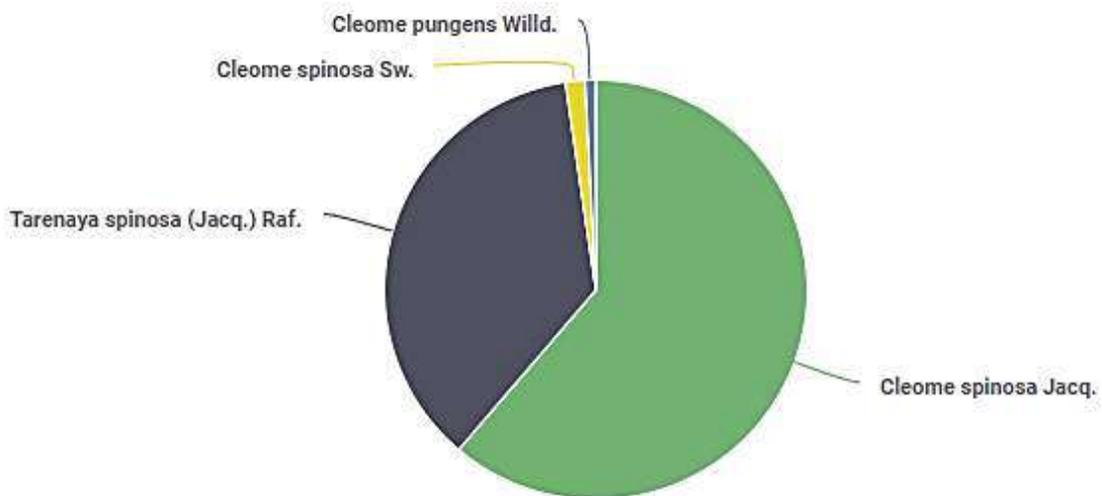
Fonte: GBIF, 2021.

Disponível em: <<https://www.gbif.org/species/3872451>>. Acesso em: 01.05.2021. Modificado pelo autor.

Tem por sinônimo *Cleome hortaborea.*, *Cleome heoutteana* auct., *Cleome pugens* auct., *Cleome spinosa* L., *Cleome spinosa* Jacq. (NOZOLILLO et al., 2010). Os nomes de maior ocorrência para busca dessa planta na plataforma *Global*

*Biodiversity Information Facility* (GBIF) são *Cleome spinosa* Jacq. com 61,2 % seguido de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. com 36,4 %, como mostra a Figura 5.

Figura 5 – Comparativo entre os sinônimos buscados para encontrar informações sobre o mussambê pela plataforma *Global Biodiversity Information Facility* (GBIF).



Fonte: GBIF, 2021.

Disponível em: < <https://www.gbif.org/species/3872451>>. Acesso em: 01.05.2021.

É considerada uma erva daninha, muito presente nas áreas de plantação agrícola. Cresce também, as margens de depósitos naturais de água (açudes, barragens, lagos permanentes ou temporários, barreiros, baixios, entre outros). Conhecida popularmente no Brasil como mussambê, mussambê-de-espinho, sete-marias e flor-de-aranha, sendo esta última denominação usada em referência as vagens que saem de suas flores se assemelharem a pernas de certos tipos de aranhas (JORDHEIM et al., 2009; NOZOLLILO et al., 2010; CASTRO & CAVALCANTE, 2011).

O mussambê é utilizado na medicina tradicional para diversos tipos de doenças como dor de cabeça, flatulência, febre, anti-séptico, anti-inflamatório, cicatrizante, infecções e leucorreia do trato geniturinário feminino e rubefaciente sobre a pele, mas seu principal uso se dá para problemas respiratórios, tais como gripe, tosse, asma, tuberculose, bronquite, sinusite e pneumonia (CABRAL & AGRA, 1998; AGRA et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2007; LEAL et al., 2007; COELHO-FERREIRA, 2009; CASTRO & CAVALCANTE, 2011; MESSIAS et al., 2015; SANTIAGO, 2018; ALBERGARIA, et al., 2019). Todas as partes da planta são utilizadas (flores, folhas,

ramos, raízes) na forma de decocção, infusão, lambedores (xaropes) chás e tinturas (CARTAXO et al., 2010; MESSIAS et al., 2015).

### 3.4 Infecções Respiratórias

As infecções do sistema respiratório, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são aquelas capazes de causar obstrução das vias aéreas tanto superiores quanto inferiores, dificultando o fluxo de ar, variando de infecções agudas a graves (SILVA FILHO et al., 2017). Estima-se que no ano de 1999, 15% das afecções foram causadas por doenças respiratórias mundialmente (CONDE, 2015). A Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia relata que, em um *ranking* de mortes de adultos mundialmente, as infecções respiratórias se encontram em terceiro lugar atualmente, além disso, são as causas mais comuns de doenças pediátricas (SBPT, 2021).

Essas infecções são, geralmente, causadas por vírus ou bactérias, a depender de fatores do próprio microrganismo, do meio ambiente e do hospedeiro (como imunidade e doenças associadas). Quando causada por ação viral, este utiliza mecanismos replicativos na célula hospedeira, causando morte celular (necrose). As lesões causadas, fazem com que microrganismos não patogênicos da própria microbiota, ou microrganismos patogênicos adquiridos, se instalem potencializando a infecção, caracterizando como infecções mistas. Normalmente esses microrganismos secundários são bactérias de caráter oportunista (SILVA FILHO et al., 2017).

O sistema respiratório é dividido anatomicamente em vias aéreas superiores e vias aéreas inferiores. As infecções respiratórias são divididas também, de acordo com o local em que a infecção se instalou, em: Infecções das Vias Aéreas Superiores (IVAS) como rinofaringite, otite média aguda, sinusite aguda, faringite, amigdalite, laringite e laringotraqueobronquite, e Infecções das Vias Aéreas Inferiores (IVAI) como bronquite aguda, bronquiolite, pneumonia e tuberculose (PITREZ & PITREZ, 2003; SILVA FILHO et al., 2017).

### 3.4.1 Infecções da Vias Aéreas Superiores (IVAS)

#### 3.4.1.1 Nasofaringite

É caracterizado como o resfriado comum, geralmente causado por agentes virais, que pode acometer os indivíduos em qualquer época do ano, mas tem sua disseminação com maior frequência nos períodos de outono a inverno em decorrência da baixa umidade do ar pelo qual grande parte dos agentes virais são favorecidos, além de ser um período em que existe agrupamentos de indivíduos em locais fechados (GRIEF, 2013).

A nasofaringite viral pode ser ocasionada por qualquer um dos, aproximadamente, 200 vírus pertencente às seis principais famílias (influenza A, B e C, vírus sincicial respiratório, parainfluenza, coronavírus, adenovírus e rinovírus). Apesar de ser uma infecção que cessa em poucos dias, durando de 7 a 10 dias, e sem necessidade de tratamento medicamentoso, pode evoluir para complicações mais graves como infecções das vias aéreas inferiores (pneumonia por exemplo), otite média, sinusite aguda e hiperatividade brônquica (crise asmática). (GRIEF, 2013)

#### 3.4.1.2 Faringite

A faringite é uma doença inflamatória, caracterizada como uma das doenças respiratórias mais comuns, causada por agentes virais, bacterianos (mais comumente) ou fúngicos (raros casos). Conhecida normalmente como faringite estreptocócica pois, os principais agentes etiológicos bacterianos são os *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos do grupo A, ou seja, o *Streptococcus pyogenes*, correspondendo a cerca de 15% das faringites bacterianas, mas também pode ser causado por *Haemophilus influenzae*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Neisseria gonorrhoeae* (LODHA & KABRA, 2001; GRIEF, 2013; ANJOS et al., 2014; WEBER, 2014; ROGAN, 2017).

Dos indivíduos acometidos pela faringite bacteriana, de 15% a 30% são crianças e de 5% a 15% são adultos. Os sintomas geralmente são dor de garganta (dor faríngea aguda) que está presente em de 1-2 a cada 10 pessoas acometidas, além de disfagia (dificuldade de engolir), febre, exsudato e eritema na faringe posterior, petéquias palatinas, linfadenopatia cervical anterior e úvula edematosa. Se diferencia, diagnosticamente, da faringite viral porque neste caso apresenta rinorreia

(coriza), tosse, rouquidão, conjuntivite e diarreia (LODHA & KABRA, 2001; GRIEF, 2013; ANJOS et al., 2014; WEBER, 2014; ROGAN, 2017).

Quando não tratada tem uma duração que varia de 7 a 10 dias. Quando tratada com medicamentos, normalmente antibioticoterapia, principalmente com antibióticos da classe das penicilinas, diminui consideravelmente o quadro patológico para 24 horas após o início do tratamento, diminuindo assim os sintomas e o aparecimento de complicações. Tais complicações, quando evoluem decorrente de um não tratamento ou de um tratamento inadequado, incluem febre reumática, abscesso periamgdaliano, glomerulonefrite pós-estreptocócica e febre escarlaina (LODHA & KABRA, 2001; GRIEF, 2013; ANJOS et al., 2014; WEBER, 2014; ROGAN, 2017).

#### 3.4.1.3 Laringite

A laringite aguda é uma infecção inflamatória causada principalmente por vírus do grupo parainfluenza do tipo I e II, mas também por influenza A ou B e adenovírus, e mais raramente pela bactéria *Haemophilus influenzae*. Já a laringite crônica é caracterizada como uma infecção inflamatória bacteriana, causada principalmente por *Staphylococcus aureus*, mas também por *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*, com duração de mais ou menos 3 semanas, apresentando sintomas como disfonia (causada por eritema e edema ds cordas vocais), tosse, dor de garganta, pigarro frequente com ou sem disfagia, formação de crostas exudativas e purulência, sintomas esses que não são específicos, já que outras infecções do sistema respiratório superior podem apresentar (GRIEF, 2013; KENDALL & CARPENTER; 2017, ROGAN, 2017; ZHUKHOVITSKAYA & VERMA, 2019).

A estimativa, que não é tão bem estabelecida, mostra que a cada 1000 pessoas 3,47 apresentam laringite crônica ao ano. O tratamento, normalmente direcionado, ocorre por meio de antibioticoterapia. A inflamação da estrutura cartilaginosa da laringe (condrite), pelo qual apresenta secreção purulenta, causada por *Staphylococcus aures*, pode evoluir para uma superinfecção, pelo qual a bactéria desenvolve resistência a meticilina. Ocorre dispneia e disfonia e, pode ser observado, edema supraglótico e estreitamento das vias aéreas que, caso haja o comprometimento, será necessário, além da antibioticoterapia, a realização de traqueostomia e incisões para drenagem de abscessos (quando formado) (GRIEF,

2013; KENDALL & CARPENTER; 2017, ROGAN, 2017; ZHUKHOVITSKAYA & VERMA, 2019).

#### 3.4.1.4 Epiglote

Infecção inflamatória aguda da epiglote e/ou das regiões vizinhas das estruturas supraglóticas como hipofaringe e pregas ariepiglóticas, de origem bacteriana onde seu principal causador é o *Haemophilus influenzae* tipo B, mas que também pode ocorrer por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus pyogenes*, que acomete crianças entre idade de 2 a 6 anos, mas também adultos. Inicialmente, os sintomas são febre e dor de garganta que evoluem rapidamente para disfonia, salivação, estridor (ruído causado ao respirar) e dispneia. Na epiglote, é possível observar em exame clínico por visualização, eritema e edema com projeção para a parte posterior da língua (ROGAN, 2017; BAIRD et al., 2018; DOWDY & CORNELIUS 2020).

Devido o edema, e por ser uma infecção que acomete mais as crianças, pode ser fatal por causar obstrução das vias aéreas e gerar asfixia. É importante acompanhamento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) para o tratamento medicamentoso até que haja uma melhora dos sinais e sintomas. O tratamento deve ser por antibioticoterapia, mediante exame prévio de hemocultura, a base de ampicilina mais cloranfenicol ou unicamente com cefalosporina de terceira geração. Caso necessário, realizar intubação oro ou nasotraqueal ou traqueostomia caso a intubação não se aplique (ROGAN, 2017; BAIRD et al., 2018; DOWDY & CORNELIUS 2020).

#### 3.4.1.5 Sinusite

Infecção que acomete a mucosa dos seios paranasais também chamado de rinosinusite quando acomete concomitantemente as mucosas nasais, que gera processo inflamatório, causado por vírus e bactérias, afetando um a cada sete adultos. É um problema de saúde que gera um custo de aproximadamente 3,4 bilhões de dólares anuais nos Estados Unidos, principalmente com terapia medicamentosa (GRIEFER, 2013; WYLER & MALLON, 2019).

Apresenta todos os sintomas de um resfriado comum acrescido de congestão e secreção nasal, dor facial, tosse e diminuição do olfato, sintomas esses que melhoram após um período de 5 a 7 dias seguido de piora com aparecimento de outros sintomas como febre, dor de cabeça e/ou secreção nasal purulenta. Pode apresentar também, halitose, dor nos dentes e maxilar, dor no rosto e sensibilidade unilateral dos seios maxilares (GRIEFER, 2013; ROGAN, 2017).

A duração dos sintomas por menos que quatro semanas caracteriza como sinusite aguda. Entre quatro e doze é chamada de sinusite subaguda. A sinusite crônica tem seus sintomas persistentes por mais de doze semanas. Sinusite recorrente é aquela em que há pelo menos quatro episódios por ano, onde os sintomas não são persistentes entre os citados episódios (GRIEFER, 2013; ROGAN, 2017; FABRE, et al., 2018; WYLER & MALLON, 2019).

Quando ocorre de origem bacteriana, os principais causadores são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* e *Staphylococcus aureus*. Para esses casos, a terapia medicamentosa ocorre com uso de antibióticos e anti-inflamatórios esteroidais que, se não tratado ou feito de forma incorreta pode ocasionar complicações graves intracraniana, com casos de meningite, abscesso orbital e empiemas, vasculares com casos de trombose séptica do seio cavernoso e isquemia cerebral, além de osteomielite (GRIEFER, 2013; ROGAN, 2017; FABRE, et al., 2018; WYLER & MALLON, 2019).

#### 3.4.1.6 Otite média

A otite média é uma inflamação do ouvido médio, que pode ser de origem infecciosa ou não e pode apresentar as formas aguda ou crônica, com presença de fluido. A forma aguda é a mais comum e sua patogenia, multifatorial, pode envolver disfunção anatômica (tubos auditivos), viral, fatores genéticos e ambientais e bacteriano. A otite média aguda bacteriana ocorre quando bactérias que colonizam a região nasofaríngea como *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* e *Haemophilus influenzae*, conseguem migrar para o ouvido médio, causando a inflamação (COLEMAN & CERVIN, 2018; VANESTE & PAGE, 2019).

É uma inflamação que acomete geralmente crianças, mas pode acontecer em adultos, de regiões em desenvolvimento e também indígenas, sendo registrado cerca de 709 milhões de casos anuais, geralmente sem complicações, mas quando ocorre,

pode gerara sequelas e levar o paciente a óbito por complicações. Cerca de 21000 casos de mortes são registrados por ano. As sequelas incluem mastoidite (infecção do osso mastoide), meningite, colesteatoma (inflamação da tuba auditiva), trombose do seio lateral, abscesso cerebral e perda auditiva que pode afetar diretamente na fala do indivíduo. Normalmente guarda-se, de forma assistida, a infecção cessar, mas quando não, o tratamento ocorre com antibioticoterapia e, em alguns casos, cirurgia (COLEMAN & CERVIN, 2018; VANESTE & PAGE, 2019).

### 3.4.2 Infecções das Vias Aéreas Inferiores (IVAI)

#### 3.4.2.1 Bronquite

Bronquite é uma infecção inflamatória aguda ou crônica (quando afeta pessoas acima de 45 anos de idade) que acomete as vias aéreas inferiores, mais especificamente os brônquios. É causada principalmente por agente virais como coronavírus, influenza (A e B) e para influenza, rinovírus e vírus sincicial respiratório, mas também por agentes bacterianos como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Branhamella catarrhalis*, sendo esta última uma bactéria oportunista que se desenvolve em pacientes fumantes ou que apresentam preexistente doença cardiopulmonar (ALBERT, 2010; KINKADE & LONG, 2016; OVERSIKT, 2017; ROGAN, 2017).

Considerado como um dos diagnósticos mais comuns nos atendimentos de atenção básica e emergência, apresenta sintomas como tosse, com ou sem expectoração purulenta, associado a sintomas de infecções das vias aéreas superiores e, menos comumente, com aparecimento de febre alta ou persistente. Pode apresentar, também, queimação ou desconforto subesternal com silibo (som agudo característico de constricção dos brônquios) e ronquidão. Se difere da pneumonia pela ausência de sinais e sintomas em exames torácicos, como radiografia (ALBERT, 2010; KINKADE & LONG, 2016; OVERSIKT, 2017; ROGAN, 2017).

Não existe um tratamento específico, já que é muito comum ser de origem viral, não sendo recomendado antibioticoterapia, ressalvo os casos que o agente etiológico bacteriano tenha sido diagnosticado. Normalmente, o tratamento ocorre para os sinais e sintomas como o uso de analgésicos, antipiréticos, expectorantes para os casos de secreção purulenta e espessa e aumento da hidratação (ALBERT, 2010; KINKADE & LONG, 2016; OVERSIKT, 2017; ROGAN, 2017).

### 3.4.2.2 Pneumonia

A pneumonia é uma infecção inflamatória do parênquima pulmonar, elencada como a sexta doença infecciosa letais mais comum nos Estados Unidos e a principal causa de morte em crianças de até 5 anos de idade e uma das principais causas de internação hospitalar anualmente no mundo, principalmente acometendo indivíduos de países em desenvolvimento. No Brasil, só entre o período de janeiro a agosto de 2018, foram hospitalizados 417.924 pacientes com a doença, gerando um total de mais de 378 milhões de reais em serviços hospitalares (REYNOLDS, 2010; KOLEK, 2017; MUSHER, ABERS & BARTLETT, 2017; ROGAN, 2017; SBPT, 2018).

A pneumonia pode ser classificada de várias formas. Quando se refere ao local anatômico afetado é chamada de pneumonia lobar, quando afeta um único lobo pulmonar, ou broncopneumonia, quando acomete mais de um lobo e atinge os brônquios e bronquíolos. Pelo agente etiológico pode ser chamada de pneumonia bacteriana, fúngica, viral, alérgica, química, atípica e pneumonia causada por radiação. Além dessas, a forma mais comum de classificar a pneumonia é pelo local pelo qual o agente etiológico foi transmitido, sendo Pneumonia Adquirida na Comunidade (PAC) e Pneumonia Adquirida em Hospital, sendo chamada também de pneumonia nosocomial (REYNOLDS, 2010; KOLEK, 2017; MUSHER, ABERS & BARTLETT, 2017; ROGAN, 2017; SBPT, 2018).

A PAC é aquela em que a 14 dias anteriores o paciente não tenha sido hospitalizado ou que não resida em instituições de cuidados não hospitalares (casas de repouso, por exemplo). Nos Estados Unidos ocorrem cerca de 4 milhões de casos desse tipo de pneumonia pelo qual, desses, 800.000 necessitam de internação hospitalar. A pneumonia nosocomial, ocorre em 48 horas após admissão hospitalar e nos casos de paciente internados em UTI que podem adquirir microrganismos através da ventilação, pelo qual é chamado de Pneumonia Associada ao Ventilador (PAV) (REYNOLDS, 2010; KOLEK, 2017; MUSHER, ABERS & BARTLETT, 2017; ROGAN, 2017; SBPT, 2018).

A pneumonia adquirida na comunidade causada por bactérias ocorre mais comumente por *Streptococcus pneumoniae* (cerca de 60% dos casos), mas pode ocorrer também por *Haemophilus influenzae* (10%), *Mycoplasma pneumoniae* (10%), *Chlamydia pneumoniae* (5%), *S. aureus* (3%) e *Legionella pneumophila* (2%). Já a pneumonia adquirida em ambiente hospitalar ocorre, 50% dos casos, por gram

negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii* e o restante dos casos por gram positivas como *Staphylococcus aureus* (20%) seguido de *Streptococcus pneumoniae* (15%) (OLIVEIRA, 2007; MARTINEZ et al., 2016; CAMPOS et al. 2016; JUNG et al., 2017; ROGAN, 2017; MAURICE et al., 2018; CIGINSKIENE et al., 2019; COMBE et al., 2019).

### 3.5 Metabólitos Secundários Com Atividade Antimicrobiana

Uma substância antimicrobiana ou antibiótico, é aquela que em concentrações pequenas deve ser capaz de inibir ou matar microrganismos, podendo ser de origem natural ou sintética (SÁEZ-LLORENS et al, 2000). Em relação aos antimicrobianos de origem natural, sabe-se que os metabólitos secundários apresentam um bom potencial. Foi publicado em 1999 por Cowan, os principais metabólitos secundários antimicrobianos onde, dentre eles, se encontram os flavonoides, taninos e cumarinas (que fazem partes dos fenilpropanoides) e os terpenoides (Figura 6) (COWAN, 1999).

Figura 6: Fluxograma da rota biossintética dos fenilpropanoides e terpenoides.



\*DXPS: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato

Fonte: adaptado de Simões (2017).

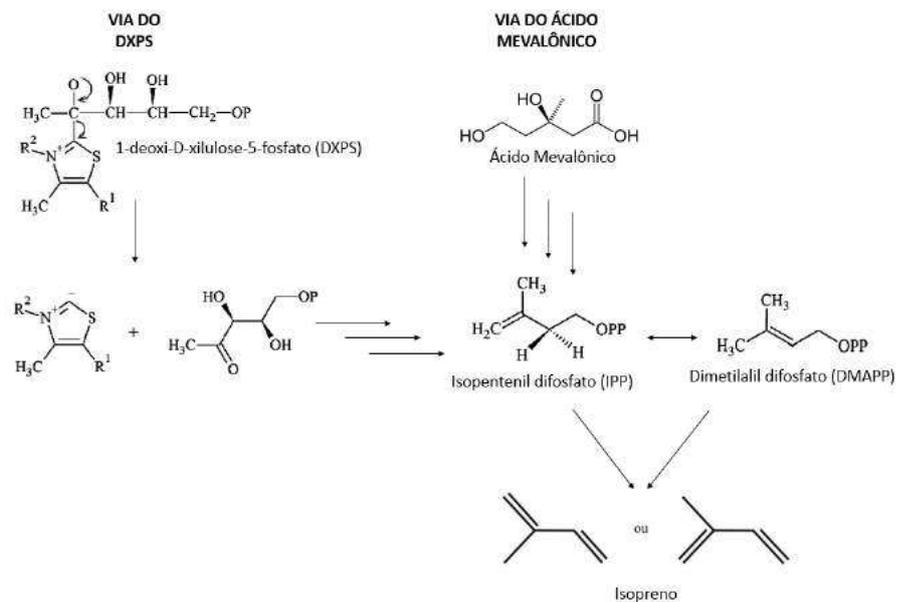
Os terpenoides são hidrocarbonetos, de característica lipofílica, derivado do isopreno-2-metil-1,3-butadieno, ou simplesmente isopreno a partir da rota biossintética do ácido mevalônico (mevalonato). A nomenclatura dos terpenóides

ocorre de acordo com a quantidade de carbonos, ou seja, a quantidade de unidades de isopreno de sua estrutura sendo monoterpeneo (duas unidades de isopreno, 10 C), sesquiterpenos (três unidades de isopreno, 15 C), diterpenos (quatro unidades de isopreno, 20 C), sesquiterpenos (cinco unidades de isopreno, 25 C), triterpenos (seis unidades de isopreno, 30 C), tertaterpenos (oito unidades de isopreno, 40 C) e politerpenos (acima de oito unidades de isopreno, mais de 40 C). Os esteroides são triterpenos que apresentam uma estrutura química característica muito marcante que é o ciclopentanoperidrofenantreno (SIMÕES, 2017; SILVA, 2018; NOGUEIRA, 2019).

De forma resumida, o acetil-CoA formado a partir da glicólise pode seguir a via do mevalonato ou a via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) para formar unidades de IPP (isopentenil difosfato) e DMAP (dimetilalil difosfato) (Figura 7). Essas unidades, por sua vez, se combinam em reação de condensação do tipo cabeça-cauda dando início assim a formação dos terpenoides (SIMÕES, 2017; SILVA, 2018; NOGUEIRA, 2019).

O fenilpropanóides são compostos aromáticos, formados pela via do Ácido Chiquímico (chiquimato). O nome fenilpropanóides se deve a sua estrutura básica é formada por um anel aromático com uma cadeia carbônica lateral (fenilpropano) ou por um fenol também com cadeia carbônica lateral (fenolpropano) (SIMÕES, 2017; SILVA, 2018; NOGUEIRA, 2019).

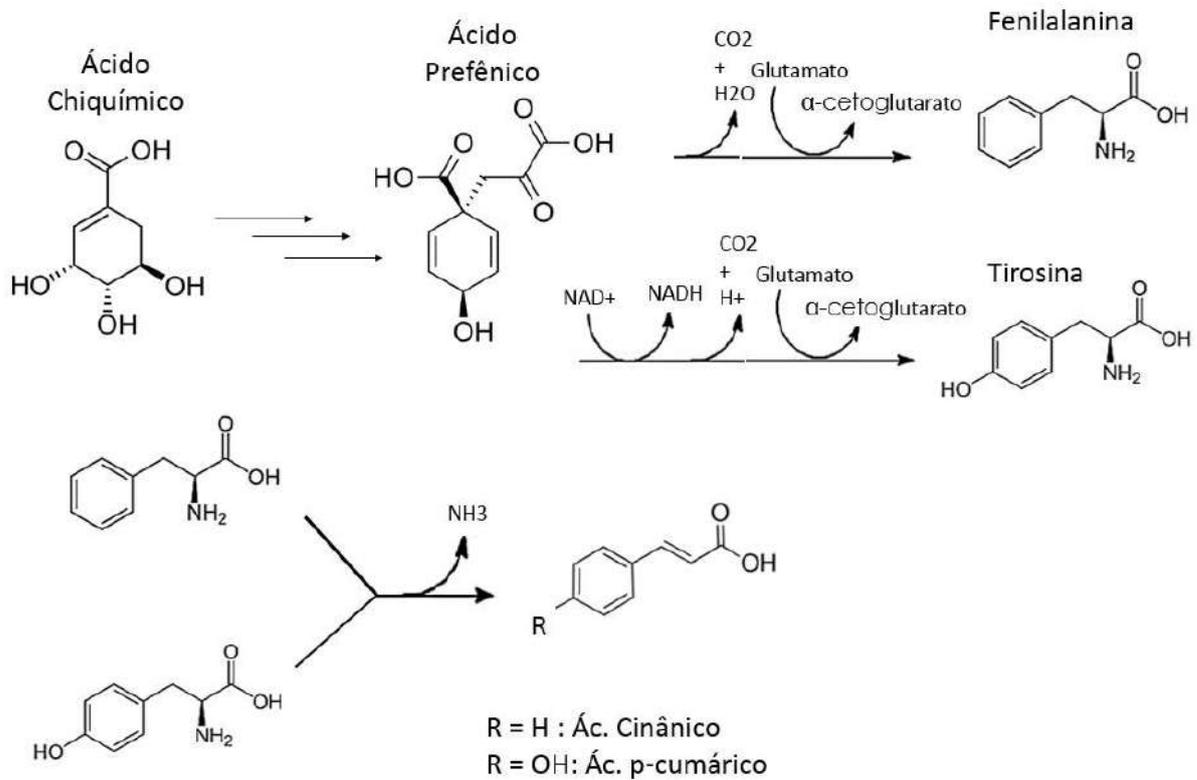
Figura 7: Esquema das vias biossintéticas, resumidas, para a formação de terpenoides.



Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Os fenilpropanóides são formados a partir da ácido chiquímico que passa por várias etapas químicas e enzimáticas para formar os aminoácidos fenilalanina e tirosina. Estes, por sua vez, passam por uma etapa de desaminação, dando origem aos ácidos cinâmico e p-cumárico (Figura 8) que são esqueleto básico para a formação de metabólitos secundários grandemente conhecidos (SIMÕES, 2017; SILVA, 2018; NOGUEIRA, 2019).

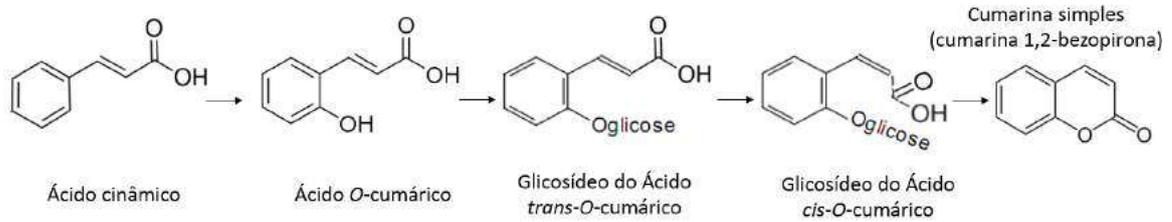
Figura 8: Esquema da via biossintética, resumida, para a formação de fenilpropanóides.



Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Dentre os fenilpropanóides com ação antimicrobiana os mais citados e conhecidos são as cumarinas, os flavonoides e os taninos condensados. As cumarinas são formadas a partir do ácido cinâmico que passa por uma etapa de oxidação, ligação com glicose, isomerização e ciclização, formando a cumarina básica (cumarina 1,2-benzopirona) (Figura 9) que, a partir desta, podem ser gerado os mais diversos derivados (CUNHA, 2005; SIMÕES, 2017; SILVA, 2018; NOGUEIRA, 2019).

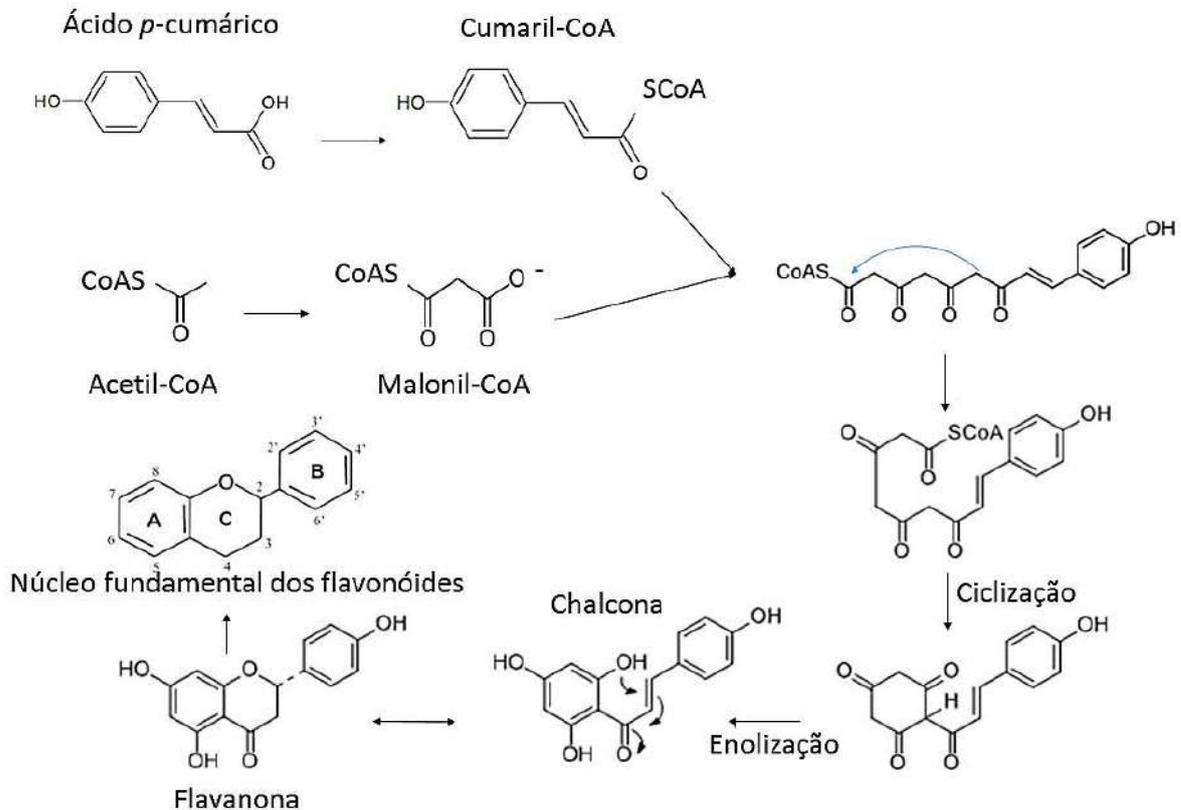
Figura 9: Esquema de síntese de cumarina simples.



Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Os flavonoides são formados a partir de derivados de duas vias diferentes: a via do ácido chiquímico e a via do acetil-CoA. O ácido *p*-cumárico, formado na via do chiquimato, forma ligação com o acetil-CoA, gerando o cumaril-CoA. Este agora, faz ligação com uma tricetona-CoA formada pela união de 3 unidades de malonil-CoA um derivado do acetil-CoA pela ação de uma carboxilase. O composto formado sofre ciclização seguido de enolização e nova ciclização, originando a flavanona que contém o núcleo básico dos flavonoides (Figura 10) (CUNHA, 2005; SIMÕES, 2017).

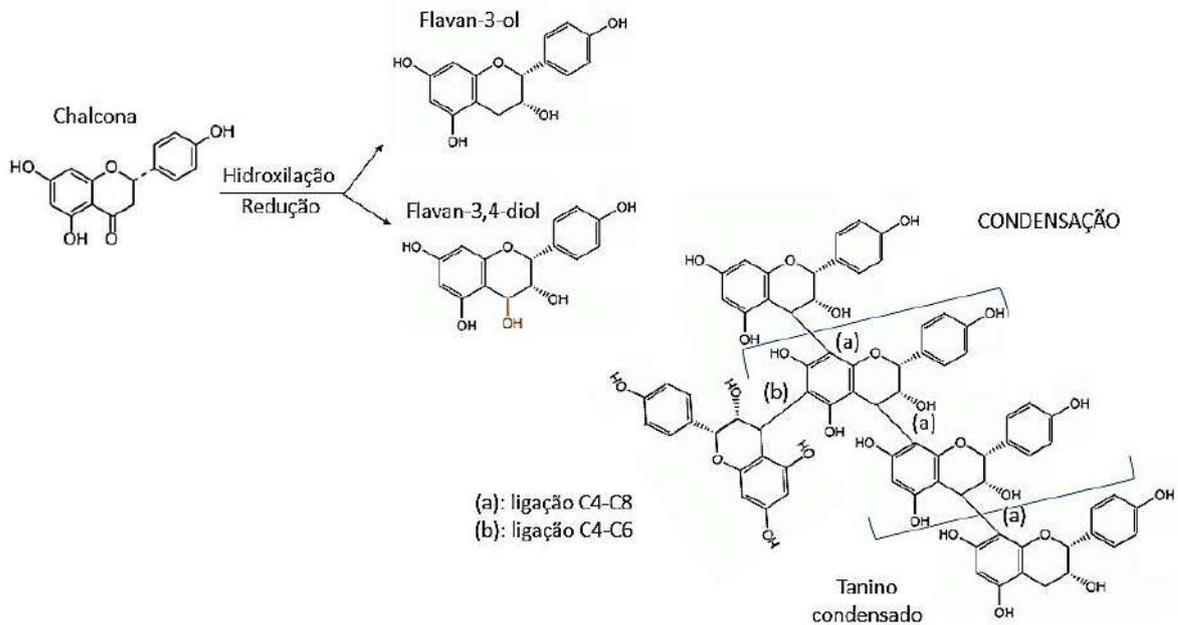
Figura 10: Esquema da via biossintética, resumida, dos flavonoides.



Fonte: elaborada pelo autor (2021).

A chalcona formada dá origem aos mais diversos tipos de flavonoides. Quando sofre processos de hidroxilação/redução forma os flavonoides flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Estes, por sua vez, são os responsáveis pela biossíntese dos taninos condensados que, como o próprio nome sugere, são oligômeros ou polímeros que ocorre através de condensação pela ligação C-C entre carbono C4 do anel C da subunidade superior com C8 do anel A da subunidade inferior ou C4 do anel C da subunidade superior com C6 do anel A da subunidade inferior, porém menos frequentes (Figura 11) (CUNHA, 2005; SIMÕES, 2017).

Figura 11: Representação dos taninos condensados.



Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Pela complexa mistura de metabólitos secundários contido em um único extrato vegetal, estes podem atuar simultaneamente em mais de um mecanismo de ação, podendo atuar de forma sinérgica ao efeito esperado. São conhecidos diversos mecanismos de ação dos terpenoides e fenilpropanoides na atividade antimicrobiana. Devido à característica lipofílica dos terpenoides, estes agem mais a nível de membrana plasmática, já os fenilpropanoides, que apresentam tanto características lipofílicas quanto hidrofílicas, podem agir a nível de membranas mais também a nível de citoplasma (YANG, KHAN & KANG, 2015; ZHANG, 2017; SILVA, 2018; NOGUEIRA, 2019).

Na membrana plasmática esses compostos podem se inserir e formar espaços entre os fosfolípidios, interagir com proteínas membranares e na parede celular pode causar sua integridade estrutural, todas elas alterando a permeabilidade seletiva, fazendo com que o conteúdo intracelular extravase, ocasionando lise celular. Em nível citoplasmático, esses metabólitos secundários podem agir causando modificações no DNA/RNA, nas concentrações de ATP, no pH intracelular, além de interagir com proteínas e enzimas, fazendo com que ocorra estase das reações bioquímicas ou morte da célula. Pode atuar também na quiosmose, que é a troca prótons do meio intra e extracelular, que atuam na respiração celular bacteriana (YANG, KHAN & KANG, 2015; ZHANG, 2017; SILVA, 2018; NOGUEIRA, 2019; TEIXEIRA et al, 2020).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal

A realização da coleta das partes aéreas de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. (Figura 12) foi realizada no mês de janeiro de 2019, no período da manhã, no Sítio Malhada de Pedra, município de Caruaru – PE (Coo. dms; 8° 14' 24.662" S 35° 55' 15.85" W “) com o auxílio de tesoura de poda.

Um exemplar foi preparado para a realização da exsicata, depositada no Herbário Dárdano de Andrade Lima, no IPA, identificada pela botânica Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia, sob o número de registro 92023.

Figura 12: *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. (A) e suas partes aéreas (B: folhas, C: inflorescências, D: Flor).



Fonte: autor (2021).

## 4.2 Obtenção dos extratos

A droga vegetal coletada foi lavada rapidamente e submetida ao processo de secagem por 24 horas à sombra e em estufa de ar quente circulante, à temperatura de 50° C, até perda de cerca de aproximadamente 95 % da umidade. Após secagem, esta foi triturada em moinho de facas vertical (moinho de facas industrial) e pesada. Do pó obtido, pesou-se 200g ao qual foi submetido a extração por esgotamento, por maceração, em solventes de polaridade crescente. Inicialmente usou-se hexano, seguido por acetato de etila e por fim com metanol, gerando três extratos diferentes (separados).

Os macerados foram recolhidos em um só, separados de acordo com suas polaridades, e rota-evaporados sob baixa pressão à 45° C para eliminação do máximo de solvente. O concentrado resultante foi colocado em dessecador para eliminação de resquícios de umidade, atingindo um concentrado máximo, obtendo-se os extratos secos (extrato seco hexânico, extrato seco de acetato de etila e extrato seco metanólico).

## 4.3 Rendimento

Ocorreu de acordo com Rodrigues et al., 2011, a partir do seguinte cálculo:

$$\text{Re} = \frac{\text{P.Ex.Seco}}{\text{P.D.V.P.M}} \times 100$$

**Re:** Rendimento (%)

**P.Ex.Seco:** Peso do extrato Seco

**P.D.V.P.M:** Peso da Droga Vegetal Pulverizada Macerada

## 4.4 Triagem Fitoquímica Qualitativa

Foi analisado o perfil fitoquímico, de forma preliminar, dos extratos secos obtidos das partes aéreas de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf., por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), utilizando-se sistemas eluentes e reveladores de acordo com cada classe metabólica pesquisada, descrita no Quadro 1.

Quadro 1: Sistemas eluentes e reagentes reveladores correspondentes aos metabólitos secundários investigados.

<b>GRUPO METABÓLITO</b>	<b>SISTEMA ELUENTE</b>	<b>PADRÕES</b>	<b>REVELADOR</b>	<b>DETECÇÃO</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
<i>Alcaloides</i>	Tolueno:acetato de etila:dietilamina (70:20:10)	Quinina/ Ioimbina	Dragendorff	UV-Vis	WAGNER, 1996
<i>Antocinanas</i>	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Azul de metileno	Sem revelador	UV-Vis	WAGNER, 1996
<i>Compostos fenólicos</i>	Clorofórmio:ácido acético:metanol:água (60:32:12:8)	Rutina	NEU	UV-365	WAKSMUNDZKA-HAJNOS, SHERMA, KOWALSKA, 2008
<i>Cumarinas</i>	Tolueno:éter (1:1 saturado com ácido acético 10%)	Cumarina	KOH/EtOH 10%	UV-365	WAGNER, 1996
<i>Derivados antracênicos</i>	Acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10)	Aloína	KOH/EtOH 10%	UV-Vis/UV-365	WAGNER, 1996
<i>Iridoides</i>	Clorofórmio:metanol:água (60:40:4)	D-frutose/sacarose	Anisaldeído Sulfúrico	UV-Vis/UV-365	WAGNER, 1996

<i>Mono, sesqui e diterpenos</i>	Tolueno:acetato de etila (93:7)	Carvacrol	Vanilina Sulfúrica	UV-Vis	WAGNER, 1996
<i>Naftoquinonas</i>	Tolueno:ácido fórmico (99:1)	Lapachol	KOH/EtOH 10%	UV-Vis/UV-365	WAGNER, 1996
<i>Saponinas</i>	Clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8)	Saponina	Anisaldeído Sulfúrico	UV-Vis/UV-365	WAGNER, 1996
<i>Triterpenos e esteroides</i>	Tolueno:clorofórmio:etanol (40:40:10)	Estigmasterol	Lieberman-Burchard	UV-Vis/UV-365	WAGNER, 1996
<i>Xantinas</i>	Acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10)	Cafeína	Iodo-KI-HCl	UV-Vis	WAGNER, 1996

Fonte: elaborado pelo autor (2021)

Legenda: UV-Vis: ultravioleta visível; UV-365: Ultravioleta 365 nm; KOH/EtOH 10%: Hidróxido de potássio etanólico a 10%; Iodo-KI-HCl: iodo-iodeto de potássio-ácido clorídrico.

## 4.5 Atividade antimicrobiana

### 4.5.1 Microrganismos

Foram utilizadas 10 bactérias, sendo 4 Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*) e 6 Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli*), sendo a *S. aureus* ATCC 6538, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 19429 e *Escherichia coli* ATCC 8739, cedidas da coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas do controle de qualidade da HEBRON – INDÚSTRIA QUÍMICA, situada na cidade de Caruaru – PE, e as demais, UFPEDA e ATCC, foram cedidos pela coleção do Laboratório de Análises Microbiológicas (LAM), Recife-PE. As cepas e suas descrições estão demonstradas no Quadro 2.

Quadro 2: Cepas bacterianas utilizadas nos experimentos.

<b>CEPAS BACTERIANAS</b>	<b>GRAM</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>ORIGEM</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> *	+	CIR 01	ATCC 6538
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	CIR 02	ATCC 2943
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	CIR 03	UFPEDA 1031 B
<i>Streptococcus pyogenes</i>	+	CIR 04	UFPEDA 1033 B
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	CIR 05	ATCC 700603
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	CIR 06	UFPEDA 1020A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	-	CIR 07	ATCC 19429
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	CIR 08	ATCC 49606
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	CIR 09	UFPEDA 1024 B
<i>Escherichia coli</i> *	-	CIR 10	ATCC 8739

Fonte: elaborado pelo autor (2021)

Legenda = +: Gram-positiva; -: Gram-negativa; CIR: Cepas de Infecções Respiratórias; ATCC: American Type Culture Collection; \*: cepas cedidas pela HEBROM; UFPEDA: Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos.

### 4.5.2 Preparação dos inóculos

Após reativadas em ágar Mueller Hinton, foram preparadas suspensões com as cepas em solução fisiológica, ajustada à turvação da escala 0,5 de McFarland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Essa suspensão foi diluída até a concentração de  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL, como preconiza o documento do CLSI (2010).

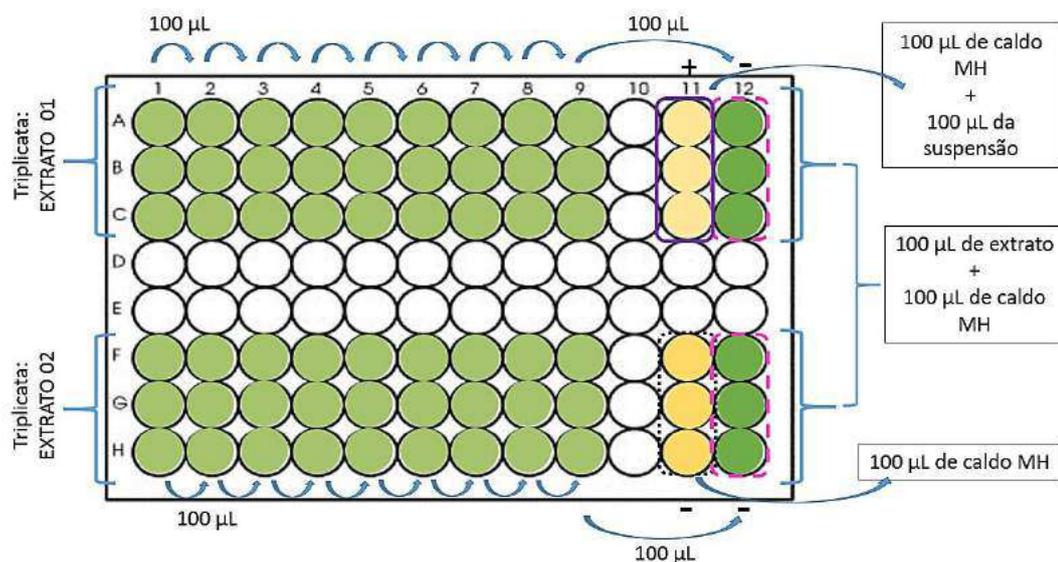
### 4.5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi realizada pela técnica de microdiluição em placa de 96 poços estéreis, de acordo com metodologia de Rodrigues (2013) baseada nas recomendações da CLSI (2010). Inicialmente foi pesado 20 mg de cada extrato seco e solubilizado em 5 mL de uma mistura de DMSO (dimetil sulfoxido 10%)/Tween 80%/água estéril (1:1:8), obtendo-se uma solução mãe de 4000 µg/mL.

Inicialmente todos os poços das linhas A, B, C, F, G e H foram preenchidas com 100 µL de caldo Mueller Hinton. Em seguida, foi realizado a microdiluição do extrato diretamente nos poços, do 1º ao 10º poço, sendo os 100 µL que seriam desprezados, transferidos ao 12º poço (extrato mais caldo), sendo utilizado como controle negativo, indicando esterilidade do extrato. O mesmo ocorreu com as linhas B, C, para o primeiro extrato (triplicata) e nas linhas F, G e H para o segundo extrato.

Em outra placa as 3 primeiras linhas ficaram destinadas ao terceiro extrato e as 3 últimas ao padrão. No 1º poço a concentração do extrato foi de 2000 µg/mL, desta forma seguiu-se a diluição obtendo-se as concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,90 µg/mL. O padrão utilizado foi a gentamicina, na concentração inicial, no 1º poço, de 1.024 µg/mL, obtendo-se concentrações de 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4 e 2µg/mL.

Figura 13: Representação da microdiluição em placa para a técnica de CIM.



Fonte: elaborada pelo autor (2021).

Nos poços da coluna 11 das linhas A, B e C, foram colocados 100 µL do caldo Mueller Hinton, sem extrato, mais 10 µL da suspensão bacteriana (caldo mais cepas) servindo de controle positivo. Nos poços da coluna 11 das linhas F, G e H, que contém só o caldo Mueller Hinton, serviu como controle negativo, indicando a esterilidade do caldo. Em todos os poços da microdiluição foram acrescentados 10 µL das suspensões bacterianas testadas. Foram utilizadas 2 placas para cada cepa. A representação da microdiluição é mostrada na Figura 13.

As placas, em seguida, foram então incubadas em estufa bacteriológica de crescimento a uma temperatura de 35 – 37°C por um período de 24 h. Após esse período, foram adicionados 30 µL de solução aquosa de resazurina (0,01 %), como revelador, e incubadas por um período de 2 a 4 horas. Descoberta por Weselsky em 1945, a resazurina é um corante, atóxico para as células, muito utilizado para testes antimicrobianos para a avaliação da viabilidade celular, pelo qual apresenta cor azul em solução aquosa e, ao passar por processos de redução, geralmente através de enzimas mitocondriais, microssomais ou da cadeia respiratória, resulta na formação da resorufina, de cor rosa (Figura 14) (Castro, 2017). A leitura foi realizada observando-se os poços em que permaneceram com a coloração azul, evidenciando que não houve conversão da resazurina em resorufina, indicando inviabilidade celular.

Figura 14: Redução de resazurina em resorufina.



Fonte: elaborada pelo autor (2021).

#### 4.5.4 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O conteúdo dos poços da concentração onde houver inibição de crescimento microbiano na técnica de CIM, foi semeado em placa de petri contendo ágar Mueller Hinton, com o auxílio de alça descartável de 10 µL, e incubadas por 24 h a 37° C pelo qual foi observado a formação ou não de colônias. A CBM foi caracterizada pela

formação, ou não, de colônias bacterianas, caracterizando o extrato como bactericida ou bacteriostático.

#### 4.5.5 Ensaio de Permeabilidade Membranar – Cristal Violeta.

Realizado de acordo com a metodologia de Davi e colaboradores (2010) e Nogueira (2019), com pequenas adaptações. Foram preparadas suspensões em caldo BHI, dos microrganismos sensíveis ao extrato de mussambê no ensaio de CIM, na escala 0,5 de McFarland, pelas quais foram incubadas em estufa de crescimento microbiológico por 24 h a uma temperatura de 37 °C. Destas suspensões, foi transferido 1 mL para eppendorf's, de capacidade para 1,5 mL, e centrifugado por 5 min em centrífuga minispin a 3.600 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* bacteriano foi lavado duas vezes com solução tampão PBS (pH 7,4). Em seguida, o pellet foi ressuspenso em 950 µL de PBS mais 50 µL do extrato de acetato de etila em solução 2x CIM de acordo com cada cepa sensível e incubado por 1 h em estufa a 37 °C. Passado o tempo, centrifugou-se a 9.300 rpm por 5 min, desprezou-se o sobrenadante e foi acrescentado 1,5 mL de solução de cristal violeta em PBS (10 µg/mL) e incubadas novamente em estufa a 37 °C por 10 min. Centrifugou-se a 13.400 rpm por 15 min, transferiu-se o sobrenadante (1,5 mL) para um tubo de ensaio contendo 1,5 mL de PBS, homogeneizou-se para a realização da leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 590 nm (DAVI et al., 2010).

Como controle positivo, realizou-se as mesmas etapas anteriores usando-se uma solução de EDTA 0,25M, em substituição ao extrato. Como controle negativo, realizou-se as etapas anteriores, porém, após a etapa de lavagem duas vezes com PBS seguiu-se para a etapa em que foi adicionado a solução de cristal violeta, dando sequência ao teste. Como padrão de comparação, foi colocado em um tubo de ensaio 1,5 mL da solução de cristal violeta mais 1,5 mL de PBS, homogeneizou-se e realizou-se a leitura em espectrofotômetro, pelo qual a absorbância foi considerada como equivalente a 100 % da presença do cristal violeta. Em todos os casos, foi feito o teste em triplicata.

Após obtenção das absorvâncias, foi considerado como o percentual de cristal violeta livre, ou seja, aqueles que não foram absorvidos pelas bactérias, através da realização da seguinte fórmula:

$$\text{CV livre (\%)} = \frac{\text{ABS amostra}}{\text{ABS da solução de CV}} \times 100$$

Onde:

CV = Cristal Violeta

ABS = Absorvância

O percentual de cristal violeta absorvido foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{CV absorvido (\%)} = 100 - \text{CV livre (\%)}$$

## 4.6 Bioautografia

O teste de bioautografia avalia, qualitativamente, se um extrato apresenta atividade antimicrobiana ou quais classes fitoquímicas de um extrato previamente avaliado que apresenta atividade antimicrobiana, podendo ser usado como um teste preliminar que avalia o potencial antimicrobiano de matrizes ou servir como direcionamento para o isolamento de compostos específicos responsáveis por essa atividade.

Este teste foi realizado de acordo com a metodologia de Cabral (2008), no qual consiste em avaliar quais metabólitos secundários apresentam atividade biológica. Neste caso, o teste foi realizado com o extrato ativo, bem como as cepas sensíveis a este, após os resultados da CIM e CBM.

### 4.6.1 Confeção das Placas de CCD (Cromatografia em Camada Delgada)

Foi utilizado placas de sílica gel que, após ativadas em estufa de secagem a 100-110 °C por 60 min, foram cortadas nas mesmas dimensões e foram feitos pontos de aplicação do extrato na mesma distância em todas elas, como forma de padronização.

Foi preparado também, uma placa controle onde foi aplicado tanto o extrato quanto os compostos padrões dos metabólitos secundários analisados, interpretadas de acordo com o Quadro 1. A concentração do extrato ativo, e dos padrões, foram padronizadas em 1mg/mL de extrato seco dissolvido em metanol (p/v) e o volume de aplicação foi de 25 µl por ponto de aplicação.

#### 4.6.2 Preparação dos Inóculos

As cepas sensíveis ao extrato mais ativo, foram semeadas em ágar Mueller Hinton por 24 h. Após esse período as bactérias foram suspensas em solução salina 0,89 % estéril na concentração equivalente a escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Estas suspensões foram diluídas 1:10 em ágar BHI fundido e estéril a uma temperatura entre 45 – 50°C.

#### 4.6.3 Procedimento

As placas cromatográficas após eluídas ficaram exposta a temperatura ambiente por 1 hora e em seguida secas por 15 min em estufa de secagem a 40°C, para eliminação dos solventes da fase móvel. Estas foram acomodadas em placas de petri e a suspensão bacteriana do ágar BHI vertida sobre. Após solidificação do meio, estas foram incubadas por 24 h em estufa de crescimento a uma temperatura de 37 °C. A revelação ocorreu borrifando nas placas uma solução hidroalcoólica de INT (*iodonitrotetrazolium chloride*) a 2mg/mL em álcool 70% (p/v) e incubadas por mais 4 h. A formação de halo de inibição do crescimento microbiano em volta das bandas no cromatograma é indicativa dos compostos bioativos comparados com as placas controle reveladas.

### 4.7 Doseamento de Cumarinas

Método quantitativo do teor de cumarinas em extratos vegetais, realizado de acordo com a metodologia de Osório e Martins (2014) com algumas adaptações. Inicialmente foram transferidos 0,5 mL do extrato na concentração de 1,0 mg/mL para tubos de ensaio. Em seguida, 2 mL de água destilada e 500 µL de solução de acetato de chumbo (5%, p/v), foram transferidos para os tubos de ensaios e agitados.

Posteriormente, essa mistura foi filtrada e ao filtrado foi adicionado 7 mL de água destilada. Desta solução resultante, foram transferidos 2 mL para novos tubos de ensaio e adicionado 8 mL de solução de ácido clorídrico (0,1 M, v/v) e permaneceram ao abrigo da luz em temperatura ambiente por 30 min. Passado o tempo, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 320 nm. Água destilada foi utilizada como branco.

A curva de calibração foi preparada com uma solução padrão de cumarinas (1,2-benzopirona 1,0 mg/mL, p/v), onde alíquotas de 10, 25, 100, 200, 300, 400 e 500 µL foram transferidas para tubos de ensaio e seu volume completado para 10 mL com água destilada, formando soluções com concentrações que variaram de 0,2 a 10,0 µg/mL. Essas soluções foram analisadas a 320 nm em espectrofotômetro. Todo o ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de cumarina por grama de extrato (mg EC/g).

#### **4.8 Doseamento de Triterpenos e Esteróides**

A quantificação de triterpenos e esteroides foi realizada de acordo com a metodologia de Pedrosa et al (2020). Preparou-se uma solução estoque utilizando o padrão estigmasterol em clorofórmio (100 µg/mL) e alíquotas de 100, 200, 400 e 600 µL desta solução foram transferidas para tubos de ensaio pelos quais foram mantidos em banho aquecido a 85 °C até evaporação completa do solvente. Posteriormente, adicionou-se 250 µL de solução de vanilina (vanilina/ácido acético glacial, 50 mg/mL, p/v) seguido de 500 µL de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos ficaram em banho aquecido por 30 min a 60 °C, colocados, em seguida, em banho de gelo e adicionou-se 2500 µL de ácido acético glacial. Obteve-se, finalmente, 4 tubos de ensaio com volume final de 3250 µL, contendo concentrações equivalentes a 3,08, 6,15, 12,31 e 18,46 µg/mL. As soluções resultantes foram mantidas em resfriamento por 20 min e posteriormente em temperatura ambiente por mais 20 min antes da leitura em espectrofotometria a 550 nm para a preparação da curva de calibração.

A solução dos extratos foram preparados utilizando 1 mg de extrato seco dissolvido em etanol P.A (1 mg/mL, p/v). Realizou-se o mesmo procedimento realizado para a formação da curva de calibração, substituindo a solução estoque por alíquota de 75 µL da solução dos extratos.

A solução “branco” foi preparada seguindo o passo a passo anterior a partir da etapa da solução de vanilina em diante. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em miligramas equivalentes de estigmasterol por grama de extrato (mg EEstg/g).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Triagem Fitoquímica Qualitativa

As análises de prospecção fitoquímica foi feita a partir da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) por ser uma técnica simples, de fácil execução e proporciona uma rápida identificação das principais classes metabólicas presentes nos extratos vegetais.

Os valores dos rendimentos (Tabela 1) mostram que o extrato metanólico representa o de maior rendimento, seguido do hexânico e acetato de etila na sequencia. Podemos notar que, coincidentemente, o extrato metanólico foi o que se mostrou mais ricos em metabólitos secundários e o de acetato de etila a menor quantidade. Os metabólitos secundários encontrados na cromatografia em camada delgada (Figura 15) podem ser melhor visualizados na Tabela 1.

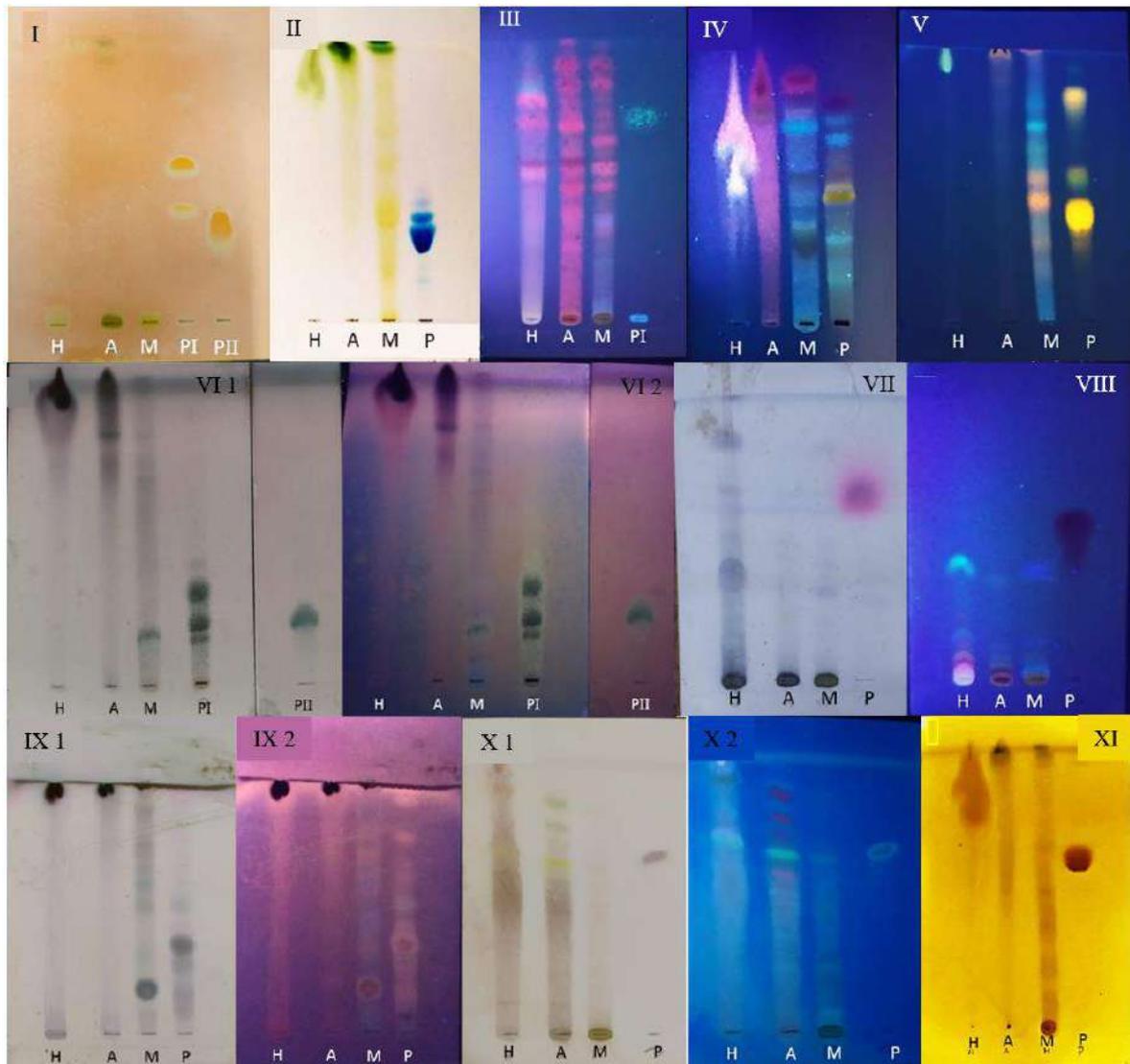
Tabela 1: Prospecção fitoquímica e rendimento dos extratos das partes aéreas de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.

GRUPO METABÓLICO	ExH	ExAcEt	ExM
<i>Alcaloides</i>	-	-	-
<i>Antocinanas</i>	-	-	+
<i>Compostos fenólicos</i>	-	-	+
<i>Cumarinas</i>	+	+	+
<i>Derivados antracênicos</i>	-	-	+
<i>Iridóides</i>	-	-	+
<i>Mono, sesqui e diterpenos</i>	+	-	-
<i>Naftoquinonas</i>	-	-	-
<i>Saponinas</i>	-	-	+ *
<i>Triterpenos e esteróides</i>	+	+	-
<i>Xantinas</i>	-	-	+
<b>Rendimento (%)</b>	<b>6,87</b>	<b>2,28</b>	<b>10,22</b>

Fonte: dados da pesquisa (2021).

Legenda: ExH: extrato hexânico; ExAcEt: extrato de acetato de etila; ExM: extrato metanólico; +: presença do grupo metabólico; -: ausência do grupo metabólico; + \*: presença de saponinas confirmada com o teste de afrogenicidade (Fig. 16).

Figura 15: Cromatografia em Camada Delgada para pesquisa de metabólitos secundários dos extratos de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.



Fonte: autor (2021)

Legenda: **H**: extrato hexânico; **A**: extrato de acetato de etila; **M**: extrato metanólico; **I**: pesquisa de alcaloides (PI: padrão quinina; PII: padrão ioimbina), revelador Dragendorff; **II**: pesquisa de antocianinas (P: padrão azul de metileno), sem revelador; **III**: pesquisa de cumarinas (PI: padrão cumarina) revelador KOH/EtOH 10%; **IV**: pesquisa de derivados antracênicos (P: padrão aloína) revelador KOH/EtOH 10%; **V**: pesquisa de compostos fenólicos (P: padrão rutina) revelador NEU; **VI 1 e 2**: pesquisa de iridoides (PI: padrão sacarose; PII: padrão D-frutose) revelador anisaldeído sulfúrico; **VII**: pesquisa de monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (P: carvacrol) revelador valinina sulfúrica; **VIII**: pesquisa de naftoquinonas (P: padrão lapachol) revelador KOH/EtOH 10%; **IX 1 e 2**: pesquisa de saponinas (P: saponina) revelador anisaldeído sulfúrico; **X 1 e 2**: pesquisa de triterpenos e esteróides (P: estigmasterol) revelador Lieberman-Burchard; **XI**: pesquisa de xantinas (P: cafeína) revelador Iodo-KI-HCL.

A classe das cumarinas foi a única presente nos três extratos, sendo evidenciado pela revelação no UV-365 nm, após adição de reagente revelador, a presença de bandas azuis fluorescentes, semelhante ao padrão, no extrato e hexânico e metanólico, indicando a presença de cumarinas simples e bandas marrons nos extratos de acetato de etila e hexano, indicando presença de derivados cumarínicos (Figura 15 III). O trabalho de Silva Junior (2018) realizado com extratos hexânico e metanólico das folhas, caules e flores da planta, coletada em Recife-PE, mostrou a presença, de forma geral, de fenilpropanóides, pelo qual as cumarinas fazem parte. Segundo Silva et al (2016), em seu trabalho realizado com extrato ciclohexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das folhas e raízes, também coletadas na cidade do Recife-PE, a presença de cumarinas só foi evidenciada no extrato metanólico das raízes. O estudo de Andrade (2014) realizado com extrato Etanólico (96%) das folhas, caule e raízes do mussambê colhido na região de Tauá – Ceará, mostrou a presença de cumarinas nos extratos das folhas e caule, o que corrobora, em parte, com os resultados encontrados pelo presente estudo.

Os metabólitos secundários podem variar tanto em diversidade quanto em concentração e local pelo qual se encontram na mesma espécie vegetal a depender de fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, condições climáticas como temperatura, exposição a radiação ultravioleta, disponibilidade hídrica, altitude, disponibilidade de nutrientes do solo, altitude, poluição atmosférica, estímulos mecânicos como corte e ferimentos e ataque de patógenos à planta como lagartas e microrganismos (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Isso justifica as diferenças encontradas no perfil fitoquímico do presente trabalho em comparação com os estudos realizados pelos autores citados.

Não houve presença evidenciada de alcaloides e naftoquinonas em nenhum dos extratos (Figura 15 I e VIII). Os estudos de Silva et al (2016) e Silva Junior (2018) corroboram com os resultados encontrados pois a ausência de alcaloides também foi observada em todos os extratos do mussambê em ambos os estudos, mas naftoquinonas não foram pesquisadas.

A presença de compostos terpenoides foi evidenciada nos extratos hexânico e acetato de etila, sendo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteroides presentes no extrato hexânico e apenas os triterpenos e esteroides no extrato de acetato de etila (Figura 15 VII e X 1 e 2). No estudo de Silva Junior (2018) foi mostrado a presença de terpenoides no extrato hexânico. Citando novamente Silva

et al (2016), seu trabalho evidencia a mesma presença desses metabólitos no extrato ciclohexânico e acetato de etila das folhas do mussambê, sendo os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos também negativos no extrato de acetato de etila, o que corrobora com os resultados encontrados neste estudo. O trabalho de McNeil et al (2010) feito com óleos essenciais extraídos por hidrodestilação de flores, folhas, frutos e partes aéreas sem as flores coletadas na Jamaica, mostrou um alto teor de terpenoides, principalmente sesqui e diterpenos.

Compostos fenólicos (flavonoides e taninos condensados), antocianinas, derivados antracênicos (aloe-resina), iridoides, xantinas e saponinas (Figura 15 V; II; IV; VI 1 e 2; XI; IX 1 e 2, respectivamente) só foram evidenciados no extrato metanólico, sendo a presença de saponinas confirmada pelo teste de afrogenicidade, com persistência de espuma densa por mais de 15 minutos após agitação (Figura 16). Um estudo fitoquímico realizado por Santos et al (2019) com extratos, da planta coletada em Quixêlo-CE, aquoso e etanólico (96%) em HPLC-DAD, mostrou a presença de fenilpropanóides, sendo eles quatro flavonoides e três ácidos fenólicos, o que corrobora com a presença de flavonoides encontrado no presente estudo. Fenilpropanoides foram encontrados nos extratos hexânico e metanólicos no trabalho de Silva Junior (2018), mas os flavonoides só se mostraram presentes nos extratos metanólicos, corroborando com este estudo. Flavonóides, taninos, derivados antracênicos e saponinas, também corroboraram com os estudos de Silva et al (2016). No trabalho de Andrade (2014) a presença de saponinas foi evidenciada no extrato etanólico das folhas e compostos fenólicos e flavonoides no extrato etanólico do caule e raízes, corroborando também com os nossos resultados.

Figura 16: Teste confirmatório da presença de saponinas no extrato.



Fonte: autor (2021)

Legenda: I: presença de espuma espessa após agitação vigorosa por 1 min; II: prevalência de espuma espessa após percorrido o tempo de 15 min.

Não foram encontrados estudos referentes, e nenhum dos autores anteriormente mencionados relatam, a presença de xantinas e iridoides em suas análises fitoquímicas, o que chama a atenção já que a presença de tais metabólitos foi evidenciada no presente estudo, dando indícios de que podem ser substâncias novas para essa espécie ou de que não foram antes exploradas/pesquisadas.

As xantinas possuem atividade broncodilatadora e antiinflamatória. O mecanismo de ação na broncodilatação ainda não foi elucidado, mas sabe-se que atuam na inibição de fosfodiesterases, no receptor de adenosina agindo como antagonista, na elevação dos níveis de cálcio intracelular e no estímulo da liberação de catecolaminas. O mecanismo de ação antiinflamatória é ainda mais incerto, mas atuam nas células estruturais e células inflamatórias infiltrantes (mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos), suprimindo a produção dos mediadores inflamatórios. Os iridoides possuem, entre outras atividades, ação antiinflamatória (CUNHA 2005; CORREA et al., 2008; CAMPOS & CAMARGOS, 2012).

## 5.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados da CIM (Tabela 2) foram comparados entre si para determinar qual extrato apresentou a melhor atividade antimicrobiana, sendo escolhido o extrato que abrangeu uma maior variação de cepas sensíveis, além de apresentar uma CIM de acordo com Peixoto Filho (2015), que classifica a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais em: maior que 1000 µg/mL, inativo; entre 500 e 1000 µg/mL, sendo maior que 500 e menor ou igual a 1000 µg/mL, atividade fraca; entre 100 e 500 µg/mL, sendo maior que 100 e menor ou igual a 500 µg/mL, atividade moderada; menor ou igual a 100 µg/mL, atividade boa.

O extrato metanólico se mostrou menos ativo frente a bactérias gram negativas, sendo para as cepas de *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, teve atividade fraca para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e atividade moderada para as cepas de *Streptococcus pyogenes*, se mostrando ativo para 3 cepas das 10 testadas, sendo elas gram positivas

Tabela 2: Resultados do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM), expressos em µg/mL.

Cepas	Extratos			Padrão
	Hexânico	Acetato de Etila	Metanólico	Gentamicina
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	2000	250	1000	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	2000	-	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> UFPEDA 1031 B	500	250	500	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> UFPEDA 1033 B	500	250	500	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	-	-	-	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 19429	2000	2000	-	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	-	2000	-	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA 1020A	-	1000	-	2
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 49606	-	250	-	4
<i>Acinetobacter baumannii</i> UFPEDA 1024 B	2000	250	-	8

Fonte: dados da pesquisa (2021).

Legenda: -: ausência de inibição.

O extrato hexânico foi inativo para *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foi ativo somente para 2 cepas das 10 testadas, tendo atividade moderada apenas para as cepas de *Streptococcus pyogenes*, bactéria gram positiva.

O extrato de acetato de etila foi inativo para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, teve atividade fraca para *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 1020A e atividade moderada para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, para as cepas de *Acinetobacter baumannii* e para as cepas de *Streptococcus pyogenes*, mostrando-se ativo para 6 cepas das 10 testadas, sendo elas tanto gram positivas quanto gram negativas, tendo um espectro de ação um pouco mais ampliado em relação aos demais extratos.

McNeil (2010), avaliou a atividade antimicrobiana de óleos essenciais das partes aéreas sem as flores, das flores, dos frutos e das folhas, extraídos por hidrodestilação e realizou a técnica de disco difusão com papel filtro. Segundo o autor,

o óleo essencial das partes aéreas foi o considerado ativo, com atividade moderada para *Streptococcus pyogenes*, com formação de halo de inibição de 30/27 mm de diâmetro e para *Pseudomonas aeruginosa*, com 16/14 mm. O autor sugere que a atividade deve ter sido atribuída aos terpenóides encontrados em alto teor. Apesar de não termos trabalhado com óleos essenciais, quando comparamos esses resultados com os extratos trabalhados no presente trabalho, podemos ver que o extrato metanólico (que apresentou ausência de terpenóides) foi considerado inativo.

O trabalho de Santos et al. (2019) testou a CIM por microdiluição em caldo de extratos etanólico (96%) e aquoso das folhas do mussambê. O extrato etanólico teve um CIM de 1024 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e o extrato aquoso 1024 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e 512 µg/mL para *Staphylococcus aureus*. Os autores não consideraram os extratos como sendo ativos, porém atribuíram atividade moduladora sinérgica quando associados a antimicrobianos. Os compostos encontrados nesses extratos foram os flavonóides. O presente estudo mostrou a presença de flavonóides somente no extrato metanólico, extrato esse que foi considerado também como não ativo, corroborando com os resultados dos autores citados.

A atividade antimicrobiana (CIM) contra bactérias e fungos pela técnica de microdiluição em caldo foi avaliada por Silva (2016), através da análise de extratos com solvente ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol das folhas e raízes por extração sob refluxo com o auxílio de aparelho de Soxhlet. Segundo o autor, todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, tanto antibacteriana quanto antifúngica, porém as melhores atividades foram atribuídas aos extratos ciclohexano com CIM variando entre 0,09 mg/mL a 12,5 mg/mL. O extrato das folhas foi ativo contra gram positivas, principalmente *Staphylococcus aureus*. O extrato clorofórmio foi ativo contra gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, e gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato de acetato de etila das raízes mostraram atividade marcante, segundo o autor, contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus epidermidis*. Além disso, os extratos aumentaram a ação do antibiótico oxacilina contra cepas resistentes (efeito modulador).

Ainda no trabalho de Silva (2016), foi mostrado que tanto o extrato ciclohexano quanto o clorofórmio das folhas apresentaram a presença de terpenóides (mono, sesqui, di triterpenos e esteróides) e no extrato de acetato de etila das raízes (mono, sesqui e diterpenos), além de cumarinas. Tanto os terpenóides quanto as cumarinas

foram encontrados no extrato ativo do presente estudo, o que corrobora com os resultados do autor citado.

### 5.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O teste de CBM, atrelado ao teste de CIM, nos mostra o comportamento dos extratos vegetais, indicando se atuam de forma bacteriostática ou bactericida. Os resultados encontrados nesse estudo (Tabela 3), mostram que o extrato ativo (acetato de etila) é, predominantemente, bactericida, pois não houve crescimento da maioria das cepas sensíveis ao teste de CIM e nas mesmas concentrações.

Houve crescimento de colônias com o retrocultivo de todos os poços de concentração inferior a CIM de cada cepa, mostrando que estas não foram afetadas pelos extratos.

Apesar de não terem sido considerados extratos ativos, foi realizado a CBM em todos os três extratos. O extrato hexânico apresentou uma CBM igual a CIM (500 µg/mL) contra *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1033, diferente do *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1031 onde a CBM (1000 µg/mL) foi superior a CIM. O extrato metanólico apresentou CBM igual a CIM (500 µg/mL) contra *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1031 e CBM (1000 µg/mL) superior a CIM da *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1033.

O extrao de acetato de etila, que apresentou atividade moderada na CIM, apresentou CBM igual a CIM para todas as cepas, na concentração de 250 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Acinetobacter baumannii* ATCC 49606 e *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1024 B e na concentração de 500 µg/mL contra *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1031 e *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1033.

O trabalho de Silva (2016), citado nos resultados da CIM, foi a única literatura encontrada que o teste de CBM, pelo qual denominou de Concentração Microbicida Mínima (CMM). O autor classificou seus extratos (ciclohexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol das folhas e raízes) como sendo bactericidas, contra as cepas de *Staphylococcus aures*, *Streptococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, que variaram nas concentrações de 0,19 a 50 mg/mL, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

Tabela 3: Resultado do teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) a partir dos resultados da CIM.

Extrato	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cepas								
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Hexânico	2000	S	-	N	N	N	-	-	-	N
	1000	-	-	N	N	-	-	-	-	-
	500	-	-	S	N	-	-	-	-	-
	250	-	-	S	S	-	-	-	-	-
Acetato de Etila	2000	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	1000	N	-	N	N	-	-	N	N	N
	500	N	-	N	N	-	-	-	N	N
	250	N	-	N	N	-	-	-	N	N
	125	S	-	S	S	-	-	-	S	S
Metanólico	2000	N	-	N	N	-	-	-	-	-
	1000	N	-	N	N	-	-	-	-	-
	500	-	-	N	S	-	-	-	-	-
	250	-	-	S	S	-	-	-	-	-

Fonte: dados da pesquisa (2021).

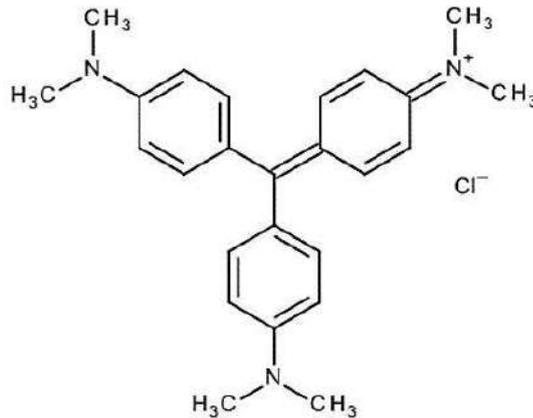
Legenda: S: houve crescimento de colônia; N: não houve crescimento de colônia; -: não se caracteriza como CIM; Cepas I: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; II: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; III: *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1031B; IV: *Streptococcus pyogenes* UFPEDA 1033 B; V: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 19429; VI: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; VII: *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 1020 A; VIII: *Acinetobacter baumannii* ATCC 49606; IX: *Acinetobacter baumannii* UFPEDA 1024 B.

#### 5.4 Ensaio de Permeabilidade Membranar – Cristal Violeta

Sintetizado pelo químico francês Charles Lauth em 1861 e denominado na época de “Violeta de Paris”, o Cloreto de hexametilpararosnilina (Cristal violeta, Figura 17) é um corante de coloração roxa pertencente ao grupo dos corantes triarilmetano muito utilizado para diversas finalidades, mas bastante conhecido pela utilização na identificação de bactérias. A parede celular bacteriana é composta, principalmente, de peptidoglicano que forma uma camada espessa em algumas bactérias e delgada em outras. A porção catódica do cristal violeta interage com as

porções aniônicas dos aminoácidos que formam os peptidoglicanos. As camadas mais espessas de peptidoglicanos interagem com uma concentração maior de cristal violeta que as camadas mais delgadas (SANTOS et al., 2005; BUDIN et al., 2012; SALGADO, 2016).

Figura 17: Estrutura química do Cristal Violeta.



Fonte: FARMACIA, 2014.

Disponível em <<https://www.farmacia.ufmg.br/wp-content/uploads/2018/10/FISPQ-Cristal-violeta.pdf>>.

Acesso em 01 de julho de 2021.

Apesar de interagir com o peptidoglicano, os cristais violetas também podem ser absorvidos pelas bactérias em situações pelas quais a permeabilidade de suas membranas estiver alterada como, por exemplo, quando ativos fitoquímicos interagem com a membrana bacteriana e alteram essa permeabilidade, e essa absorção aumenta a medida em que a alteração membranar também aumenta (LIMA, 2014; NOGUEIRA, 2019). Baseado nisso, o ensaio de permeabilidade membranar é um método quantitativo que permite identificar a concentração de cristal violeta que foi absorvido pela célula bacteriana tratada com ativos, permitindo presumir o mecanismo de ação desses ativos.

O extrato de acetato de etila, pelo qual apresentou o melhor resultado no teste de CIM, foi submetido ao teste de permeabilidade membranar nas cepas sensíveis e os resultados podem ser observados na Tabela 4 e são melhor apresentados nos gráficos 1 e 2.

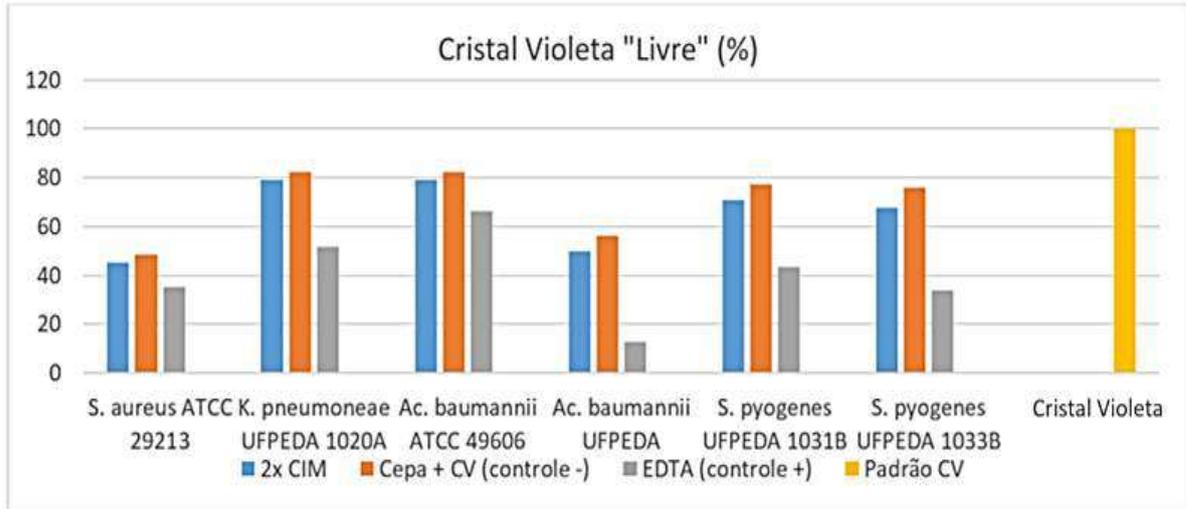
Tabela 4: Valores de cristal violeta não absorvido (livre) e absorvido.

CEPAS	Tratamento	Cristal Violeta	
		% livre Média±DP	% absorvida
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	Controle (+)	34,92±2,24 b	65,08 b
	Controle (-)	47,61±3,89 a	52,39 a
	2 x CIM	44,44±2,24 a	55,56 a
<i>Klebsiella pneumoniae</i> UFPEDA 1020A	Controle (+)	53,96±5,94 b	46,04 b
	Controle (-)	80,95±3,89 a	19,05 a
	2 x CIM	77,77±5,94 a	22,23 a
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 49606	Controle (+)	55,55±4,49 b	44,45 b
	Controle (-)	80,95±3,89 a	19,05 a
	2 x CIM	77,77±5,94 a	22,23 a
<i>Acinetobacter baumannii</i> UFPEDA 1024B	Controle (+)	12,69±2,24 b	87,31 b
	Controle (-)	55,55±4,49 a	44,45 a
	2 x CIM	49,20±5,94 a	50,80 a
<i>Streptococcus pyogenes</i> UFPEDA 1031B	Controle (+)	42,85±3,89 b	57,15 b
	Controle (-)	73,01±8,10 a	26,99 a
	2 x CIM	69,84±4,49 a	30,16 a
<i>Streptococcus pyogenes</i> UFPEDA 1033B	Controle (+)	33,33±3,89 b	66,67 b
	Controle (-)	74,60±2,25 a	25,40 a
	2 x CIM	69,84±4,49 a	30,16 a

Fonte: dados da pesquisa (2021).

Legenda: 2 x CIM: cepa + extrato na concentração duas vezes maior ao valor da concentração inibitória mínima de acordo com a sensibilidade de cada cepa; Controle (-): cepa + solução de cristal violeta/PBS 10µg/mL; Controle (+): cepas + solução de EDTA 0,25M; DP: desvio padrão; letras minúsculas iguais na coluna: não diferem estatisticamente conforme ANOVA pelo método de Skott-Knott (significância inferior a 5%, equivalente a  $p < 0,05$ ).

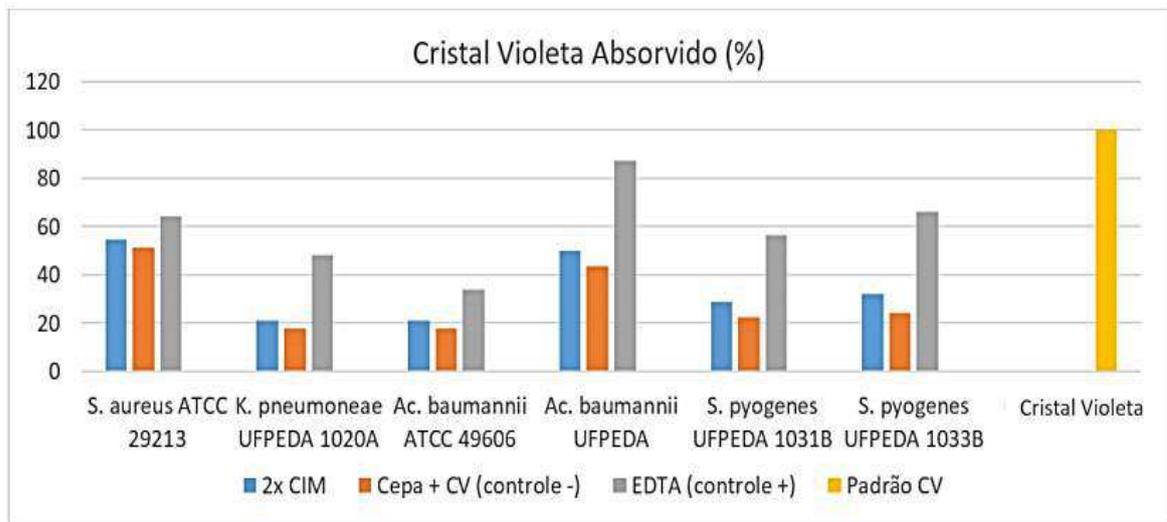
Gráfico 1: Concentração de cristal violeta não absorvido (livre)



Fonte: dados da pesquisa (2021).

Legenda: 2 x CIM: cepas + extrato na concentração de duas vezes o valor da concentração inibitória mínima de acordo com a sensibilidade de cada cepa; Controle (-): cepas + solução de cristal violeta/PBS 10µg/mL; Controle (+): cepas + solução de EDTA 0,25M; Padrão: solução de cristal violeta (10µg/mL); CV: cristal violeta.

Gráfico 2: Concentração de cristal violeta absorvido



Fonte: dados da pesquisa (2021).

Legenda: 2 x CIM: cepas + extrato na concentração de duas vezes o valor da concentração inibitória mínima de acordo com a sensibilidade de cada cepa; Controle (-): cepas + solução de cristal violeta/PBS 10µg/mL; Controle (+): cepas + solução de EDTA 0,25M; Padrão: solução de cristal violeta (10µg/mL); CV: cristal violeta.

Os resultados mostram que houve diferença estatística entre o grupo tratado com o extrato e o grupo controle positivo, porém essa diferença estatística foi favorável ao grupo controle positivo pois houve uma maior captação do cristal violeta, e conseqüentemente uma menor concentração de cristal violeta livre, pelos microrganismos desse grupo, mostrando que o extrato não apresentou atividade para esse mecanismo de ação.

Reforçando a não atividade do extrato por esse mecanismo de ação, os volares do grupo tratado com o extrato comparado com os valores do grupo controle negativo, mostra que não houve diferença significativa entre eles, ou seja, a concentração da captação de cristal violeta foi estatisticamente igual, e conseqüentemente os valores da concentração de cristal violeta livre, indicando que as membranas plasmáticas dos microrganismos dos dois tratamentos, não sofreram alteração da sua permeabilidade, o que significa dizer que a concentração de cristal violeta captado foi aquela em que houve interação com os peptidoglicanos da parede celular dos microrganismos.

Presume-se que o comportamento inibitório bactericida, visto nos resultados da CIM e CBM, do extrato de acetato de etila frente aos microrganismos testados não está relacionado a alteração na permeabilidade de membrana das bactérias, o que indica que seus compostos fitoquímicos atuam em um, ou mais de um, outro mecanismo de ação, mecanismos esses mencionados no tópico 3.5 *Metabólitos Secundários Com Atividade Antimicrobiana* deste trabalho.

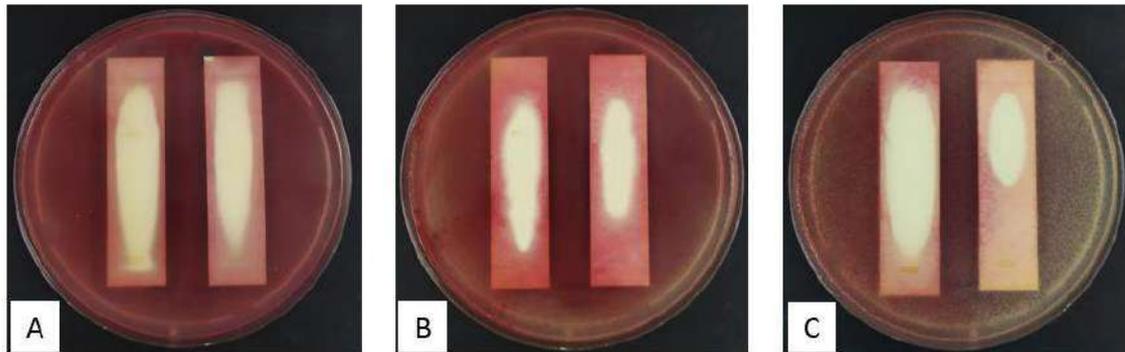
Não foram encontrados estudos utilizando esse ensaio com extratos de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. nem com plantas do mesmo gênero ou família, o que nos dá uma visão nova sobre a atividade antimicrobiana do mussambê.

## 5.5 Bioautografia

O extrato de acetato de etila, previamente avaliado pelos testes de CIM e CBM, foi considerado como ativo e em seguida submetido a avaliação por bioautografia, sendo testada as cepas bacterianas que foram sensíveis ao extrato pelo teste de CIM.

Os resultados (Figura 18) mostram que houve formação de zona de inibição em volta das bandas formadas pela corrida cromatográfica em CCD, em especial, nas áreas em que se encontram os terpenoides (triterpenos e esteróides) e derivados cumarinicos (Figura 19), reforçando ainda mais o pressuposto de serem as classes metabólicas responsáveis pela ação antimicrobiana do extrato do mussambê.

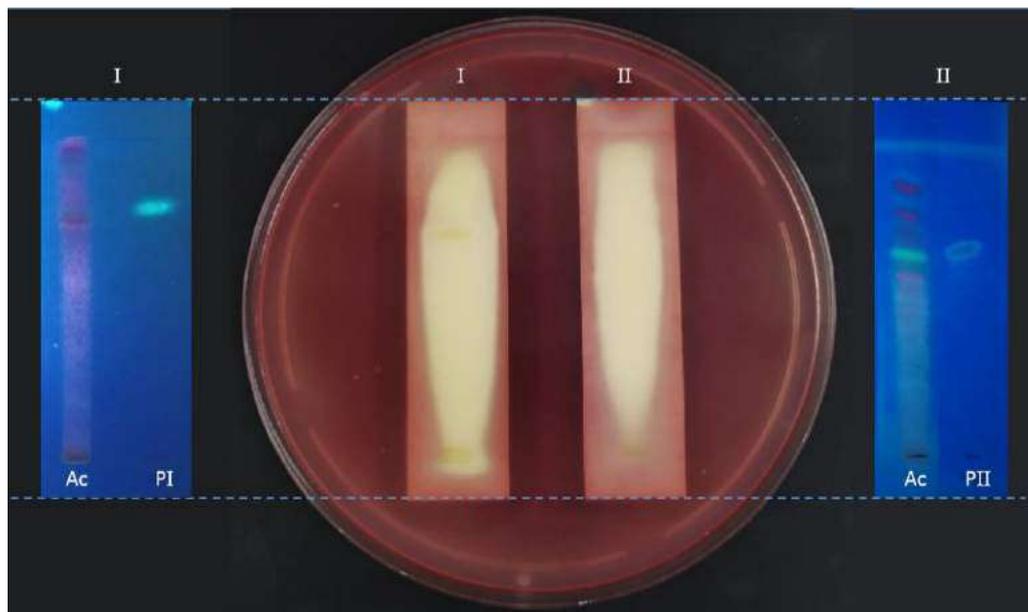
Figura 18: Exemplo dos resultados do teste de Bioautografia.



Fonte: autor (2021).

Legenda: áreas coradas: presença de crescimento bacteriano; áreas claras: formação de inibição de crescimento bacteriano; A: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; B: *Acinetobacter baumannii* ATCC 49606; C: *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 1020<sup>a</sup>.

Figura 19: Exemplo da revelação do teste de Bioautografia.



Fonte: autor (2021).

Legenda: I: pesquisa de cumarinas (PI: padrão de cumarina); II: pesquisa de triterpenos e esteroides (PII: padrão estigmasterol); Ac: extrato de acetato de etila; tracejado: indica que as placas foram confeccionadas com as dimensões padronizadas e se encontram posicionadas igualmente. A bioautografia exemplificada representa a imagem A da Figura 18.

Vários extratos de plantas foram caracterizados como ativos para atividade antimicrobiana utilizando a técnica de bioautografia. O extrato de acetona e aquoso de *Sclerocarya birra* (marula) se mostrou ativo contra *Helicobacter pylori* (NJUME et al., 2011), extrato de éter dietílico de *Helichrysum italicum* (Curry), *Napeta cataria*

(erva-dos-gatos), *Phytolacca dodecandra* (tintureira) ativos contra *Staphylococcus aureus* (NOSTRO et al., 2000), extrato metanólico de *Actaea racemosa* (erva-de-são-crostóvão) contra *Vibrio fischeri* (VERBITSK et al., 2008), extrato hexânico, acetona, metanólico e hidroetanólico (50%) de *Matricaria recutita* (camimola-vulgar) contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas syringae* pv. *Maculicola* (MO'RICZ et al., 2010), extratos de n-butanol, acetato de etila, diclorometano e hexânico *Dodonaea viscosa* (vassoura-vermelha) contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhi* (KHURRAM et al., 2009), extrato de acetona de *Curtisia dentata* (curtisias) contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (SHAI et al., 2009), são alguns dos muitos exemplos.

Se tratando de substâncias antimicrobianas isoladas a partir da técnica de bioautografia, também são muitos exemplos a serem citados. Isolado de *Garcinia mangostana* (mangostão) o composto  $\alpha$ -mangostin se mostrou ativo contra *Staphylococcus aureus* multirresistente a meticilina (CHAMNAWANG et al., 2009), serrulat-14-en-7,8,20-triol, serrulat-14-en-3,7,8,20-tetraol e 4-hydroxyngaione isolados de *Eremophila duttonii* (budá) contra *Staphylococcus aureus* (SMITH et al., 2007), timol, mentol e  $\alpha,\beta$ -thujon isolados de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Mentha x piperita* (hortelã-pimenta) e *Salvia officinalis* (salvia-comum) ativos contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (JESIONEK et al., 2013), eugenol, linalol, timol, carvacrol e aldeído *trans*-cinâmico isolados dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* (lavanda-inglesa), *Eucalyptus globulus* (eucalipto-comum), *Mentha spicata* (hortelã-verde), *Cinnamomum zeylanicum* (caneleira verdadeira) e *Thymus vulgaris* (tomilho) contra *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio fischerii* (GY et al., 2010).

As bandas inibitórias encontradas neste trabalho, indicando a ação antimicrobiana das cumarinas e dos triterpenos e esteroides do extrato de acetato de etila do mussambê, podem servir como norteamento para o isolamento desses compostos que podem ser, ou não, de estruturas inéditas. O triterpeno friedelina, isolado das raízes da *Terminalia avicennioides*, o ácido betulínico, isolado das cascas do caule de *Terminalia brownii* e o TTHL (3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno, isolado das flores de *Combretum leprosum* (SILVA et al., 2020), são exemplos destes

metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Já em relação às cumarinas, os compostos agasyllin, grandivittin e benzoato de aegelinol são exemplos de derivados cumarínicos, do tipo piranocumarinas, com atividade antimicrobiana (XU et al., 2015).

Não foram encontrados estudos relacionados ao uso da técnica de bioautografia para atividade antimicrobiana de extratos de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.

### 5.6 Doseamento de triterpenos/esteroides e cumarinas

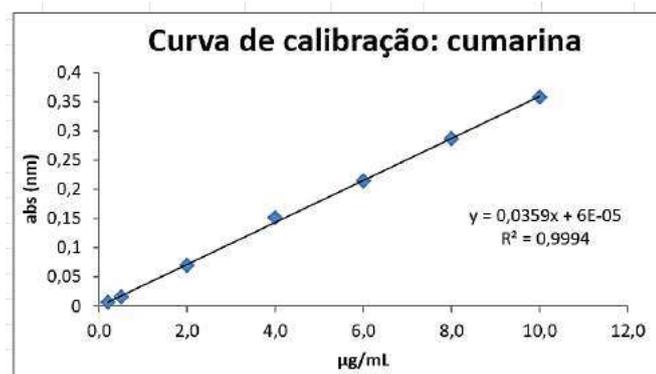
Os gráficos da curva de calibração do doseamento de triterpenos/esteroides e cumarinas estão mostrados na figura X e W respectivamente. O extrato metanólico apresentou a maior concentração de cumarinas, seguindo do extrato de acetato de etila e hexânico, em ordem decrescente, respectivamente, como mostra a Tabela 5.

Figura 20: Curva de calibração do doseamento de triterpenos/esteroides.



Fonte: autor (2021)

Figura 21: Curva de calibração do doseamento de cumarinas.



Fonte: autor (2021)

Tabela 5: Quantificação de triterpenos/esteroides e cumarinas nos extratos de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf.

		Teor de cumarinas (mg EC/g)	Teor de triterpenos e esteroides (mg EEst/g)
		MÉDIA±DP	MÉDIA±DP
Extratos das partes aéreas de <i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf.	Hexânico	36,13±4,82 a	279,38±26,15 a
	Acetato de Etila	39,38±4,89 a	338,48±28,48 b
	Metanólico	184,69±15,89 b	-

Fonte: dados da pesquisa (2021).

Legenda: -: sem resultado; mg EC/g: miligramas equivalentes de cumarina por grama; mg EEst/g: miligramas equivalentes de estigmasterol por grama; DP: desvio padrão; letras minúsculas iguais na coluna: não diferem estatisticamente conforme ANOVA pelo método de Skott-Knott (significância inferior a 5%, equivalente a  $p < 0,05$ ).

Os resultados dos testes de bioautografia, que mostram que as bandas que representam a presença de derivados cumarínicos e triterpenos e esteroides do extrato de acetato de etila pelos quais inibiram o crescimento bacteriano, nos dão indícios de que esses metabólitos secundários são os responsáveis pela atividade antimicrobiana do mussambê.

Apesar de conter um maior teor de cumarinas, o extrato metanólico não apresentou uma boa atividade antimicrobiana, o que pode ser explicado por ser um extrato que apresenta uma mistura de cumarinas simples e derivados cumarínicos, ou seja, tanto a concentração de cumarinas simples pode ser maior que a concentração de derivados cumarínicos, quanto a ausência de triterpenos e esteroides podem ter influenciado para a baixa atividade. Além disso, este foi o extrato que apresentou uma maior variação de compostos fitoquímicos, pelos quais podem atuar de forma antagônica uns aos outros.

O extrato hexânico apresentou baixa atividade antimicrobiana e, assim como o extrato metanólico, também apresentou uma mistura de cumarinas simples e de derivados cumarínicos e que, apesar de apresentar a presença de triterpenos e esteroides e a concentração de cumarinas não diferir estatisticamente do extrato de acetato de etila, a concentração de cumarinas simples pode ser maior que a concentração de derivados cumarínicos ativos, afetando sua atividade biológica.

O extrato de acetato de etila apresentou apenas a presença de derivados cumarínicos e triterpenos/esteroides em sua composição. Apesar de não diferir estatisticamente do extrato metanólico, podemos inferir que a concentração de derivados cumarínicos ativos seja maior neste extrato, comparado ao extrato hexânico, pelo qual juntamente com a presença dos triterpenos e esteroides, fez com que esse extrato seja ativo. Podemos inferir que o extrato de acetato de etila atua de acordo com a variedade e o tipo do metabólito secundário em sua composição, voltando-se uma atenção aos derivados cumarínicos (ausente no extrato metanólico e diminuída no extrato hexânico), pelo qual aparentemente parecem ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana do mussambê. Além disso, a atuação sinérgica com os triterpenos e esteroides potencializa seu efeito biológico.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que realizaram a quantificação de triterpenos/esteroides e cumarinas com extratos do mussambê.

## 6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o extrato de acetato de etila de *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf., que contém derivados cumarínicos e triterpenos/esteróides, apresentou atividade bactericida contra a maioria dos microrganismos causadores de infecções respiratórias. O teste de bioautografia evidenciou que ambos os metabólitos presentes no extrato ativo são responsáveis pela atividade antimicrobiana. O ensaio de cristal violeta mostrou que esses metabólitos não alteram a permeabilidade da membrana das bactérias, o que se faz necessário a realização de testes complementares de mecanismo de ação. Os testes de quantificação mostraram que existe uma concentração considerável dos metabólitos secundários em questão, pelos quais podem estar relacionados com a atividade antimicrobiana.

Os resultados dos testes realizados com o mussambê, corroboram com seu uso popular, ressaltando assim a importância do conhecimento empírico como ferramenta para os estudos etnobotânicos/etnofarmacológicos.

Apesar dos bons resultados encontrados, se faz necessário a realização de estudos envolvendo outras atividades biológicas relacionadas aos problemas respiratórios como atividade antiinflamatória, antitussígena, expectorante, broncodilatadora, antiviral, toxicidade, que são característicos por virem acompanhados com as infecções microbianas, visto que os extratos metanólicos e hexânico apresentaram uma variação grande de metabólitos secundários com potencial para tal como flavonoides, cumarinas, saponinas, iridoides, terpenóides e xantinas.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M. F. et al., Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacy**. v.17, p.114-140, 2007.

AKEMI-BORGES, I. & PIRANI, J. R. FLORA DA SERRA DO CIPÓ, MINAS GERAIS: CLEOMACEAE. **Bol. Bot. Univ**. v.35, p.95-100.

ALBERGARIA, E. T.; SILVA, M. V.; SILVA, A. G. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais em comunidades rurais localizadas na Unidade de Conservação Tatu-Bola, município de Lagoa Grande, PE – Brasil. **Revista Fitos**. v.13; n. 2. p.137-154, 2019.

ALBERT, R. Diagnosis and Treatment of Acute Bronchitis. **American Family Physician**. v.82, n.11, p.1345-1350, 2010.

ANDRADE, F. D. et al. Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico da raiz da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. no controle de *Haemonchus contortus* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.10, p.942-946, 2014.

ANDRADE, F. D. et al. Ação anti-helmíntica do extrato hidroalcoólico da raiz da *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. no controle de *Haemonchus contortus* em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.10, p.942-946, 2014.

ANDRADE, F. D. **FITOQUÍMICA PRELIMINAR, TOXICIDADE E AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. EM *Haemonchus contortus* DE OVINOS NO SEMIÁRIDO PARAIBANO**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos-Paraíba. p.16, 2014.

ANJOS, L. M. M. et al. Streptococcal acute pharyngitis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.47, n.4, p.409-413, 2014.

BAIRD, S. M. et al. Review of epiglottitis in the post Haemophilus influenzae type-b vaccine era. **ANZ Journal of Surgery**. p.1-6, 2018.

BUDIN, G., et al. A Magnetic Gram Stain for Bacterial Detection. **Angewandte Chemie International Edition**. v.51, p.1-5, 2012.

CABRAL, I, S, R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana de própolis vermelha brasileira**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, p.46, 2008.

CABRAL, S. C. M. & AGRA, M. F. Etnomedicina e farmacobotânica das Capparaceae da caatinga paraibana, Brasil. **Rev. Bras. Farm.** v.79, p.2-6, 1998.

CAMPOS, A. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: A systematic review. American Journal of Infection Control. v.44, n.11, p.1374-1380, 2016.

CAMPOS, H. S. & CAMARGOS, P. A. M. Broncodilatadores. **Pulmão**. v.21, n.2, p.60-64, 2012.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUYERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.131, p.326-342, 2010.

CARVALHO, R., DAMASCENO-JUNIOR, G. A. & FARINACCIO, M. A. CAPPARACEAE DO CHACO BRASILEIRO. **Rev. Biol. Neotrop.** v.13, n.1, p.8-19, 2016.

CASTRO, A. S. & CAVALCANTE, A. (Org.). *FLORES DA CAATINGA*. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido, 2011.

CASTRO, C. H. D. F. **Padronização e Análise da Atividade Microbicida de Células Mononucleares de Sangue Periférico Contra Mycobacterium**

**tuberculosis Utilizando a Resazurina.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Bioólicas) – Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, p.16-17. 2017.

CHAMNAWANG, M. T., et al. Antibacterial activity of Thai medicinal plant against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**. v.80, p.102-104, 2009.

CIGINSKIENE, A. Ventilator-Associated Pneumonia due to Drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Risk Factors and Mortality Relation with Resistance Profiles, and Independent Predictors of In-Hospital Mortality. **Medicina**. v.55, n.49, p.1-13, 2019.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. tenth ed. Approved Standard. Document M02-A10. CLSI, Wayne, PA. 2009.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement: M100 – S20 & M100-S- U, 2010.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**. v.126, p.159-175, 2009.

COLEMAN, A.; CERVIN, A. Probiotics in the treatment of otitis media. The past, the present and the future. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**. p.1-20, 2018.

COMBE, B. L. et al. Pneumonia-Specific *Escherichia coli* With Distinct Phylogenetic and Virulence Profiles, France, 2012-2014. **Emerging Infectious Diseases**. v.25, n.4, p.710-718, 2019.

CONDE, M. B. AS DOENÇAS RESPIRATÓRIAS E A ATENÇÃO PRIMÁRIA À SAÚDE. **Revista Educação em Saúde**. v.3, n.2, p.58-63, 2015.

CORDEIRO, J. M. P & FELIX, L. P. Conhecimento botânico medicinal sobre espécies vegetais nativas da caatinga e plantas espontâneas no agreste da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.16, n.3, p.685-696, 2014.

CORREA, M. F. P. et al. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, p.785-797, 2008.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, n.4, p.564-582, 1999.

CUNHA, A. P. FARMACOGNOSIA E FTOQUÍMICA. Lisboa: FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN, 2005.

DAVI, K. P. et al. Eugenol (an essencial oil of clove) acts as an antimicrobial afent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacoly**. [S.1.], v. 130, n. 1, p.107-115, 2010.

DOWDY, R. A. E; CORNELIUS, B. W. Medical Manegement of Epiglottitis. **American Dental Society of Anesthesiology**. v.67, p.90-97, 2020.

ERDEM, et al. Blessing in disguise: a review of phytochemical composition and microbial activity of plants belong to the genus Eryngium. **Journal of Faculty of Pharmacy**. v.23, n.53, p.1-22, 2015.

FERNANDES, M. F. & QUEIROZ, L. P. Vegetação e flora da caatinga. **Ciência e Cultura**. v.70, n.4, p.51-56, 2018.

GOBBO-NETO, L. & LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**.v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GRIEF, S. N. Upper Respiratory Infections. **Prim Care Clin Office Pract**. v.40, p.757-770, 2013.

GY, H., et al. Antimicrobial activity of essential oils: the possibilities of TLC-bioautography. **Flavour Fragr J.** v.25, p.178-182, 2010.

JORDHEIM, M.; ANDERSEN, O. M.; NOZZOLILLO, C.; et al. Acylated anthocyanins in inflorescence of spider flower (*Cleome hassleriana*). **Phytochemistry.** v.70, p.740-745, 2009.

JUNG, S. Y. Antimicrobials for the treatment of drug-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in critically ill patients: a systemic review and Bayesian network meta-analysis. **BioMed Central.** v.21, n.319, p.1-15, 2017.

KENDALL, K. A., CARPENTER, P. S. MRSA Chronic Bacterial Laryngitis: A Growing Problem. **The Laryngoscope.** p.1-5, 2017.

KHURRAM, M., et al. Antibacterial activities of *Dodonaea viscosa* using contact bioautography technique. **Molecules.** v.14, n.3, p.1332-13341, 2009.

KINKADE, S. & LONG, N. A. Acute Brinckitis. **American Family Physician.** v.94, n.7, p.560-565, 2016.

KOLEK, V. Komunitní pneumonie – základy diagnostiky a léčby. *Vnitr lék.* v.63, n.7-8, p.514-517, 2017.

KONEMAN, E. W., et al. **Koneman, diagnostico microbiológico: texto e atlas colorido.** 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LEAL, I. R., TABARELLI, M. & SILVA, J. M. C. (Org.). *ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA CAATINGA.* Recife: Editora Universitária da UFPE, 2003.

JESIONEK, W. et al. Thin-layer chromatography and direct bioautography for the screening of antimicrobial properties of plant extracts. **J Planar Chromatogr.** v.26, p.109-113, 2013.

LEAL, R. S., et al. Perfil Etnobotânico e Atividade Antioxidante de *Cleome spinosa* (Brassicaceae) e *Pavonia varians* (Malvaceae). **Revista Fitos**. v.3, n.3, p.25-31, 2007.

LIMA, B. D. **POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIPARASITÁRIO DO VENENO DA *Dinoponera quadriceps***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. p.67, 2014.

LODHA, N. J. R. & KABRA, S. K. Upper Respiratory Tract Infections. **Indian Journal of Pediatrics**. v. 68, n.12, p.1135-1138, 2001.

MABBERLEY, D. J. *Mabberley's Plant-Book: A portable dictionary of plants, their classification and uses*. Cambridge University Press, Cambridge, 2008.

MARTINEZ, N. et al. Defects in early cell contribute to the increased susceptibility to respiratory *Klebsiella pneumoniae* infection in diabetic mice. *Microbes and Infection*. p.1-7, 2016.

MAURICE, M. N., BEDI, B., SADIKOT, R. T. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**. v.58, n.4, p.428-439, 2018.

McNEIL, M. J., et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Cleome spinosa*. **Natural Product Communications**. v.5, n.8, p.1301-1306, 2010.

MESSIAS, M. C. T. B. et al. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MO'RICZ, A. M., TYIHA'K, E., OTT, P. G. Usefulness of transgenic luminescent bacteria in direct bioautographic investigation of Chamomile extracts. **J Planar Chromatogr**. v.23, p.180-183, 2010.

MUSHER, D. M., ABERS, M. S., BARTLETT, J. G. Evolving Understanding of Causes of Pneumonia in Adults, With Special Attention to the Role of Pneumococcus. *Clinical Infections Diseases*.

NASSAR, I. & GAMAL-ELDEEN, A. M. Potential antioxidante activit of flavonoids from *Hypericum triquetrifolium* Turra, and *Cleome droserifolia* (Forssk.) Del. **Bulletin of The Faculty of Pharmacy**. v.41, n.2, p.107-115, 2003.

NETO, R. L. & JARDIM, J. G. Capparaceae no Rio Grande do Norte, Brasil. **Rodriguésia**. v.66, n.3, p.847-857, 2015.

NETO, R. L. et al. Flora do Ceará, Brasil: Capparaceae. **Rodriguésia**. v.65, n.3, p.671-684, 2014.

NJUME, C., AFOLAYAN, A. J., NDIP, N. Preliminary phytochemical screening and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of acetone and aqueous extracts of the stem bark of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae). **Arch Med Res**. v.42, p.252-257, 2011.

NOGUEIRA, J. O. **AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES TERPENOS E FENILPROPANOIDES EM *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus***.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, São Paulo. p.59-61, 2019.

NOSTRO, A., et al. Extration methods and bioautography for evaluation od medicinal plant antimicrobial activity. **Lett Appl Microbiol**. v.30, p.379-384, 2000.

NOZZOLILLO, C.; AMIGUET, V. T.; BILY, A. C.; et al. Novel aspects of the flowers and floral pigmentation of two *Cleome* species (Cleomaceae), *C. hassleriana* and *C. serrulata*. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.38, p.361-369, 2010.

OLIVEIRA, M. S. **Tratamento de infecções causadas por *Acinetobacter* spp. Resistente a carbapenem**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo. p.2, 2007.

OSÓRIO, A. C., MARTINS, J. L. S. Determinação de cumarinas em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v.40, n.4, p.481-486, 2004.

OVERSIKT, K. Protracted bacterial bronhitis in children. **Tidsskriftet**. p.1-7, 2017.

PEDROSA, A. M. et al. Validated spectrophotometric method for quantification of total triterpenes in plant matrices. **DARU Journal of Pharmaceutical**. v.28, p.281-286, 2020.

PEIXOTO FILHO, C. S. **Caracterização físico-química e atividades biológicas das folhas de *Adenocalymma imperatoris-maximiliani* (WAWRA) L.G. LOHMANN (BIGNONEACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas.) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, p79. 2015.

PELOTTO, J. P. & MARTIAZ, M. A. D. P. Flavonoids aglycones from Argentinian *Caparis species* (*Capparaceae*). **Biochemical Systematc and Ecology**. v.26, p.577-580, 1998.

PEREIRA, D. A., BRITO, A. C. & AMARAL, C. L. F. Biologia floral e mecanismos reprodutivos do mussambê (*Cleome spinosa* Jacq) com vistas ao melhoramento genético. **Revista Biotemas**. v.20, n.4, p.27-34, 2007.

PERNA, T. D. G. S. Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero *klebsiella* em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Rv. Soc. Bras. Clin. Med.** v.13, n.2, p.119-123, 2015.

PITREZ, P. M. C. & PITREZ, J. L. B. Infecções agudas das vias aéreas superiores – diagnóstico e tratamento ambulatorial. **Jornal de Pediatria**. v.79, n.1, p.77-86, 2003.

REYNOLDS, J. H. Pneumonia in the immunocompetent patient. **The British Journal of Radiology**. v.83, p.998-1009, 2010.

RICARDO, D. D. F., et al. Reference collection of plant phytolith from the *Caatinga* biome Northeast Brazil. **Flora**. v.249, p.1-8, 2018.

RODRIGUES, Rômulo. C. S. P. **ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Guettarda platypoda* D.C. (RUBEACEAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. p.17-18, 2013.

RODRIGUES, T. S. et al., Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Rev. Bras. Pl. Med.** v.13, p.587-590, 2011.

ROGAN, M. Respiratory Infections, Acute. **International Encyclopedia of Public Health**. v.6, n.2, p.332-386, 2017.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatr Infect. Dis. J.** v.19, p.200-206, 2000.

SALES, M. D. C.; SARTOR, E. B.; GENTILLI, R. M. L. Etnobotânica e etnofarmacologia: medicina tradicional e bioprospecção de fitoterápicos. **Salus Journal of Health Sciences**. v.1, n.1, p.17-26, 2015.

SALGADO, H. M. R. **ADSORÇÃO DO CORANTE CRISTAL VIOLETA EM CINZA DE LAVADOR DE GASES PROVENIENTE DE ATIVIDADE AGROINDUSTRIAL**. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologias e Inovações Ambientais) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – Minas Gerais. p.21-22, 2016.

SANTIAGO, S. R. V. **USO DE PLANTAS MEDICINAIS POR RAIZEIROS DA CAATINGA**. Monografia de residência em saúde coletiva (Departamento de Saúde Coletiva) – Fundação Oswaldo Cruz, Recife. p.26, 2018.

SANTOS, F. S. M., et al. Polyphenolic composition antibacterial modulator and neuroprotective activity of *Tarenaya spinosa* (Jacq.) Raf. (Cleomaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v.9, n.1, p.19-17, 2019.

SANTOS, G. S., et al. IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO CRISTAL VIOLETA EM AGUARDENTES DE MANDIOCA (TIQUIRA). **Química Nova**. v.28, n.4, p.583-586, 2005.

SBPT (Sociedade Brasileira de Pneumonia e Tisiologia). **12 de novembro: Dia Mundial da Pneumonia**. Brasília, 2018. Disponível em <<https://sbpt.org.br/portal/dia-mundial-pneumonia-2018/>>. Acesso em: 05 Jun. 2019.

SBPT (Sociedade Brasileira de Pneumonia e Tisiologia). **Infecções Respiratórias**. Brasília. Disponível em <<https://sbpt.org.br/portal/publico-geral/doencas/infeccoes-respiratorias/>>. Acesso em: 01 Jun. 2021.

SHAI, L. J., MCGRAW, L. J., ELOFF, J. N. Extracts of the leaves and twigs of the threatened tree *Curtisia dentata* (Cornaceae) are more active against *Candida albicans* and other microorganisms than the stem bark extract. **S Afr J Bot**. v.75, p.363-366, 2009.

SHARAF, M.; EL-ANSARI, M. A.; SALEH, A. M. Flavonoids of Four *Cleome* and Three *Capparis* Species. **Pergamon**. v.25, n.2, p.161-166, 1997.

SHARAF, M.; EL-ANSARI, M. A.; SALEH, N. A. M. Quercetin triglicoside from *Capparis spinosa*. **Fitoterapia**. v.71, n.1, p.46-49, 2000.

SILVA, A. P. S. et al. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Organic Extracts from *Cleome spinosa* Jacq.. **Frontiers in Microbiology**. v.07, p.1-10, 2016.

SILVA, F. C. O. Bioatividades de triterpenos isolados de plantas: uma breve revisão. **Revista Virtual de Química**. v.12, n.1, p.1-14, 2020.

SILVA FILHO, E. B, et al. Infecções Respiratórias de Importância clínica: Uma Revisão Sistemática. **Revista FIMCA**. v.4, n.1, p.7-16, 2017.

SILVA, G.C. **ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Hymenaeae* spp.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDO ULTRAESTRUTURAL SOBRE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES E *Candida* spp.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. p.27-30, 2018.

SILVA JUNIOR, J. B. **PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, TOXICIDADE E POTENCIAL INSETICIDA DE *Tarenaya spinose* (Jacq.) Raf. (Cleomaceae).** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. p.64, 2018.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. 1ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 848 pág.

SMITH, J. E., et al. Identification of bacterial constituents from the indigenous Australian medicinal plant *Eremophila duttonii* F. Muell. (Myoporaceae). **J Ethnopharmacol**. v.112, p.386-393, 2007.

SOARES NETO, R. L. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Cleomaceae. **Rodriguésia**. v.68, n.3, p.931-933, 2017.

SOUZA, B. I.; ARTIGAS, R.C. & LIMA, E. R. V. CAATINGA E DESERTIFICAÇÃO. **MERCATOR**. v.14, n.1, p.131-150, 2015.

TEIXEIRA, J. J. M. et al. ANALYSIS OF THE ESSENTIAL OILS OF PALMAROSA (*Cymbopogon martini* (ROXB) J. F. WATSON) AND PINK PEPPER (*Schinus terebenthifolius* RADDI) IN FRONT OF *Staphylococcus aureus* MULTI-RESISTANT. **Brazilian Journal of Development**. v.6, n.6, p.34935-34953, 2020.

VANNESTE, P.; PAGE, C. Otitis media with effusion in children: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. A review. **Journal of Otology**. p.1-7, 2019.

VARGHESE, S. et al. *Staphylococcus aureus* Carrier State among Surgery and Orthopedics Health Care Personnel of a Tertiary Care Center. **Clinical Epidemiology and Global Health**. p.1-11, 2017.

VERBITSKI, S. M., et al., Detection of *Actaea racemosa* adulteration by thin-layer chromatography and combined thin-layer chromatography-bioluminescence. **J AOAC**. v.91, p.268-275, 2008.

WAGNER, H., BLADT, S. PLANT DRUG ANALYSIS. Segunda edição. Nova York: Springer, 1945.

WAKZMUNDZKA-HAJNOS, M., SHERMA, J., KOWALSKA, T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Nova York: CRC Press, 2008.

WEBER, R. Pharyngitis. **Prim Care Clin Office Pract**. v.41, p.91-98, 2014.

WYLER, B. & MALLON, W. K. Sinusitis Update. **Elsevier**. v.37, p.41-54, 2019.

XIONG, J.; ZHANG, C.; XU, D. Catalytic mechanism of type C sialidase from *Streptococcus pneumoniae*: from covalent intermediate to final product. **Journal of Molecular Modeling**. 2018.

XU, L. et al. The Study on Biological and Pharmacological Activity of Coumarins. **Atlants Press**. 2015.

YANG, X; KHAN, I; KANG, S. C. Chemical composition, mechanism of antibacterial action and antioxidant activity of leaf essential oil of *Forsythia koreana* deciduous shrub. Asian **Pacific Journal of Tropical Medicine**, [s.l.], v.8, n.9, p.694-700, 2015.

ZHANG, J. et al. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Black Pepper Essential Oil on Meat-Borne *Escherichia Coli*. **Frontiers in Microbiology**, [Lausanne, Switzerland], v.7, p.2094, 2017.

ZHUKHOVITSKAYA, A. VERMA, S. P. Identification and Management of Chronic Laryngitis. **Otolaryngologic Clinics of North America**. v.52, p.609-616, 2019.

## ANEXO A – FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA (EXSICATA)



Secretaria de  
Agricultura e  
Reforma Agrária

**PERNAMBUCO**  
GOVERNO DO ESTADO

HERBÁRIO IPA – DÁRDANO DE ANDRADE LIMA  
FICHA DE IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

FIB Nº 17/2017

	Nº de Tombo	Nome popular	Familia	Nome Científico	Identificada por
<b>1</b>	<b>92023</b>	Mussambê	Capparaceae	<i>Tarenaya spinosa</i> (Jacq.) Raf.	O. Cano e F. Gallindo

**Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Pereira**  
Curadora do Herbário IPA

**Consulta:** Ítalo Caio Lourenço da Silva      tel.: 81 – 37112043 / 998218749  
**e mail:** italocao\_17@hotmail.com

**Coletor:** o mesmo

**Procedência:** PE - Caruaru - área rural - Comunidade Malhada da Pedra – às margens do Açude

**Data da coleta:** 07/01/2019

**Data da entrada no Herbário IPA:** 14/03/2019

**Determinada em:** 25/03/2019

Resultado encaminhado por e mail em 25/03/2019.

Obs.: material botânico em estudo na UFPE, Dept.º de Ciências Farmacêuticas para fim de pesquisa e dissertação de Mestrado do aluno Ítalo Caio Lourenço da Silva sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim.

**Instituto Agronômico de Pernambuco - IPA**  
Vinculado à Secretaria de Agricultura e Reforma Agrária  
Av. Gal. San Martin, 1371 – Bongi – 50761-000 – Recife – PE – C.P. 1022  
CNPJ 10.912.293/0001-37 – PABX: (81) 3184-7200 – Fax: (81) 3184-7211  
Home Page: [www.ipa.br](http://www.ipa.br) / E-mail: [ipa@ipa.br](mailto:ipa@ipa.br)

**IPA – 77 anos semeando conhecimento**