

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA

Curso de Medicina

Amanda Fernandes Borges de Araújo

Leandro Soares Macedo Silva

Lylían Machado Palmiere Ribeiro

Thalyta dos Santos Alencar

Walter José Bernardes Filho

Bioprospecção fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana do farmacógeno caule de *Cnidoscolus vitifolius* (Mill.) Pohl (EUPHORBIACEAE) de ocorrência no Cerrado como subsídio à protótipos de novos fármacos

Anápolis, Goiás

2024

Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA

Curso de Medicina

Bioprospecção fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana do farmacógeno caule de *Cnidoscolus vitifolius* (Mill.) Pohl (EUPHORBIACEAE) de ocorrência no Cerrado como subsídio à protótipos de novos fármacos

Trabalho de curso apresentado à Iniciação Científica do curso de Medicina da Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Josana de Castro Peixoto e co-orientação da Prof^ª. Dr^ª. Emerith Mayra Hungria Pinto.

Anápolis, Goiás

2024

TRABALHO DE CURSO

PARECER FAVORÁVEL DO ORIENTADOR

À Coordenação de Iniciação Científica

Faculdade da Medicina – UniEvangélica

Eu, Prof(a) Orientador **Josana de Castro Peixoto** venho, respeitosamente, informar a essa Coordenação, que os (as) **acadêmicos (as)** Amanda Fernandes Borges de Araújo, Leandro Soares Macedo Silva, Lylian Machado Palmiere Ribeir, Thalyta dos Santos Alencar e Walter José Bernardes Filho estão desenvolvendo o trabalho de curso intitulado **Bioprospecção fitoquímica e avaliação da atividade antibacteriana do farmacógeno caule de Cnidocolus vitifolius (Mill.) Pohl (EUPHORBIACEAE) de ocorrência no Cerrado como subsídio à protótipos de novos fármacos**. O relatório parcial em anexo foi revisado e aprovado e retrata o desenvolvimento do TC sob minha orientação.

Observações:

Os discentes desenvolveram a pesquisa com êxito e responsabilidade.

Anápolis, 27 de novembro de 2024.

Assinatura da orientadora:



RESUMO

A humanidade sempre buscou maneiras de combater infecções e doenças, utilizando recursos naturais disponíveis. Há exemplos históricos do uso de substâncias com propriedades antimicrobianas, sendo um marco a descoberta da Penicilina e seus usos clínicos. Neste contexto, a estagnação nas descobertas de novas classes e a crescente resistência bacteriana conduz à busca de novos bioativos na representativa biodiversidade brasileira. O objetivo deste estudo foi identificar a classe de metabólitos secundários e avaliar a atividade antibacteriana dos extratos etanólicos do caule de *Cnidocolus vitifolius* (Mill.) Pohl pertencente à família botânica Euphorbiaceae e, popularmente conhecida como favela-branca, uma planta ocorrente no Cerrado brasileiro e conhecida por suas propriedades medicinais e usos tradicionais. A presente pesquisa é de caráter experimental e a identificação dos fitoquímicos foi realizada por meio de reações de caracterização dos metabólitos secundários mais relevantes, separadas em três grandes grupos: compostos fenólicos; compostos nitrogenados e terpenos. Por meio de testes de microdiluição em caldo realizados conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), com modificações foi avaliado a atividade antibacteriana do extrato etanólico do caule de *C. vitifolius* frente a microrganismos gram-positivos e gram-negativos de quatro cepas padrões *American Type Culture Collection* (ATCC). Os resultados demonstraram a presença dos seguintes grupos: flavonoides, compostos fenólicos, presença de núcleo esteroide e desoxi-açúcares, além da presença de cumarinas. Para a atividade antimicrobiana os resultados demonstraram que o extrato etanólico apresenta potencial ação antibacteriana, uma vez que, apesar de uma cepa de *Escherichia coli* ter demonstrado resistência, o extrato apresentou fraca ação antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa* e moderada atividade antibacteriana sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Apesar de incipiente, esta pesquisa abre perspectivas no sentido de controle de qualidade da droga vegetal e o desenvolvimento de fitoterápico eficaz para o tratamento de doenças infecciosas.

PALAVRAS-CHAVE: Antibióticos. Plantas Medicinais. Compostos Fitoquímicos. Fitoterapia.

ABSTRACT

Humanity has always looked for ways to combat infections and diseases, using available natural resources. There are historical examples of the use of substances with antimicrobial properties, with the discovery of Penicillin and its clinical uses being a milestone. In this context, the stagnation in the discoveries of new classes and the growing bacterial resistance leads to the search for new bioactives in the representative Brazilian biodiversity. The objective of this study was to identify the class of secondary metabolites and evaluate the antibacterial activity of ethanolic extracts from the stem of *Cnidocolus vitifolius* (Mill.) Pohl belonging to the botanical family Euphorbiaceae and, popularly known as favela-branca, a plant occurring in the Brazilian Cerrado and Known for its medicinal properties and traditional uses. This research is experimental in nature and the identification of phytochemicals was carried out through characterization reactions of the most relevant secondary metabolites, separated into three large groups: phenolic compounds; nitrogenous compounds and terpenes. Using broth microdilution tests carried out in accordance with the recommendations of the *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), with modifications, the antibacterial activity of the ethanolic extract from the stem of *C. vitifolius* was evaluated against gram-positive and gram-negative microorganisms of four strains. *American Type Culture Collection* (ATCC) standards. The results demonstrated the presence of the following groups: flavonoids, phenolic compounds, the presence of a steroid nucleus and deoxy-sugars, in addition to the presence of coumarins. For antimicrobial activity, the results demonstrated that the ethanolic extract has potential antibacterial action, since, although a strain of *Escherichia coli* demonstrated resistance, the extract showed weak antibacterial action against *Pseudomonas aeruginosa* and moderate antibacterial activity against strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Despite being incipient, this research opens perspectives in terms of quality control of plant drugs and the development of effective herbal medicine for the treatment of infectious diseases.

KEYWORDS: Antibiotics. Medicinal flora. Phytochemicals. Medical herbal medic.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 6 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 9 |
| 2.1 História dos antimicrobianos..... | 9 |
| 2.2 Resistência antimicrobiana e os principais mecanismos envolvidos | 12 |
| 2.3 Plantas medicinais com atividade antibacteriana | 14 |
| 2.4 Cerrado e sua flora medicinal com potencial antimicrobiano | 16 |
| 2.5 Métodos para avaliação da atividade antibacteriana | 18 |
| 3. OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 21 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 21 |
| 4. METODOLOGIA | 22 |
| 4.1 Desenho de estudo..... | 22 |
| 4.2 Material botânico..... | 22 |
| 4.2.1 Coleta e processamento do material vegetal e preparação dos extratos | 22 |
| 4.2.2 Processamento do material vegetal e preparação dos extratos | 23 |
| 4.3 Autorização e Legalização do Projeto | 23 |
| 4.5 Ensaio microbiológicos | 24 |
| 4.5.1. Atividade antibacteriana..... | 24 |
| 4.5.2. Manutenção e conservação das cepas bacterianas..... | 25 |
| 4.5.3 Preparo dos inóculos | 25 |
| 4.5.4 Preparo da amostra e do antibiótico | 26 |
| 4.5.5 Ensaio microbiológico para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) | 26 |
| 5. RESULTADOS | 28 |
| 5.1. Coleta e identificação do espécime - <i>Cnidoscolus vitifolius</i> (Mill.) Pohl (EUPHORBIACEAE) | 28 |
| 5.2. Prospecção fitoquímica | 29 |
| 5.3. Ensaio microbiológicos | 32 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 36 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 39 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 41 |

1. INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias antibacterianas remonta épocas milenares, mesmo antes da descoberta das bactérias. Contudo, a partir das evidências da patogenia desses seres unicelulares, iniciou-se uma intensa busca por agentes capazes de atuar no crescimento microbiano. Hodiernamente, existe uma vasta gama de compostos naturais e sintéticos capazes de inibir o crescimento (bacteriostáticos) ou causar a morte de fungos ou bactérias (bactericidas). Contudo, o conhecimento acumulado e exaustivo sobre as classes já existentes, associado ao crescimento expansivo da resistência microbiana, estagnou a ampliação de novas descobertas de produtos antibacterianos. Sendo assim, é imperiosa a busca por toda a biosfera a fim de encontrar novos produtos naturais antibacterianos para dar seguimento à história milenar desta classe de medicamentos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

O uso indiscriminado de antibióticos para tratar diversas infecções acarretou um quadro de resistência bacteriana aos antibióticos, que está em constante ascensão. É importante ressaltar que alguns microrganismos atualmente só podem ser tratados com antibióticos de amplo espectro e alto custo. Dessa maneira, a busca por novos compostos antimicrobianos, especialmente extraídos de espécies vegetais, tal qual *Cnidocolus vitifolius* é extremamente importante e vantajosa no contexto atual, tanto no ambiente comunitário quanto no ambiente hospitalar (CONTRERAS-OMAHÑA; ESCORCIA-SAUCEDO; VELASCO, 2021).

À luz dessa perspectiva, a Organização Mundial de Saúde (OMS) diante de tantas descobertas de compostos bioativos em plantas, enxergou a necessidade de nomear como “plantas medicinais” aquelas que apresentam algum composto com atividade farmacêutica. Alguns exemplos desses compostos são fenóis, saponinas, flavonoides, entre outros, todos eles apresentando alguma forma química de agente bactericida, atuando em partes do ciclo reprodutivo bacteriano (SILVA, 2010; SANTANA *et al.*, 2017; BISSO *et al.*, 2022).

Tendo isso em vista, sabe-se que o Cerrado, complexo vegetacional de maior extensão do país, composto por cerca de sete mil espécies de vegetais, é de fundamental importância para o estudo da efetividade das plantas medicinais. O surgimento de microrganismos resistentes e infecções oportunistas fatais tornou imprescindível a busca por novos agentes antimicrobianos. Diante disso, baseado na produção de metabólitos secundários pelas plantas, vários métodos são utilizados para avaliar a efetividade desses componentes, dentre eles: difusão em ágar, difusão em disco, diluição em caldo, macrodiluição e

microdiluição (OSTROSKY *et al.*, 2008; CASTRO, 2011; DA SILVA, 2013; AMPARO *et al.*, 2018).

Dessa maneira, é de altíssima relevância para a sociedade acadêmica e médica conhecer novos compostos de extratos vegetais com ação farmacêutica, principalmente no que tange à atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, microrganismos potencialmente causadores de doenças. Tal planta é uma espécie pouco conhecida em relação ao potencial farmacológico, por isso é importante identificar a sua capacidade, pois pode ser a possível salvação para a resistência dessas espécies. Perante o exposto, a grande resistência adquirida pelos microrganismos supracitados às substâncias sintéticas e descobrir na natureza algo que possa trazer uma nova possibilidade terapêutica para algo tão prevalente seria uma inovação de grande valia.

No contexto da utilização de produtos naturais como protótipos de novos fármacos, ressalta-se a importância da flora medicinal do Cerrado com uma biodiversidade química de ocorrência em diferentes famílias botânicas, dentre elas a Euphorbiaceae que está entre as maiores famílias de plantas angiospermas distribuídas nas regiões tropicais e temperadas de todo o planeta, especialmente nos continentes africano e americano (WEBSTER, 1994; SÁTIRO e ROQUE, 2008; CREPALDI *et al.*, 2016). As espécies desta família são altamente diversificadas na estrutura vegetativa, representadas principalmente por árvores, arbustos e ervas. De acordo com dados da literatura, é constituída por 299 gêneros com 8.000 espécies, agrupadas em 47 tribos e em sete subfamílias: Phyllanthoideae, Oldfieldoideae, Peroideae, Cheilosoideae, Alcalyphoideae, Crotonoideae e Euphorbioideae (ESSER, 2012; KUBITZKI, 2014).

As espécies pertencentes a esta família destacam-se na medicina tradicional por serem utilizadas no tratamento e controle de inúmeras doenças, contribuindo para a saúde de indivíduos de diversas comunidades em todas as partes do mundo. Nesse contexto, destaca-se o gênero *Cnicoscolus* devido ao potencial e diversidade farmacológica, associada à produção de um amplo espectro de metabólitos secundários (BIJEKAR e GAYATRI, 2014; SHARMA *et al.*, 2017).

No contexto científico, bioprospectar produtos naturais e validar seus usos potenciais como antibacterianos representa um dos maiores desafios da medicina moderna, exigindo a constante busca por novos agentes antimicrobianos.

O Cerrado brasileiro, reconhecido por sua rica biodiversidade, apresenta um vasto potencial para a descoberta de substâncias bioativas que possam ser utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos. *Cnidocolus vitifolius* (Mill.) Pohl, popularmente conhecida como favela-branca, é uma planta da família Euphorbiaceae com ocorrência representativa no Cerrado e conhecida por seu uso na medicina tradicional.

A bioprospecção científica de plantas medicinais do Cerrado é de suma importância devido à sua diversidade e ao potencial inexplorado de muitas espécies. *C. vitifolius* possui histórico de uso tradicional para tratar diversas condições, sugerindo a presença de compostos bioativos com possíveis propriedades terapêuticas. No entanto, a avaliação sistemática e científica da atividade antibacteriana dos seus extratos é ainda limitada.

Diante disso, este estudo justifica-se pela necessidade de investigar as propriedades antibacterianas dos extratos do caule de *C. vitifolius*, com o objetivo de identificar compostos com atividade significativa contra bactérias patogênicas. A descoberta de tais compostos pode contribuir para o desenvolvimento de novos protótipos de medicamentos antibacterianos, oferecendo alternativas eficazes no combate às infecções resistentes e ampliando as opções terapêuticas disponíveis na medicina.

Além disso, a pesquisa valoriza e preserva o conhecimento tradicional associado às plantas do Cerrado, promovendo a bioprospecção sustentável e a valorização dos recursos naturais brasileiros. Portanto, este estudo não apenas potencializa a inovação no campo da medicina e farmacologia, mas também reforça a importância da conservação da biodiversidade e do uso sustentável dos recursos vegetais na manutenção destes bioprodutos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História dos antimicrobianos

O uso profilático de antibióticos está registrado há mais de dois mil anos, quando se utilizava cataplasmas tradicionais de pão mofado para tratar feridas abertas na Sérvia, China, Grécia e Egito. Há registros também do documento médico mais antigo, o papiro de Éber de 1500 a.C., prescrevendo pão mofado e solo medicinal. Outra descoberta recente, revelou um suposto documento anglo-saxônico com prescrição para eliminar MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) há mil anos (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Apesar dos usos milenares de substâncias com atividade antimicrobiana, as bactérias, como seres unicelulares, foram identificadas apenas em 1670, por van Leeuwenhoek e sua patogenia foi cogitada apenas no século XIX por Louis Pasteur, quando também Robert Koch e outros cientistas explicitaram os agentes etiológicos da tuberculose, cólera e febre tifóide. A partir dessas demonstrações, iniciou-se a busca por substâncias capazes de agir na proliferação de patógenos, mas somente em 1910, Paul Ehrlich desenvolveu o primeiro antibiótico sintético, o Salvarsan, uma pró-droga sintética feita à base de arsênico salvarsan, usado no tratamento da sífilis (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

Ademais, a necessidade por novos medicamentos fez surgir a proflavina, em 1934, muito utilizada em feridos na Segunda Guerra Mundial (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Nos anos de 1930, também, em uma invenção histórica antes da criação da penicilina, Dogmak demonstrou que o corante prontossil, um pró-fármaco, gerou um produto ativo após a metabolização, a sulfonamida, que seria capaz de inibir a infecção bacteriana. A partir desse momento, muitas sulfonamidas foram desenvolvidas, mas a resistência bacteriana limitou a progressão desta classe, restando apenas alguns fármacos usados contra infecções sistêmicas e de amplo espectro, como o sulfametoxazol (RITTER *et al.*, 2022).

Nesse contexto, a penicilina foi descoberta em 1928, por Alexander Fleming, usando fungos para controlar a proliferação bacteriana, quando a resistência ao Salvarsan e às sulfonamidas já haviam sido identificadas. Entretanto, o uso clínico da penicilina foi aprovado apenas em 1940, quando a substância foi preparada, extraída e seus efeitos antibacterianos foram analisados, iniciando a Era de Ouro para descoberta de produtos naturais com ação

antibiótica (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019; RITTER *et al.*, 2022).

A Era de Ouro foi inaugurada por Waksman, que analisou os actinomicetos do solo que foram capazes de inibir o crescimento bacteriano em uma placa de Petri, originando a estreptomicina, por volta de 1940. Depois disso, houve a redescoberta de agentes como aminoglicosídeos, tetraciclinas, beta-lactâmicos, macrolídeos e cloranfenicol, esgotando-se a descoberta de compostos a partir de actinomicetos. Nesse período também houve avanços na descoberta de antimicrobianos sintéticos e, para concluir essa fase, foi descoberto o ácido nalidíxico, em 1960, que posteriormente originou as fluoroquinolonas, uma das principais classes de amplo espectro. Além disso, houve também a introdução de análogos que convertem antibióticos de pequeno espectro em amplo espectro e análogos com atividade contra patógenos resistentes (LEWIS, 2020).

Todavia, a Era de Ouro, de 1940 até 1960, com suas rápidas descobertas de antibióticos naturais, corroborou com o uso indiscriminado e a subsequente queda no desenvolvimento de novos ensaios clínicos para novas classes de antibióticos, uma vez que nas décadas seguintes houve apenas uma adaptação interativa e semissintética das bases naturais já descritas para criar sucessivas gerações (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Contudo, a busca por produtos sintéticos impulsionou descobertas tecnológicas, como a genômica e proteômica, a química combinatória e a triagem robótica para identificar alvos essenciais e compostos. No entanto, essa abordagem falhou e encontrou novas barreiras, como a restrição de entrada de compostos tóxicos nas células, barrado pelo envelope celular bacteriano (LEWIS, 2020).

Nesse contexto, de acordo com a Food and Drug Administration (FDA), a quantidade de novos antibacterianos aprovados entre 1980 e 1990 reduziu cerca de 56%, devido ao enrijecimento dos regulamentos e normas de segurança e ao fracasso de novas técnicas para descobrir novas substâncias (MARMITT *et al.*, 2015). Tal fato é corroborado porque a partir de 1960, foram descobertos antibióticos semissintéticos, análogos aos naturais já estabelecidos. Já entre 1980 e 2000, utilizou-se ferramentas genômicas e triagens de coleções de compostos na pesquisa por novos fármacos, mas houve drástica redução nessa busca, ao passo que a resistência bacteriana crescia. Nesse período, foram aprovados alguns antibióticos, como as fluoroquinolonas sintéticas, o imipenem, análogos da eritromicina e quinupristina e dalfopristina para infecções por *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina. A partir de

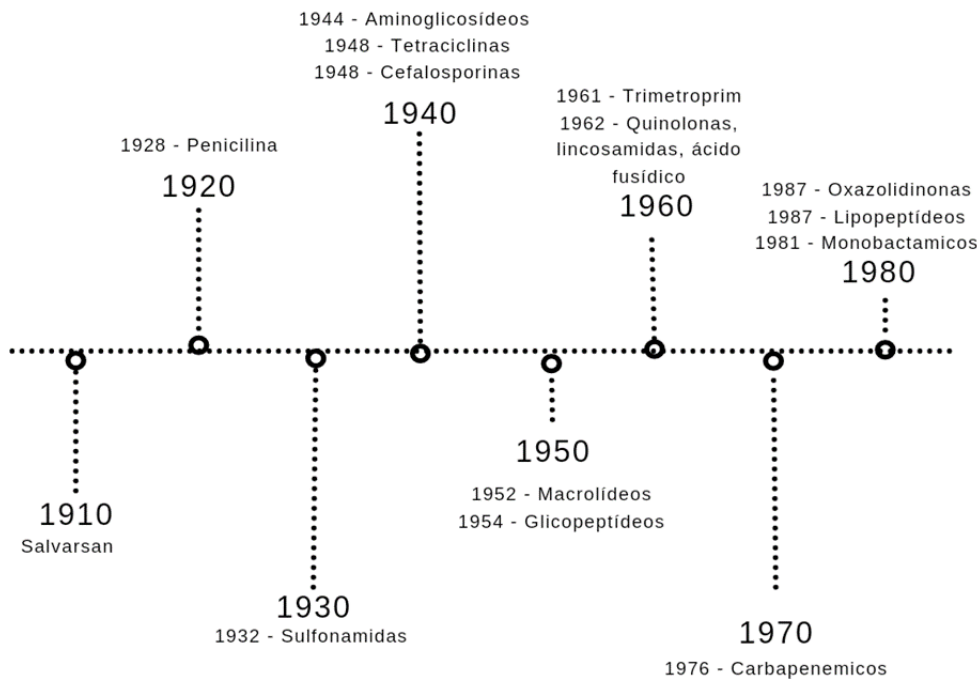
2000, alguns poucos antibióticos foram desenvolvidos, como a linezolida em 2001 e a daptomicina, em 2003 (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Atualmente, há mais de 23.000 produtos naturais antibacterianos e cerca de 25.000 isolados de plantas e animais, mas apenas cerca de centenas possuem uso clínico (WOHLLEBEN *et al.*, 2016). Desta feita, atualmente existem antibacterianos que interferem na síntese ou ação do ácido fólico, como as sulfonamidas e a trimetoprima; os beta-lactâmicos e outros que influenciam a síntese da parede ou membrana celular, como as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenêmicos, os monobactâmicos, os glicopeptídeos e as polimixinas; os que afetam a síntese das proteínas bacterianas, como as tetraciclina, o cloranfenicol, os aminoglicosídeos, os macrolídeos, as oxazolidinonas, o ácido fusídico, as estreptograminas e a clindamicina; e por fim, dentre os que afetam a topoisomerase estão as quinolonas (RITTER *et al.*, 2022).

Todavia, apesar da possibilidade de um uso tão amplo, o relatório O'Neill, encomendado pelo Governo do Reino Unido, previu que dez milhões de pessoas por ano morrerão de infecções resistentes aos medicamentos até 2050, caso o rápido aumento da resistência antimicrobiana não seja contida (STOKES *et al.*, 2020). Sendo assim, torna-se necessário adotar estratégias para a busca por novas abordagens terapêuticas, driblando a resistência e a repetição de descobertas das mesmas moléculas de produtos naturais. Nesse viés, vale ressaltar a mudança na estrutura química básica dos antibacterianos e o uso de substâncias que inibem o mecanismo de resistência a um agente como estratégias. Ainda assim, a busca tradicional por microrganismos que produzem um antibiótico tem sua validade, incluindo a busca por microrganismos presentes na microbiota humana ou de outras fontes (VILLA; MORENO-MORALES; BALLESTÉ-DELPierre, 2020).

Outrossim, a descoberta de novos produtos naturais com atividade antibiótica tem se pautado na genômica microbiana e a biologia estrutural de proteínas para reconhecer a capacidade biossintética de bactérias e fungos (CLARDY; FISCHBACH; WALSH, 2006). Apesar disso, é sabido que a Era de Ouro terminou de forma abrupta quando o conhecimento sobre o mecanismo de ação antibiótica e a resistência se acumulou, demonstrando um paradoxo com as outras terapêuticas nas quais o acúmulo de conhecimento é benéfico para gerar novas descobertas. Sendo assim, a descoberta de novas classes depende da identificação dos tipos promissores de produtores e não exclusivamente do acúmulo de conhecimento sobre as buscas já estabelecidas (LEWIS, 2020).

Figura 1: Linha do tempo da descoberta das principais classes de antibióticos em uso clínico.



Fonte: de autoria própria (2023)

2.2 Resistência antimicrobiana e os principais mecanismos envolvidos

A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema de saúde pública mundial, ainda subestimado, que ameaça o uso adequado de antimicrobianos. A RAM ocorre quando microrganismos adquirem a capacidade de evadir dos principais mecanismos microbicidas gerados pelos antimicrobianos. Tal perspectiva resulta no aumento das taxas de morbimortalidade, elevados gastos públicos para os sistemas de saúde, atraso no tratamento e uso de antimicrobianos de amplo espectro, os quais são mais eficazes, porém apresentam maior taxa de eventos adversos (KATZUNG, 2018; HUEMER *et al.*, 2020).

Hodiernamente, o desenvolvimento de resistência aos antibióticos é visualizado, principalmente em ambientes clínicos, na comunidade geral e, recentemente, foi descrito seu aparecimento na agricultura (BENGTSSON-PALME; KRISTIANSSON; LARSSON, 2017; GIL-GIL *et al.*, 2019).

Durante a década de 1940, Hobby e colegas descreveram o fenômeno da “persistência bacteriana”, no qual uma pequena subpopulação de *Staphylococcus aureus* sobreviveu ao tratamento com o antibiótico penicilina. Em 1983, Moyed e Bertrand

descobriram uma cepa de *Escherichia coli* de alta persistência. Nas últimas décadas, devido ao surgimento de cepas bacterianas resistentes a antibacterianos utilizados cotidianamente, diversos estudos foram iniciados acerca da resistência, os quais buscam novas alternativas para tal problema (HUEMER *et al.*, 2020).

Os principais mecanismos de resistência bacteriana são adquiridos através de modificações naturais ou genéticas nas bactérias, por meio da ausência de estruturas importantes e mutações espontâneas de genes. Tais mutações podem acontecer especialmente pela transferência horizontal de genes (processos conhecidos por transformação, transdução e conjugação), mas também foi descrito a RAM por meio de combinações entre transformação e mecanismos baseados em elementos genéticos móveis. Nesse contexto, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosas*, bactérias utilizadas neste estudo, apresentam todos os mecanismos listados abaixo (CHAMBERS; DELEO, 2009; LISTER; WOLTER; HANSON, 2009; PITOUT; LAUPLAND, 2008).

As bombas de efluxo específicas de substrato são proteínas transmembrânicas que transportam substâncias para fora da célula, codificadas por múltiplos genes contidos em bactérias ou mobilizados em plasmídeos que podem ser transferidos para outras bactérias. Os mecanismos supracitados atuam na diminuição das concentrações intracelulares de antibióticos por meio do aumento do efluxo dessas substâncias (HUEMER *et al.*, 2020; GIONO-CEREZO; IGNACIO; MORFÍN-OTERO, 2020).

As modificações dos sítios de ligação também são meios pelos quais as bactérias adquirem resistência contra os antibióticos de uso atual. Os microrganismos protegem e modificam os alvos moleculares, com mutações nos aminoácidos que compõem esses receptores, fato que gera uma ligação não produtiva ao alvo bacteriano e consequente sobrevivência da bactéria em questão. Além disso, encontram-se alterações nas membranas celulares, as quais geram redução da sua permeabilidade. Um exemplo desse quadro é a alteração da DNA girase em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à ciprofloxacina (HUEMER *et al.*, 2020).

O terceiro principal mecanismo de RAM descrito é a modificação direta do fármaco, observada principalmente na expressão de enzimas que podem degradar diversos antibióticos, promovendo sua inativação. As carbapenemases e as beta-lactamases, por exemplo, são enzimas que degradam uma variedade de beta-lactâmicos, incluindo penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro (GIL-GIL *et al.*, 2019).

Outrossim, diversos gatilhos podem contribuir para o desenvolvimento de bactérias mais resistentes a certas classes de antibióticos, como a limitação de nutrientes, pH ácido, grande número de células, estresse oxidativo, mudanças ambientais e a própria exposição aos antibióticos. Esses fatores modificam o DNA, induzindo alterações genéticas que originam genes de resistência, os quais exercem funções mais eficientes e são mantidos, pois permitem mais vantagens a esses microrganismos (HUEMER *et al.*, 2020; BENGTSSON-PALME; KRISTIANSOON; LARSSON, 2018).

Em relação às bactérias patogênicas que estão identificadas como resistentes a inúmeros fármacos, as denominadas ESKAPEs, sabe-se que são os microrganismos que causam infecções hospitalares potencialmente fatais. Para exemplificar, destacam-se *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus* (como bactérias Gram positivas), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* (como espécies Gram negativas). Dessa forma, é necessária redobrada atenção no tratamento das ESKAPEs, as quais são responsáveis por altos níveis de resistência e mortalidade no âmbito hospitalar (HUEMER *et al.*, 2020; WINTER *et al.*, 2021).

Dessa maneira, é de fundamental importância reverter esse cenário problemático. Como estratégias de prevenção há a prescrição adequada, educação comunitária, vigilância de resistência, além do uso correto de antimicrobianos. Contudo, o principal empecilho para a RAM é a falta de novas classes antibacterianas, principalmente pois a indústria farmacêutica está concentrando seus esforços atualmente em doenças crônicas não infecciosas. Uma alternativa importante nesse cenário são os antibióticos derivados de compostos naturais, que podem ser incluídos tanto no contexto comunitário quanto no hospitalar, a fim de combater os microrganismos que apresentam resistência ou que apresentarão em breve (GIONO-CEREZO; IGNACIO; MORFÍN-OTERO, 2020).

2.3 Plantas medicinais com atividade antibacteriana

A interação entre o homem e a natureza, a fim de encontrar em suas plantas algum tipo de atividade terapêutica, é histórica. O primeiro estudo sistemático de plantas medicinais foi realizado cerca de 2700 a.C., encontrando espécies como *Ephedra*, uma planta que era usada para tratar problemas respiratórios na época. O homem da idade antiga também pesquisou, mesmo que inconscientemente, o poder das plantas. Cleópatra foi uma das cobaias para testes de toxicidade de hiosciamina (Atropina) e escopolamina (Hioscina). Algumas plantas como a

Mandragora tinham suas propriedades atribuídas ao obscuro, devido aos seus efeitos alucinógenos, que, devido às crenças e religiões eram interpretados como algo vindo do “mal”, por isso eram usadas em rituais de magia negra. Com isso, o surgimento de novas análises de plantas com capacidade terapêutica foi crescendo. Porém só em 2004 a OMS, em sua 31ª Assembleia de Saúde reconheceu a importância de estabelecer o termo “planta medicinal”, o qual é designado a qualquer planta cujo efeito no corpo humano seja alguma ação farmacológica, sendo ela benéfica ou maléfica (SILVA, 2010).

Atualmente, há muitos estudos que contemplam a atividade antibacteriana de plantas, devido ao fácil acesso dessas substâncias na natureza e ao fato de ser uma alternativa mais rentável para as empresas e para a população. Com isso, o estudo dos compostos bioquímicos das plantas identificou fenóis, flavonoides, esteroides, antraquinonas e saponinas (STROTHMANN *et al.*, 2022; BISSO *et al.*, 2022).

Os compostos químicos bioativos (fitoquímicos) têm a capacidade de defender o organismo contra doenças. Os fitoquímicos atuam como metabólitos primários, como gorduras e açúcares, e em menor número, como metabólitos secundários que são processados em drogas, como inulina, morfina e codeína, quinina e digoxina. Os principais fitoquímicos incluem antioxidantes, anticancerígenos, potenciadores de imunidade, desintoxicantes, triterpenóides e neurofarmacológicos (UGBOKO *et al.*, 2020).

Os fenóis são substâncias químicas que podem ser extraídas de plantas e mostraram-se interessantes no tratamento da colite inflamatória, patologia que afeta cronicamente o intestino. Os compostos fenólicos e flavonóides são considerados os mais importantes bioativos encontrados em plantas, que possuem atividade antimicrobiana relatada. Os esteroides derivados de plantas possuem atividade antibacteriana e inseticida. As saponinas têm sido usadas para tratar doenças cerebrovasculares, cardiovasculares e úlceras gástricas. A capacidade antibacteriana vem da inibição da síntese proteica, da disfunção mitocondrial, inibem a formação de biofilmes e bombas de efluxo, todas ações que impedem a continuidade do ciclo bacteriano (BISSO *et al.*, 2022; SANTANA *et al.*, 2017).

Outros compostos de importante ação farmacêutica que podem ser extraídos de plantas são: lignanas, terpenóides, estilbenos, alcaloides, flavonoides e ácidos fenólicos. Sendo dentre esses os flavonoides e ácidos fenólicos mais importantes com atividade antibacteriana (WAWROSCH; ZOTCHEV, 2021).

Ao analisar o potencial de algumas plantas medicinais, Mendonça *et al.* (2016) avaliaram a atividade do extrato hidroalcolico das folhas e caules da *Eugenia uniflora L.* e demonstraram no antibiograma sua ação antimicrobiana contra Gram positivas e Gram negativas (cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas sp.*). Outro estudo avaliou a ação antibacteriana de três formas de *Achyrocline satureioides* (“macela”, “marcela”) em bactérias causadoras de infecções alimentares, demonstrando que as Gram positivas foram mais sensíveis, principalmente o *Staphylococcus aureus*, e que a extração hidroalcolica apresentou maior efetividade (MOTA; CARVALHO; WIEST, 2011).

2.4 Cerrado e sua flora medicinal com potencial antimicrobiano

O Cerrado representa um complexo vegetacional expressivo e contribui com uma rica biodiversidade medicinal, com cerca de sete mil espécies. A conservação da alta riqueza de espécies é explicada também pelo arcabouço cultural das populações que nele vivem, além de outros ecossistemas que o circundam, como o Amazônico, Semiárido, Mata Atlântica e o Pantanal. Dentre as espécies encontradas na área de Cerrado em estudo, 39 são árvores (36%), 43 arbustos (40%), seis são subarbustos (5,5%), 14 lianas (13%) e seis são ervas (5,5%). Além disso, abriga cerca de 2.000 espécies arbóreas e 5.250 espécies herbáceas e ou subarbusivas. O maior número de arbóreas encontradas pode estar relacionado com a ocorrência frequente de incêndios, que suprime as espécies herbáceas, mais sensíveis à queimadas constantes (CASTRO, 2011).

O Cerrado é o segundo maior complexo vegetacional do país, sendo considerado um *hotspot*, ou seja, está entre as regiões mais ameaçadas do mundo quanto à biodiversidade, principalmente devido à progressão das atividades agropecuárias. Além disso, conta com uma área de aproximadamente dois milhões de quilômetros quadrados, estabelecido na região central da América do Sul. Cerca de 20% de sua área total permanece sem nenhuma interferência humana, e 1,5% está protegida em áreas de conservação (SILVA; RABELO; ENOQUE, 2015; CASTRO, 2011).

Com isso, devido à riqueza fitofisionômica específica do Cerrado, torna-se cada vez mais evidente a busca por segurança e sustentabilidade, prezando pela identificação de novas espécies da flora medicinal e compostos bioativos com fins terapêuticos, os quais possuem atividade antimicrobiana. Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os quais, além de protegerem as espécies e garantir sua adaptação evolutiva, desempenham atividade

anticancerígena, antioxidante e antimicrobiana o que comprova o interesse em identificar novas moléculas. Nesse sentido, a concentração e propriedades do produto vegetal pode ser variável, pois seus princípios ativos podem estar distribuídos de forma heterogênea na planta. Isso se dá devido a diversos fatores relacionados ao vegetal, como localização geográfica, estação do ano, temperatura, altitude, longitude, umidade, entre outros (DA SILVA, 2013).

A flora medicinal do Cerrado é vasta e inclui plantas com potencial terapêutico comprovado, todavia faz-se necessário pesquisas acerca de determinadas espécies distribuídas em diferentes famílias botânicas. Destaca-se a família Euphorbiaceae, cujo gênero *Cnidoscolus* é conhecido popularmente como “cansação” ou “favela” e está distribuído em diversos países da América. No Brasil, ocorre principalmente no domínio fitogeográfico Caatinga e possui várias espécies amplamente utilizadas por comunidades tradicionais. Técnicas refinadas como a análise dos componentes principais (PCA) dos dados de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio dos extratos revelou que o perfil químico das espécies é semelhante. A análise das classes metabólicas presentes nas espécies de *Cnidoscolus* por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray (CLAE-IESEM/EM) (modos positivo e negativo) com consequente construção de redes moleculares das espécies estudadas, levou à desreplicação de compostos fenólicos com a anotação de 40 flavonoides (da classe dos flavonois, flavanois, flavonas e flavanonas) e 4 ácidos hidroxicinâmicos. Os metabólitos isolados por cromatografia filtrante foram caracterizados por RMN como pertencentes à classe dos esteroides (sitosterol, estigmasterol, campesterol e fucosterol) (DE MELO; DE SALES, 2008; HURBATH; SANTOS; ROQUE, 2016; MARTINS, 2022).

Ainda, o gênero possui 50-75 espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais, sendo valorizadas pelo seu potencial nutricional e medicinal. Essas plantas são xerófilas, com folhas longas e grossas, podendo atingir 6,0 m de altura. Elas possuem tricomas que causam dor quando estimulados e sementes com óleos alimentares. Para sobreviver no verão, as faveleiras têm raízes tuberosas e xilópodes que acumulam reservas alimentares. A espécie é predominantemente alógama, com produção de frutos por deiscência e dispersão explosiva das sementes. Além disso, estudos apoiam seu uso para tratar várias doenças, incluindo inflamações urinárias, próstata e ovários. Embora apenas algumas espécies de *Cnidoscolus* tenham sido estudadas, elas contêm compostos bioativos com efeitos antioxidantes, antibacterianos, antiinflamatórios, hipoglicemiantes, hepatoprotetores e hipocolesterolêmico (CUNHA *et al.*, 2019).

Apesar da escassez de estudos fitoquímicos e químicos abrangentes em relação ao gênero *Cnidoscolus*, compostos bioativos podem ser encontrados em diferentes partes das plantas deste gênero. Flavonoides, triterpenos e diterpenos são as principais classes de metabólitos secundários identificados. Além disso, em determinados estudos, a elucidação fitoquímica também identificou cumarinas e derivados do ácido cinâmico, além de outros flavonoides. No entanto, devido à sua relevância na química e farmacológica, as pesquisas sobre *Cnidoscolus* ainda são limitadas, o que representa uma oportunidade para a descoberta de novas moléculas bioativas. Várias espécies do gênero *Cnidoscolus*, como *C. aconitifolius*, *C. multilobus*, *C. urens*, dentre outras, são conhecidas por suas aplicações na medicina popular, incluindo propriedades antissépticas, antitumorais, anti-inflamatórias e seu uso no tratamento de reumatismo, infecções urinárias, distúrbios estomacais e hepáticos (DE OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2018).

2.5 Métodos para avaliação da atividade antibacteriana

É de grande importância a busca por novos agentes antimicrobianos, principalmente devido ao surgimento de microrganismos resistentes e infecções oportunistas fatais. Para isso, vários métodos são utilizados para avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos, frações, óleos essenciais e substâncias isoladas de vegetais. Os mais conhecidos são: método de difusão em ágar por poço, disco-difusão e métodos de macrodiluição e microdiluição, os quais são feitos em caldo (OSTROSKY *et al.*, 2008; BONA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2022).

Para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, determina-se uma pequena quantidade da substância requerida para inibir o crescimento do microrganismo-teste, sendo esse valor conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (AMPARO *et al.*, 2017). Diante disso, um dos métodos mais utilizados para a determinação da CIM e avaliação da atividade antibacteriana de plantas medicinais é a diluição em ágar, enquanto a microdiluição, devido ao baixo custo, confiabilidade e sensibilidade, também tem ganhado relevância (PEREIRA *et al.*, 2022).

Vale pontuar que as pesquisas sobre a atividade antimicrobiana são altamente limitadas, devido à ausência de padronização das metodologias. Isso ocorre devido a um caráter multifatorial, desde a espécie de microrganismo utilizada, até a concentração da amostra e do inóculo e o método propriamente dito empregado (BONA *et al.*, 2014). Ademais, diversos

fatores interferem na suscetibilidade dos métodos de difusão e diluição, tais quais: meios de cultura (devem proporcionar um crescimento adequado), pH (deve ser compatível com o crescimento microbiano, com a atividade e a estabilidade das substâncias testadas), disponibilidade de oxigênio, inóculo e condições de incubação (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Testes como o de difusão em disco tem sido utilizado principalmente para óleos vegetais, consiste na aplicação de 10 μL da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro de 6mm de diâmetro, nas diferentes concentrações a serem testadas, variando de 31,25 a 500 $\mu\text{g/mL}$ (OSTROSKY *et al.*, 2008; AMPARO *et al.*, 2017). No entanto, com o uso desta técnica, não é possível afirmar a quantidade de solução que cada disco possui, dificultando a constatação dos resultados. Não obstante, na difusão em poços, considerados de fácil reprodutibilidade e confiáveis, é possível contabilizar de forma clara quanto de extrato cada poço possui e os resultados por ele elucidados (PEREIRA *et al.*, 2022).

A difusão em ágar é amplamente utilizada, devido a sua simplicidade e baixo custo. Também chamado de difusão em placas, baseia-se no contato de um microrganismo com uma substância biologicamente ativa em um meio de cultura sólido, relacionando a concentração da substância ensaiada com o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo. A avaliação é baseada em um padrão biológico de referência (controle positivo) e o halo de inibição de crescimento é medido a partir da circunferência do disco ou poço até a margem onde há crescimento de microrganismos. Conforme a dimensão do halo, os microrganismos podem ser classificados em: sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes. No entanto, esse método não é indicado para determinar a CIM, apenas para direcionar as análises para sua determinação. Isso ocorre devido a variações na espessura do ágar, volume aplicado e propriedades físico-químicas das amostras analisadas (AMPARO *et al.*, 2017; OSTROSKY *et al.*, 2008).

O método de diluição em caldo é utilizado para determinar a relação entre o crescimento do microrganismo em meio líquido e a concentração da substância testada. Neste, não há influência da velocidade de crescimento dos microrganismos, fornecendo resultados quantitativos. No entanto, uma desvantagem desse método é a dificuldade em detectar contaminação em testes. Existem duas variações do método, sendo elas a macrodiluição e microdiluição. Os fatores principais que influenciam a CIM incluem a sensibilidade do microrganismo, o diluente utilizado, o estágio e a taxa de crescimento bacteriano (PEREIRA *et al.*, 2022).

A macrodiluição engloba testes em tubo de ensaio, com volume em meio de cultura variável (de 1 a 10 mL). Contudo, esse método é trabalhoso, consome tempo, requer espaço no laboratório e forma grande quantidade de resíduos, o que limita a quantidade de réplicas utilizadas. Por outro lado, a microdiluição utiliza microplacas com 80, 96 ou mais poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2mL. O método é barato, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que os outros métodos, requer pequenas quantidades de amostra, podendo ser utilizado para grande número de amostras e deixa um registro permanente. Além disso, a forma de solubilização é outro fator importante, pois o solvente pode cessar o crescimento microbiano, levando a resultados falso-positivos. Dessa maneira, para certificar-se de resultados precisos, é fundamental realizar um controle negativo, quantificando o crescimento no solvente utilizado (OSTROSKY *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2022; AMPARO *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Elucidar a classe de metabólitos secundários e avaliar a atividade antibacteriana de extratos do caule da espécie de interesse medicinal *Cnidoscolus vitifolius* (Mill.) Pohl (EUPHORBIACEAE) de ocorrência no Cerrado como subsídio à descoberta de novos fármacos.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar a espécie coletada, depositar em coleção científica e ratificar com os dados disponíveis na Flora e Funga do Brasil;
- Realizar a prospecção fitoquímica da droga vegetal do espécime por meio de técnicas de prospecção de substâncias de interesse terapêutico, elucidando a classe de fitoquímicos relevantes da espécie e obter conhecimentos preliminares do comportamento químico dos extratos analisados;
- Investigar a atividade antibacteriana do caule desta espécie medicinal por meio de testes de microdiluição em caldo realizados conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), com modificações, frente a microrganismos gram-positivos e gram-negativos de quatro cepas padrões *American Type Culture Collection* (ATCC).

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho de estudo

O presente trabalho configura-se como um estudo experimental, o qual possui como finalidade principal testar uma hipótese, utilizando-se de dados e variáveis, observando a ocorrência do fenômeno a partir da análise experimental do objeto de estudo.

Esta pesquisa foi realizada em etapas que incluindo: coleta e identificação do material botânico de ocorrência no Cerrado; depósito do material identificado na forma de exsicata nas coleções científicas do Herbário da Universidade Estadual de Goiás e na Universidade Federal de Goiás, processamento da droga vegetal para posterior análises laboratoriais e testes de atividade antimicrobiana.

A pesquisa laboratorial foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Biodiversidade (LaPeBio) da Universidade Evangélica de Goiás e em parceria com o Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Produtos da Biodiversidade (Lab. PD & Bio) da Universidade Estadual de Goiás e Laboratório de Microbiologia. Ressalta-se que esta pesquisa está inscrita no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) para a licença de coleta das plantas e no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN).

4.2 Material botânico

4.2.1 Coleta e processamento do material vegetal e preparação dos extratos

O material botânico da espécie foi coletado a partir da verificação de dados das coletas já registradas e disponíveis na plataforma *Species link*. Na busca dos dados de coletas foram identificadas 86 ocorrências da espécie no estado de Goiás. A coleta foi realizada em áreas de formações savânicas e florestais no município de Silvânia, estado de Goiás (16° 38' 30.0" S - 48° 39' 02.5" O) (Figura 2 e 3). A referida espécie foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Josana de Castro Peixoto e as exsicatas (material devidamente seco) foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Goiás sob número de tombo 17221. Para as coletas do farmacógeno caule foram utilizadas plantas adultas completamente expandidas, sem florescência, sendo ramo foliar e o caule coletadas no período da manhã às 10:00.

Figuras 2 e 3: Espécimes coletados em Silvânia, estado de Goiás para processamento de extratos. Hábito e floração do espécime de *Cnidoscolus vitifolius* (Mill.) Pohl (EUPHORBIACEAE)



Fonte: Peixoto, J.C. 2023

4.2.2 Processamento do material vegetal e preparação dos extratos

O material coletado foi limpo em água potável, com posterior enxágue em água destilada e submetido à secagem em estufa com circulação forçada de ar, Marca Solab e modelo SL-102, à 40°C (\pm 5°C) até atingir o teor de umidade entre 8 a 14%, conforme especificação da Farmacopeia Brasileira 5ª edição (V) - caracterização de drogas vegetais (BRASIL, 2010). Após a secagem, o material seco foi pulverizado em moinho de facas, marca Marconi e modelo MA-580. O pó obtido foi acondicionado em sacos plásticos escuros, identificado e armazenado em local protegido da luz e umidade até sua utilização nos experimentos. A droga vegetal foi submetida a extrações sucessivas do tipo maceração à temperatura ambiente, com renovação do solvente etanol a cada 24 horas. Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida similar à metodologia proposta por Martins (2022).

4.3 Autorização e Legalização do Projeto

O projeto de pesquisa foi cadastrado no Sistema Nacional do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) e os espécimes coletados foram acrescentadas no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SisBio), para obtenção da licença ambiental e legalização da pesquisa.

4.4 Prospecção fitoquímica

A análise qualitativa das principais classes de metabólitos secundários presentes no caule de *Cnidocolus vitifolius* foi realizada nas amostras pulverizadas obtidas após a secagem e trituração do material. Neste trabalho foram utilizadas algumas das principais reações de caracterização dos metabólitos secundários mais relevantes, adaptadas de Matos (1988), Matos & Matos (1989), Costa (2001) e Simões *et al.* (2017), separadas em três grandes grupos: compostos fenólicos (fenóis simples, flavonoides, antraquinonas, cumarinas e taninos); compostos nitrogenados (alcaloides) e terpenos (heterosídeos cardioativos e saponinas).

4.5 Ensaio microbiológicos

4.5.1. Atividade antibacteriana

Foi submetido aos testes de atividade antibacteriana o extrato etanólico do caule de *C. vitifolius*. Os testes de microdiluição em caldo para o ensaio microbiológico foram realizados conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), com modificações, para testes de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbias (CLSI M7-A6, 2010). As leituras das placas foram feitas com a utilização da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) como indicador visual de viabilidade bacteriana (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007) e colorimétrico de óxido-redução (SALVAT; ANTONNACCI; FORTUNATO, 2001). Os ensaios foram realizados em triplicata e em câmara de fluxo laminar para evitar possíveis contaminações.

Foram utilizadas cepas-padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) mantidas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), campus Anápolis, descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos utilizados na determinação da concentração mínima inibitória (CMI).

| <i>Microrganismos</i> | <i>ATCC</i> |
|-----------------------------------|-------------|
| Bactérias Gram (+) | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 25923 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 12228 |
| Bactérias Gram (-) | |

| | |
|-------------------------------|-------|
| <i>Escherichia coli</i> | 25312 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 27853 |

Fonte: de autoria própria (2024)

Legenda: ATCC = *American Type Culture Collection*

4.5.2. Manutenção e conservação das cepas bacterianas

Para realização dos ensaios microbiológicos, as cepas padrão foram mantidas e conservadas de acordo com o procedimento descrito por Silva, Costa e Chinarelli (2008) com modificações. Antes da realização do ensaio, a fim de garantir a manutenção das culturas microbianas, as cepas foram descongeladas em estufa a 37° C por até 2 horas. As bactérias foram então repicadas em placas contendo ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 35°C por 24 horas. Em seguida, foram transferidas de três a cinco colônias isoladas e típicas de cada microrganismo para um tubo com 15 mL de caldo BHI mais 20% de glicerol. Os tubos foram homogeneizados com agitador de tubos (vórtex) por 15 segundos e incubados por 12 horas a 35°C. Após a incubação, os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex com posterior fracionamento de alíquotas de 1 mL em microtubos do tipo eppendorfs, previamente esterilizados e identificados. Os eppendorfs foram mantidos em geladeira durante sete dias a 8°C e congelados em freezer a -20°C.

4.5.3 Preparo dos inóculos

Para o preparo dos inóculos, os eppendorfs foram retirados do freezer até adquirirem temperatura ambiente. As cepas foram reativadas pela técnica do esgotamento. Os microrganismos foram inoculados com auxílio de alça de platina em placas contendo ágar *Muller Hinton* (MH) e em seguida incubados à 35°C por 24 horas.

Após incubação dos microrganismos em estufa, foram transferidas de três a cinco colônias isoladas e típicas para um tubo com 5 mL de solução fisiológica 0,9%. Obteve-se uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland (10^8 UFC mL⁻¹), por leitura no espectrofotômetro a 625nm (79,4% a 83,2% de transmitância). Em microbiologia, os padrões de McFarland são utilizados como uma referência para ajustar a turvação de suspensões bacterianas de modo que o número de bactérias estará dentro de um intervalo dado para padronizar o teste microbiano (BRASIL, 2008). A solução foi então diluída utilizando 0,5 mL da suspensão de microrganismos e 4,5 mL de solução fisiológica 0,9%, atingindo, portanto, a concentração de células de 10^7 UFC mL⁻¹. O procedimento foi realizado 15 minutos antes da inoculação nos poços das placas de CMI.

4.5.4 Preparo da amostra e do antibiótico

A amostra do extrato etanólico foi solubilizada acrescentando Tween 80® a 0,02% e diluída em caldo MH de modo a obter uma concentração de 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µg mL⁻¹.

As diluições do antibiótico cloranfenicol foram preparadas conforme recomendado pelo CLSI (2010) nas concentrações de 64, 32, 16, 8, 4, 2 e 1 µg mL⁻¹, sendo utilizadas como controle para validação da técnica. Todos os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar para evitar contaminações cruzadas.

Após o preparo das diluições foram pipetados em microplacas estéreis de 96 poços, providas de tampas, 100 µL de cada concentração do antibiótico da coluna 1 até a coluna 7 e das linhas A a D. Na coluna 9, da linha A até a linha D, foram pipetados 100 µL de caldo *Muller Hinton* (MH) com o inóculo das bactérias a serem testadas, sendo este, portanto, o controle de viabilidade do crescimento bacteriano – controle positivo - CP. Na coluna 11, da linha A até a linha D, foram pipetados 100 µL de MH sem inóculo que foram utilizados como controle da esterilidade do meio – controle negativo - CN. Após o preenchimento das placas, 5 µL de cada inóculo das bactérias a serem testadas foram depositados nos orifícios dos poços das colunas 1 a 7 e das linhas A a D. A microplaca foi tampada, incubada a 35°C por 22 horas e fotografada. Após o período de incubação na estufa, foram acrescentados em todos os poços 20 µL de resazurina 0,001% (figura 7) em solução fisiológica 0,9% e a placa foi novamente incubada por 2 horas e fotografada.

4.5.5 Ensaio microbiológico para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Após o preparo das diluições, foram pipetados em microplacas estéreis de 96 poços, providas de tampas, 100 µL de cada concentração do óleo da coluna 1 até a coluna 7 e das linhas A a D. Na coluna 9, da letra A até a letra D, foram pipetados 100 µL de caldo *Muller Hinton* com o inóculo, sendo este, portanto, o controle de viabilidade de crescimento bacteriano – controle positivo - CP. Na coluna 11, da letra A até a letra D, foram pipetados 100 µL da solução de Tween 80® 0,02% em caldo *Muller Hinton*, sem amostra, sendo este, portanto, o controle do referido surfactante. Na linha F, da coluna 1 a 7, foram pipetados 100 µL de MH sem inóculo, com as respectivas concentrações do óleo, sendo este, portanto, o controle da amostra. Na coluna 10, da linha F até a H, foram pipetados 100 µL de MH sem inóculo que foram utilizados como controle da esterilidade do meio – controle negativo – CN. Após o preenchimento das placas, 5 µL de cada inóculo das bactérias a serem testadas foram depositados nos orifícios dos

poços das colunas 1 a 7 e 11 e das linhas A a D. A microplaca foi tampada, incubada a 35°C por 22 horas e fotografada. Após o período de incubação na estufa, foram acrescentados em todos os poços 20 µL de resazurina 0,001% em solução fisiológica 0,9% e a placa foi novamente incubada por 2 horas e fotografada.

A leitura das placas com os microrganismos foi realizada por meio da comparação da turvação das amostras nos poços antes e após acrescentar a resazurina, sendo que o aumento da turbidez ou opacidade no meio indica o crescimento de microrganismos (LENNETTE *et al.*, 1985).

Após acrescentar a resazurina, a permanência da coloração azul indica ausência de microrganismo e a mudança da coloração azul para rosa indica a presença de microrganismo. Portanto, a leitura dos resultados para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foi considerada como positivo para os poços que apresentaram coloração azul e negativa para os que obtiveram coloração rosa intenso. A CMI é definida como a menor concentração capaz de produzir proeminente inibição do crescimento do microrganismo, considerando-se a viabilidade dos microrganismos com o controle positivo. Dessa forma, a (CMI) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição detectada pela cor a olho nu mediante utilização de resazurina como revelador visual (PEREIRA, 2010).

5. RESULTADOS

5.1. Coleta e identificação do espécime - *Cnidoscolus vitifolius* (Mill.) Pohl (EUPHORBIACEAE)

Para a obtenção de informações sobre algumas “obras princeps” das espécies do gênero *Cnidoscolus* tratadas para o Brasil foram consultados sites específicos sobre taxonomia, tais como, do Missouri Botanical Garden, New York Botanical Garden, Index Plant Names International (IPNI), base bibliográfica do Royal Botanic Gardens.

Com a finalidade de obter informações adicionais sobre a abrangência geográfica e amplitude morfológica das espécies de *Cnidoscolus* foram consultadas as coleções dos seguintes herbários:

CEN- Cenargem, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF;

HEPH - Herbário Ezequias Paulo Heringer, do Jardim Botânico de Brasília, Brasília, DF;

IBGE - Herbário da Reserva Ecológica do IBGE, Brasília, DF;

UB - Herbário da Universidade de Brasília, Brasília, DF;

UFG - Herbário da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO;

UFMT- Herbário Central UFMT, Cuiabá, MT;

HUEG- Herbário da Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, GO.

Foram realizadas expedições de campo no período de novembro de 2023 a fevereiro de 2024 em remanescentes no município de Silvânia, Goiás. Os locais e as datas das expedições foram selecionados a partir de levantamentos realizados nos herbários CEN, UB, UFG, K e NY e por coletas registradas no *Species link* pelos herbários.

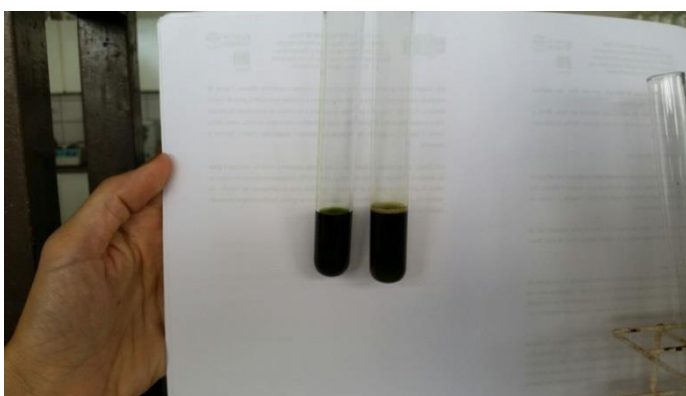
Para caracterização morfológica da espécie utilizou-se a chave dicotômica de identificação das espécies com caracteres reprodutivos e morfológicos, haja vista uma escassez de instrumentos de identificação para essas espécies. Ressalta-se ainda que apenas com a identificação botânica é possível realizar os estudos aplicados dentro da pesquisa antibacteriana.

Os espécimes foram coletados com flores e fotografados em campo utilizando câmera digital Canon A310. Uma duplicata de cada material coletado encontra-se depositado no Herbário da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

5.2. Prospecção fitoquímica

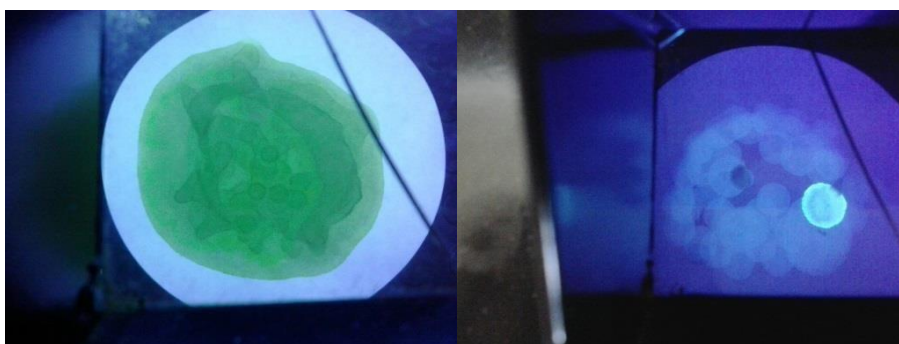
As figuras 4 e 5 demonstram os resultados para algumas das reações de caracterização de flavonoides.

Figura 4: Resultado das reações para caracterização de flavonoides: coloração verde enegrecida na reação com cloreto férrico (tubo da esquerda) e coloração marrom escura na reação da cianidina ou shinoda (tubo da direita).



Fonte: Peixoto, J.C. 2023

Figura 5: Resultado das reações para caracterização de flavonoides: fluorescência observada na reação com cloreto de alumínio sob luz U.V. (figura da direita).



Fonte: Peixoto, J.C. 2023

Na Tabela 2 encontra-se os resultados das reações para as classes de metabólitos secundários do extrato etanólico do caule de *Cnidocolus vitifolius*.

Tabela 2- Prospecção fitoquímica do caule de *Cnidocolus vitifolius* (Mill.) Pohl (EUPHORBIACEAE) de ocorrência em área rural do município de Silvânia, estado de Goiás.

| <i>Reação de Caracterização para Flavonoides e Compostos Fenólicos em geral</i> | Resultado |
|---|-----------------------|
| 1- Reação de Shinoda (cianidina) | + |
| 2- Reação Oxalo-Bórica | + |
| 3- Reação com H ₂ SO ₄ conc. | + |
| 4- Reação com Hidróxidos Alcalinos | + |
| 5- Reação com AlCl ₃ | + |
| 6- Reação com FeCl ₃ | + |
| <i>Reação de Caracterização para Heterosídeos Antraquinônicos</i> | Resultado |
| 1- Reação de Borntträger Indireta | - |
| <i>Reação de Caracterização para Cumarinas</i> | + |
| <i>Reação de Caracterização para Taninos</i> | Resultado |
| 1- Reação com gelatina | - |
| 2- Reação com sulfato de quinino 1% (v/v) | - |
| 3- Reação com solução de brucina 1% (p/v) | - |
| 4- Reação acetato de cobre 4% (p/v) | - |
| 5- Reação com cloreto férrico 2% (p/v) | - |
| 6- Reação hidróxido de sódio 20% (p/v) | - |
| <i>Reação de Caracterização para Alcaloides</i> | R esultado |
| 1- Reativo de Mayer | - |
| 2- Reativo Dragendorff | - |
| 3- Reativo de Bouchardat | - |
| 4- Reativo de Bertrand | - |
| 5- Reativo de Hager | - |

| | |
|---|------------------------|
| 6- Ácido Tânico | - |
| Reação de Caracterização para Heterosídeos | |
| Cardioativos | R Resultado |
| 1- Reação de Liebermann-Burchard | + |
| 2- Reação de Pesez | + |
| 3- Reação de Keller-Kiliani | + |
| 4- Reativo de Kedde | - |
| Reação de Caracterização para Saponinas | |
| 1- Formação de espuma com altura de 1,0 cm | R Resultado |
| | - |

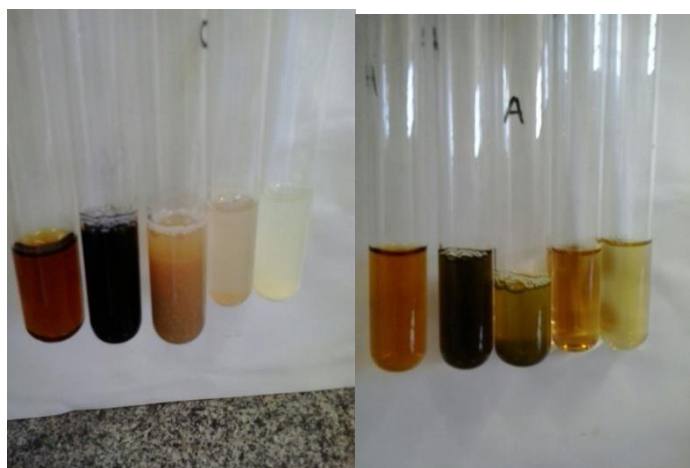
Fonte: de autoria própria (2024)

Legenda: (+) presença (-) ausência

O resultado negativo na reação de Bornträger Indireta e desenvolvimento de forte fluorescência azulada, sob luz ultravioleta na fração etérea do extrato com NaOH 1 mol L⁻¹ indicam, respectivamente, ausência de antraquinonas e presença de cumarinas na planta.

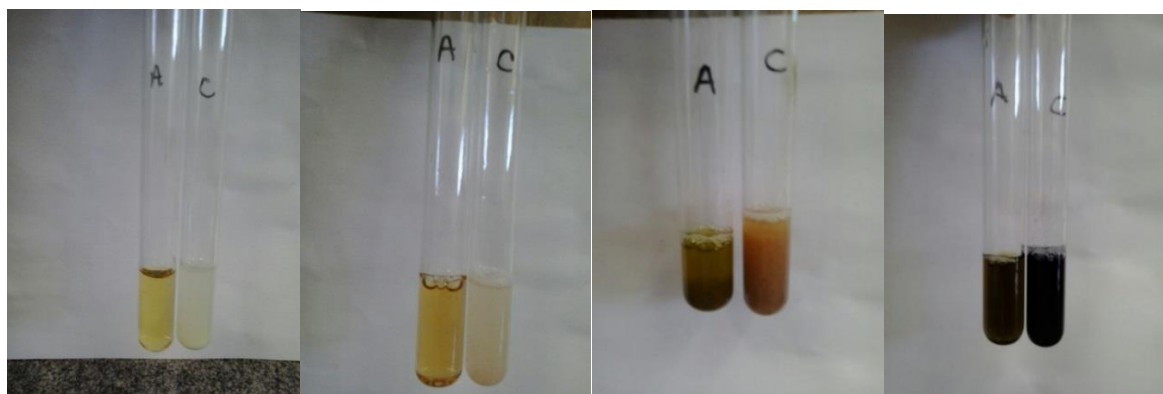
As figuras abaixo demonstram os resultados para pesquisa de taninos.

Figura 6: Reações de caracterização de Taninos: controle positivo (à esquerda) e resultados para a amostra (a direita). Os reagentes utilizados em cada bateria, tanto para controle positivo como para amostra, da direita para esquerda foram: sulfato de quinino 1% (v/v); solução de brucina 1% (p/v); acetato de cobre 4% (p/v); cloreto férrico 2% (p/v); hidróxido de sódio 20% (p/v).



Fonte: Peixoto, J.C. 2023

Figura 7: Reações de caracterização de Taninos com alcaloides: sulfato de quinino 1% (v/v) – (à esquerda); solução de brucina 1% (p/v) (à direita).



Fonte: Peixoto, J.C. 2023

Legenda: A – amostra; C – controle positivo.

5.3. Ensaio microbiológicos

Os resultados para o teste de viabilidade como controle da técnica do ensaio microbiológico utilizando cloranfenicol encontram-se destacados na tabela 3.

Tabela 3. Concentração Mínima Inibitória - CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do antibiótico cloranfenicol frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas das cepas ATCC testadas.

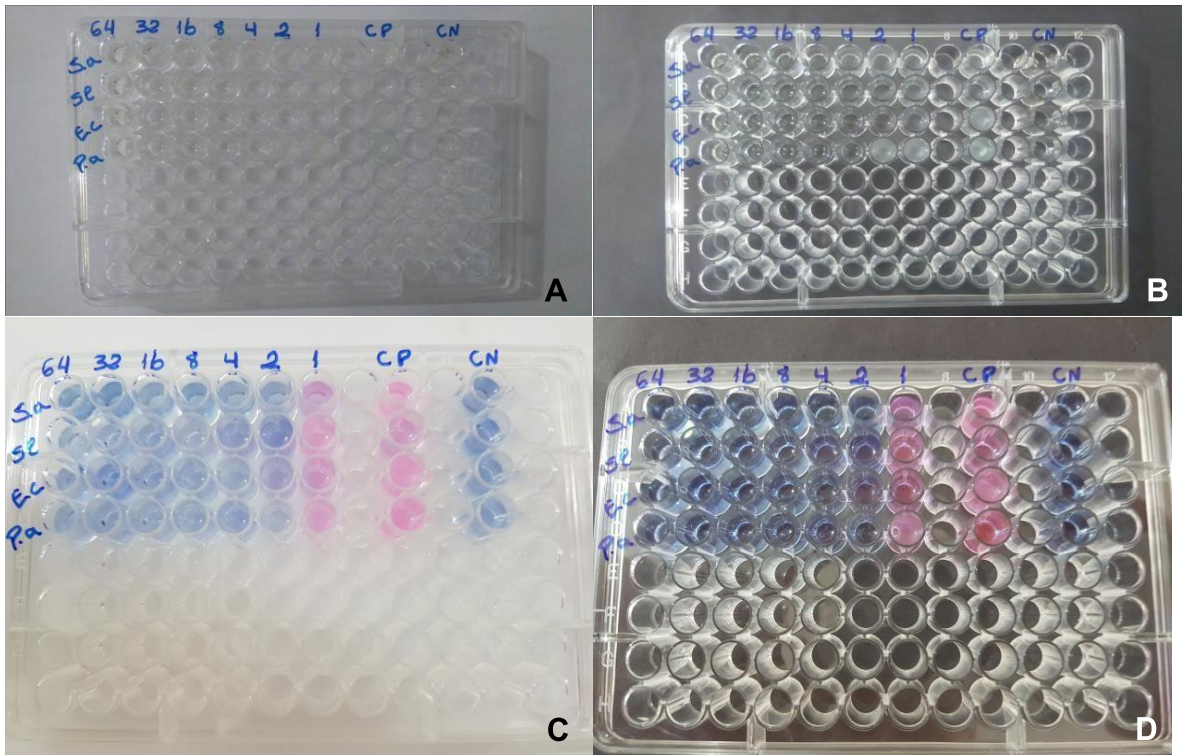
| <i>Bactérias testadas</i> | <i>Cloranfenicol ((mg mL⁻¹))</i> |
|--|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 2 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | 2 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25312 | 2 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 2 |

Fonte: de autoria própria (2024)

Legenda: ATCC = *American Type Culture Collection*

A figura 8 ilustra esquema geral da placa utilizada como controle da técnica com cloranfenicol após as diluições e inoculações, antes e depois da adição da resazurina como revelador visual de viabilidade bacteriana.

Figura 8 – Esquema da placa de 96 poços após diluições e inoculações conforme metodologia para o controle de viabilidade da técnica utilizando cloranfenicol.



Fonte: Peixoto, J.C. 2023

Legenda: A – B: placa antes da adição de resazurina, A – fundo claro, B – fundo escuro; C – D: placa após a adição da resazurina, C – fundo claro, D – fundo escuro.

Os resultados da concentração mínima inibitória (CMI) do ensaio microbiológico para avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico do caule estão elencados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração Mínima Inibitória - CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato etanólico do caule frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas das cepas ATCC testadas.

| <i>BACTÉRIAS TESTADAS</i> | <i>E</i> <i>E ((mg mL⁻¹))</i> |
|--|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 12 |
| | 5 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 | 12 |
| | 5 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25312 | > |
| | 2000 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 10 |
| | 00 |

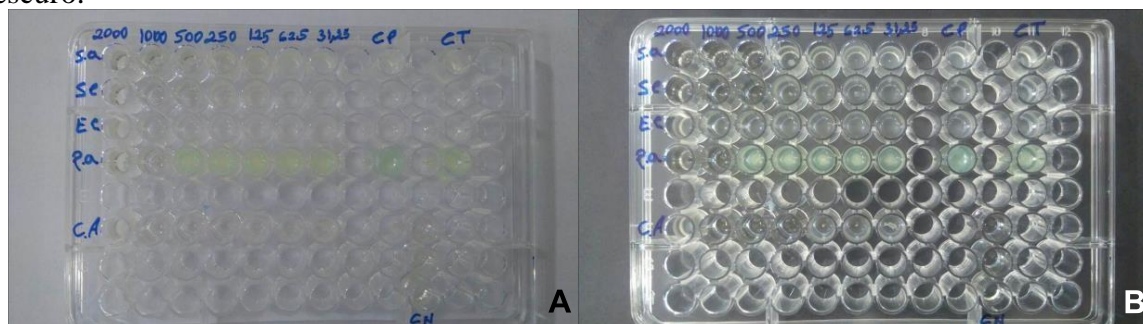
Fonte: de autoria própria (2024)

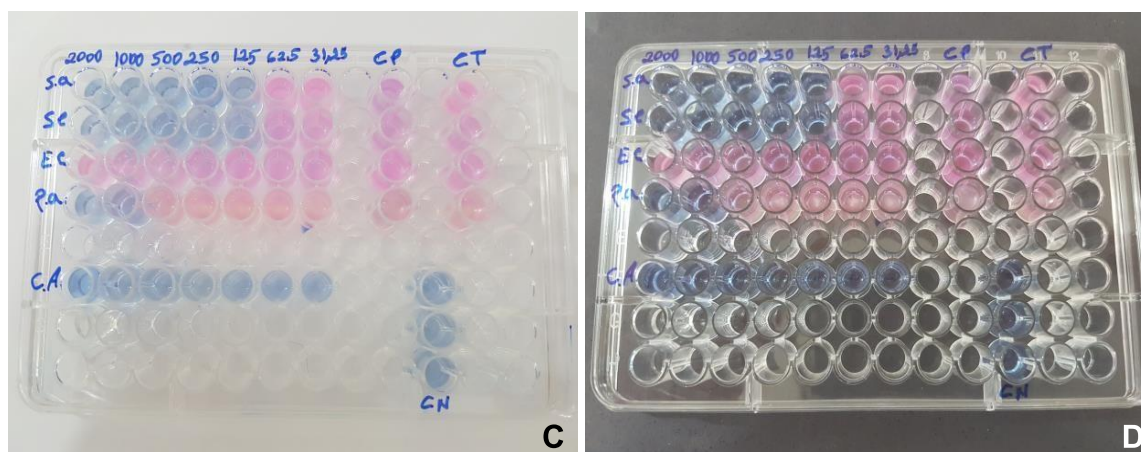
Legenda: ATCC = *American Type Culture Collection*; EE = extrato etanólico.

Utilizou-se a classificação de Holetz *et. al.* (2002) para a determinação da atividade antimicrobiana da amostra do óleo testada. De acordo com esta classificação, amostras que apresentam CMI menor que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ possuem boa atividade antimicrobiana, amostras com CMI entre 100 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ possuem atividade antimicrobiana moderada, amostras com CMI entre $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ possuem atividade fraca e aqueles que possuem atividade antimicrobiana acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados inativos.

A figura a seguir 9 ilustra esquema geral da placa utilizada no ensaio biológico para determinação da concentração mínima inibitória da amostra do extrato etanólico do caule testada após as diluições e inoculações, antes e depois da adição da resazurina como revelador visual de viabilidade bacteriana.

Figura 9 – Esquema da placa de 96 poços após diluições e inoculações conforme metodologia para o ensaio microbiológico para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) extrato etanólico. A – B: placa antes da adição de resazurina, A – fundo claro, B – fundo escuro; C – D: placa após a adição da resazurina, C – fundo claro, D – fundo escuro.





Fonte: Peixoto, J.C. 2023

Legenda: A – B: placa antes da adição de resazurina, A – fundo claro, B – fundo escuro; C – D: placa após a adição da resazurina, C – fundo claro, D – fundo escuro.

6. DISCUSSÃO

Na prospecção fitoquímica realizada com o caule de *Cnidoscolus vitifolius* pôde-se constatar a presença dos seguintes metabólitos secundários: flavonoides, compostos fenólicos, presença de núcleo esteroide e desoxiaçúcares, além da presença de cumarinas. Segundo trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2000) e Lima (2017), houve resultados semelhantes aos encontrados neste estudo, sugerindo que as propriedades farmacológicas atribuídas à planta devem ser induzidas por diferentes princípios ativos, possivelmente as cumarinas.

A presença destas cumarinas são importantes. Excetuando-se a 1,2-benzopirona, todas as cumarinas são substituídas por um grupo hidroxila na posição 7. A 7-hidróxi-cumarina, também conhecida como umbeliferona é a precursora das cumarinas di e tri hidroxiladas. A pesquisa sobre a atividade das cumarinas foi, em alguns casos, o ponto de partida para a descoberta de novos medicamentos. O dicumarol, por exemplo, ainda hoje utilizado como raticida devido sua atividade sobre a inibição da coagulação do sangue, foi descoberto durante a investigação sobre uma doença hemorrágica no gado alimentado com melioto [*Melilotus officinalis* (L.) Pallas] (trevo-de-cheiro-amarelo) fermentado. Esta atividade guiou a pesquisa que desenvolveu a varfarina, um anticoagulante oral (CAMPOS; CUNHA, 2005; VENÂNCIO, 2009; LEAL; SILVA; FONSECA, 2010).

Outros estudos sobre ensaios fitoquímicos realizados com o extrato metanólico de *Cnidoscolus vitifolius*, por meio de testes gerais de identificação e cromatografia em camada delgada (CCD), mostraram-se positivos com relação à presença de cumarinas, flavonoides, esteroides e triterpenoides, e negativos para alcaloides (CORRÊA, 2013). Estudos cromatográficos e métodos espectrofotométricos realizados com *Cnidoscolus* sp. caracterizaram derivados cumarínicos [1,2-benzopirona (cumarina), 7-hidroxi-cumarina (umbeliferona)], assim como derivados do ácido fenilpropiônico (FONSECA, 2009; CORRÊA, 2013). Essas duas cumarinas são amplamente referidas na literatura, e são citadas como dois dos possíveis constituintes bioativos desta espécie (MOURA, 2016), sendo sugeridas como as principais responsáveis pela bioatividade de espécies do gênero *Cnidoscolus vitifolius* (MACRAE; TOWERS, 1984; DE VRIES; MILLS; PASCOE; CHAMBERS, 1986; TAUCHER; JOSHI, 1988; LINO *et al.*, 1997).

A concentração de cumarinas nas partes aéreas da planta é proporcional à intensidade de radiação solar incidente durante seu cultivo, e folhas vermelho-vináceas possuem maior teor de cumarinas totais comparadas às verdes. No entanto, uma maior

incidência de radiação solar durante o primeiro mês de desenvolvimento da planta afeta de forma negativa seu crescimento, ocasionando menor rendimento da biomassa. (BARROS; ANDRADE; SILVA, 1997).

As cumarinas atualmente são estudadas para suas atividades antibacteriana (FERREIRA *et al.*, 2015), antiviral (NEYTS *et al.*, 2009), antifúngica (KHAN *et al.*, 2004), antiparasitária (MISRA *et al.*, 2015), anticâncer (SASHIDHARA *et al.*, 2010), anti-inflamatória (KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2015), antidislipidêmica (SASHIDHARA *et al.*, 2010b), anticolinesterásica (KURT *et al.*, 2015) e vasodilatadora (BERTIN *et al.*, 2014). Algumas exercem também efeito central, como as diidropirano-cumarinas, que exercem efeito neuroprotetor e furanocumarinas que mostram possuir efeito antidepressivo (VENÂNCIO, 2009).

Os resultados da prospecção fitoquímica também demonstraram a presença de heterosídeos flavonoides no caule de *Cnidocolus vitifolius*. Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais relevantes e diversificados entre os produtos de origem natural. São responsáveis pelo aroma dos alimentos e pela coloração das flores, atuando também na defesa química das plantas contra fungos e bactérias. Estão presentes em todas as plantas vasculares, distribuídos principalmente nas partes aéreas dos vegetais, como flores e folhas (HARBORNE, 1984). Nas folhas, são considerados os principais pigmentos que absorvem luz U.V. além de serem os mais comuns (PIETTA *et al.*, 1989).

As atividades medicinais dos heterosídeos flavonoides são muito variadas, entretanto, alguns resultados apontam para o tratamento de doenças circulatórias, hipertensão, agindo como co-fator de vitamina C. Além disso, esses compostos possuem também importância farmacológica, com propriedades atribuídas a alguns representantes da classe dos flavonoides, como: antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, atividade hormonal e anti-hemorrágicas (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017).

Andrade *et al.* (2012) verificaram efeito inibitório dos óleos essenciais de *Cymbopogon nardus* (citronela), *Cinnamomum zeylanicum* (canela) e *Zingiber officinale* (gengibre) sobre o crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os autores inferiram que os óleos obtidos das três espécies apresentaram atividade antibacteriana para todas as cepas avaliadas, com exceção da *Escherichia coli*, cujo crescimento só foi inibido pelo óleo extraído de *C. zeylanicum*.

Foi observado, por Chariandy *et al.* (1999), em ensaio de triagem de plantas medicinais com propriedades antimicrobianas realizado em Trinidad e Tobago, que a fração éter de petróleo, do extrato de espécies do gênero *Cnidocolus* apresentou atividade antimicrobiana acentuada contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Salmonella typhimurium*, e a fração acetato de etila para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. typhimurium*.

Vera *et al.* (2007) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato aquoso e orgânico (acetato de etila e etanol) de *Cnidocolus vitifolius* cultivadas em Tolima, Colômbia. Para os extratos testados, registrou-se um único halo de inibição sobre *S. aureus* correspondente à fração acetato de etila.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pesquisas fitoquímicas são importantes para obtenção de matéria-prima farmacêutica e na descoberta de substâncias ativas de plantas como protótipos de fármacos para a obtenção e desenvolvimento de fitoterápicos. Desta forma, a identificação de compostos provenientes do metabolismo secundário de plantas medicinais, por meio de estudos de prospecção fitoquímica, constituem testes de grande importância na análise de drogas vegetais de interesse medicinal e são parâmetros de controle de qualidade.

Considerando a riqueza da flora medicinal do Cerrado e, especialmente espécies do gênero *Cnidocolus*, é importante que pesquisas ligadas à farmacognosia contribuam com o conhecimento do potencial terapêutico, bem como de possíveis riscos oriundos da utilização para fins medicinais, já que a literatura apresenta escassez de estudos farmacognósticos e de ação farmacológica direcionados a estas espécies.

Baseando-se nos constituintes químicos encontrados na amostra do caule de *Cnidocolus vitifolius* constatou-se que a mesma segue o padrão da família Euphorbiaceae, uma vez que, para as seguintes classes de metabólitos secundários: heterosídeos flavonoides, taninos, esteroides, bem como cumarinas, a presente pesquisa está em conformidade com os estudos já realizados para outras espécies, indicando-os como potenciais marcadores quimiotaxonômicos. Entretanto, os resultados desta pesquisa para heterosídeos antraquinônicos e cardioativos, alcaloides e saponinas, apresentaram divergência com a análise fitoquímica realizada por outros autores, evidenciando a necessidade na continuidade de estudos que investiguem a presença destes metabólitos na espécie.

Assim, sugere-se a realização de procedimentos fitoquímicos mais específicos para que os compostos de interesse sejam elucidados, bem como análises de cunho farmacológico que muito contribuirão para a validação da utilização destes na terapêutica.

O extrato obtido do caule de *Cnidocolus vitifolius* apresenta potencial ação antibacteriana, uma vez que, apesar de uma cepa de *Escherichia coli* ter demonstrado resistência (baixa susceptibilidade), o extrato apresentou ação antibacteriana sobre *Pseudomonas aeruginosa* e moderada atividade antibacteriana sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Sugere-se a continuidade dos estudos que avaliem a atividade antibacteriana de extratos metanólicos e hexânicos em outras concentrações e com emprego de microrganismos oriundos de um espectro mais amplo de infecções, que deverão fornecer

resultados que indiquem de maneira mais precisa à real aplicabilidade desses extratos. Além disso, faz-se necessário a realização de estudos toxicológicos adequados para verificar a possibilidade do uso seguro no combate a infecções frente a esses microrganismos.

Apesar de incipiente, este trabalho pode abrir perspectivas no sentido de desenvolver um fitoterápico eficaz e de baixo custo, podendo ser usado no tratamento de doenças infecciosas como uma alternativa aos antibióticos sintéticos na Medicina.

8. REFERÊNCIAS

- AMPARO, T.R. *et al.* Métodos Para Avaliação In Vitro Da Atividade Antimicrobiana De Plantas Mediciniais: A Necessidade Da Padronização. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 1, p. 50–59, 2018.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. das G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- BARROS, R. F. M.; ANDRADE, L. H. C.; SILVA, N. H. Concentração de cumarinas em folhas de *Justicia pectoralis* var. *stenophylla* Leonard com diferentes colorações. **Phyton**, v. 60, n.1/2, p. 141-145, 1997.
- BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSOON, E.; LARSSON, D.G.J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, 2017.
- BERTIN, R.; CHEN, Z.; MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; GARCIA-ARGAÉZ, A.; FROLDI, G. Vasodilation and radical-scavenging activity of imperatorin and selected coumarinic and flavonoid compounds from genus *Casimiroa*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 586-594, 2014.
- BIJEKAR, S.; GAYATRI, M.C. Ethanomedicinal properties of Euphorbiaceae family - A comprehensive review. **Int. J. Phytomedicine**, v. 6, p. 144–156, 2014.
- BISSO, B.N. *et al.* Triagem fitoquímica, atividades antioxidantes e antimicrobianas de sete plantas medicinais pouco investigadas contra patógenos microbianos. **Avanços em Ciências Farmacológicas e Farmacêuticas**, v. 2022, p. 1-8, 2022.
- BONA, E.A.M.D. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.
- BRASIL. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos. Série B: textos básicos de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, 5.ed., v.1, p. 192. Brasília, DF: ANVISA, 2010.
- CAMPOS, M. G.; CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.
- CASTRO, H. **Cerrado e Plantas Mediciniais: Algumas Reflexões sobre o Uso e a Conservação**. ORIENTADORA: Alessandra A. Viveiro. 2011. 30f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Naturais) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- CHAMBERS, H.F.; DELEO, F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 629–641, 2009.

CHARIANDY, C. M.; SEAFORTH, C. E.; PHELPS, R. H.; POLLARD, G. V.; KHAMBAY, B. P. S. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 265-270, 1999.

CLARDY, J.; FISCHBACK, M.A.; WALSH, C.T. New antibiotics from bacterial natural products. **Nature Biotechnology**, v.24, n.12 p.1541-1550, 2006.

CONTRERAS-OMAÑA O.R.; ESCORCIA-SAUCEDO A.E.; VELASCO J.A.V.R. Prevalence and impact of antimicrobial resistance in gastrointestinal infections: A review. **Revista de Gastroenterología de México**, v. 86, n. 3, p. 265–275, 2021.

CORRÊA, G. M. **Estudo fitoquímico de Justicia acuminatissima (Acanthaceae): caracterização química, avaliação biológica, contaminação fúngica e detecção de produtos radiolíticos**. 2013. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências-Química), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

COSTA, A. F. Farmacognosia. 3.ed. v. 3 Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001.

CREPALDI, C.G. *et al.* Richness and ethnobotany of the family Euphorbiaceae in a tropical semiarid landscape of Northeastern Brazil. **South African J. Bot.** v. 102, p. 157–165, 2016.

CUNHA, R. *et al.* Ethnobotanic, phytochemical uses and ethnopharmacological profile of genus *Cnidocolus* spp. (Euphorbiaceae): A comprehensive overview. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1670–1679, 1 jan. 2019.

DA SILVA, M.S.M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado**. Orientador: Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista. 2013. 115f. Dissertação - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2013.

DE MELO, A.L.; DE SALES, M.F. O gênero *Cnidocolus* Pohl (Crotonoideae-Euphorbiaceae) no Estado de Pernambuco, Brasil. **Acta bot. Bras.** v. 22, n. 3, p. 806–827, 2008.

DE OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G. *et al.* Phytochemical and pharmacological aspects of *Cnidocolus* Pohl species: A systematic review. **Phytomedicine**, v. 50, p. 137–147, nov. 2018.

DE VRIES, J. X.; TAUCHER, B.; JOSHI, B. S. Constituents of *Justicia pectoralis* Jacq. gas chromatography/mass spectrometry of simple coumarins, 3-phenylpropionic acid and their hydroxyl and methoxy derivatives. **Biomed Environ Mass Spectrom**, v. 15, p. 413-417, 1988.

ESSER, H.J. The tribe Hippomaneae (Euphorbiaceae) in Brazil. **Rodriguesia** v. 63, p. 209–225, 2012.

FERREIRA, S. Z. *et al.* Synthesis of a new peptide-coumarin conjugate: a potential agent against Cryptococcosis. **ACS Med Chem Lett**, v. 6, p. 271-275, 2015.

FONSECA, F. N. **Desenvolvimento tecnológico de fitoproduto a partir de *Justicia pectoralis* – chambá: obtenção do extrato seco padronizado (CLAE-DAD) e avaliação**

farmacológica. 2009. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

GIL-GIL, T. *et al.* Antimicrobial resistance: A multifaceted problem with multipronged solutions. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 11, 2019.

GIONO-CEREZO, S.; IGNACIO, S.P.J; MORFÍN-OTERO, M.D.R.; Resistencia antimicrobiana: Importancia y esfuerzos por contenerla. **Gaceta Médica de México**, v. 156, n. 2, 2020.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: a importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HARBORNE, J. B. The plant and its biochemical adaptation to the environment, introduction to ecological biochemistry. **London Academic Press**, p. 1-27, 1984.

HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027- 1031, 2002.

HUEMER, M., *et al.* Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. **EMBO reports**, v. 21, n. 12, 2020.

HURBATH, F.; SANTOS, D.; ROQUE, N. Euphorbiaceae na Serra Geral de Licínio de Almeida, Bahia, Brasil. *Rodriguésia - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, v. 67, n. 2, p. 489–531, 2016.

HUTCHINGS, M.I.; TRUMAN, A.W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.

KATZUNG, B. G. **Basic & clinical pharmacology**. 14. ed. Ed. Mc Graw Hill, New York. p. 941-953, 2018.

KHAN, K. M. *et al.* Synthesis of coumarin derivatives with cytotoxic, antibacterial and antifungal activity. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 19, n. 4, p. 372-379, 2004.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Synthesis and anti-inflammatory activity of coumarin derivatives. **J Med Chem**, v. 48, n. 20, p. 6400-6408, 2005.

KUBITZKI, K. The families and genera of vascular plants: Flowering plants eudicots - Malpighiales, **Springer**, v. 51, 2014.

KURT, B. Z.; GAZIOGLU, I.; SONMEZ, F.; KUCUKISLAMOGLU, M. Synthesis, antioxidant and anticholinesterase activities of novel coumarylthiazole derivatives. **Bioorg Chem**, v. 59, p.80-90, 2015.

LEAL, L. K. A. M.; SILVA, A. H.; FONSECA, F. N. *Justicia pectoralis* Jacq., Acanthaceae: preparation and characterisation of the plant drug including chromatographic analysis by HPLC-PDA. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n 6, p. 871-877, 2010.

- LENNETTE, E. H. *et al.* Manual of Clinical Microbiology. **American Society for Microbiology**, p. 1149, 1985.
- LEWIS, K. The Science of Antibiotic Discovery. **Cell**, v. 181, n. 1, p. 29-45, 2020.
- LIMA, A. R. S. **Desenvolvimento tecnológico de extratos padronizados em cumarinas das partes aéreas de Justicia pectoralis Jacq. (ACANTHACEAE)**, 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde (CAPS), Universidade Estadual de Goiás, Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Anápolis, GO, 2017.
- LINO, C. S.; TAVEIRA, M. L.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory activities of Justicia pectoralis Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Res.**, v. 11, p. 211-215, 1997.
- LISTER, P.D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. Antibacterial-Resistant Pseudomonas aeruginosa : Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 582–610, 2009.
- MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Justicia pectoralis: a study of the basis for its use as hallucinogenic snuff ingredient. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, n. 1, p. 93-111, 1984.
- MARMITT, D.J. *et al.* Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática. **Rev. Saúde Públ. Santa Cat.**, v. 8, n. 2, p. 135-152, 2015.
- MARTINS, M.P. **Contribuição ao estudo metabolômico de espécies do gênero Cnidioscolus (Euphorbiaceae) da região do Cerrado e da Caatinga**. Orientador: Lucilia Kato. 2022, 165f. Tese Doutorado em Química, Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2022.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: Editora da UFC, 1988.
- MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. **Farmacognosia**. Fortaleza: Editora da UFC, 1989.
- MENDONÇA, A.T., *et al.* A utilização dos extratos hidroalcoólico e alcoólico de *Eugenia uniflora L.* como agente antimicrobiano. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 14, n. 1, p. 826-833, 2016.
- MILLS, J.; PASCOE, K. O.; CHAMBERS, J. Preliminary investigations of the wound-healing properties of a Jamaica folk medicinal plant (Justicia pectoralis). **West Indian Medical Journal**. Kingston, v. 35, p. 190-193, 1986.
- MISRA, S. *et al.* Synthesis and biological evaluation of 4-oxycoumarin derivatives as a new class of antifilarial agents. **Eur J Med Chem**, v. 94, p. 211-217, 2015.
- MOTA, F.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana *in vitro* de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae (“macela”, “marcela”) sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 13, n. 3, p. 298-304, 2011.

MOURA, C. T. M. **Envolvimento de vias capacitativas de cálcio nos efeitos inibitórios do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* na hiperreatividade traqueal induzida por desafio antigênico.** 2016. 169 f. Tese (Doutorado em Farmacologia), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

NEYTS, J. *et al.* Structure-activity relationship of new anti-hepatitis C virus agents: heterobicyclic-coumarin conjugates. **J Med Chem**, v. 52, p. 1486-1490, 2009.

OLIVEIRA, A. F. M. *et al.* Screening cromatográfico de Acanthaceae medicinais: *Justicia pectoralis* e *J. gendarussa* Burm. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 3, n. 1, p. 37-41, 2000.

OSTROSKY, E.A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PEREIRA, C.K.B. **Estudo químico e atividades microbiológicas de espécies do gênero *Psidium* (Myrtaceae).** 2010. 120f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular. Universidade Regional de Cariri, Cariri, CE, 2010.

PEREIRA, M.S.V. *et al.* Study on methods used to determine the antimicrobial activity of medicinal plants extracts: clearance and limitations of the techniques. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 26085–26104, 2022.

PIETTA, P. G.; MAURI, P. L.; MANERA, E.; CEVA, P. L.; RAVA, A. An improved HPLC determination of flavonoids in medicinal plant extracts. **Chromatography**, v. 27, p. 509-512, 1989.

PITOUT, J.D.; LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 159–166, 2008.

RITTER, J.M. *et al.* **Rang & Dale Farmacologia.** 9 ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. p. 660-677, 2022.

SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H., *et al.* Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.

SANTANA M. T. *et al.* Medicinal Plants in the Treatment of Colitis: Evidence from Preclinical Studies. **Planta Medicine**. v. 83 p. 588-614, 2017.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, p. 321– 24, 2007.

SASHIDHARA, K. V.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; SARKAR, J.; SINHA, S. Synthesis and in vitro evaluation of novel coumarin-chalcone hybrids as potential anticancer agents. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 24, p. 7205-7211, 2010a.

SASHIDHARA, K. V.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; SRIVASTAVA, A.; PURI, A. Synthesis and antihyperlipidemic activity of novel coumarinbisindole derivatives. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, p. 6504-6507, 2010b.

SÁTIRO, L.N., ROQUE, N. A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 22, p. 99–118, 2008.

SHARMA, A. *et al.* Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 208, p. 264–329, 2017.

SILVA, A.F.; RABELO, M.F.R.; ENOQUE, M.M. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 1016–1030, 2015.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; CHINARELLI, S. H. R. Manutenção de leveduras por congelamento a -200°C. **RBAC**, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Ed. Guanabara Kogan, Bahia. p. 147-159, 2010.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

STOKES, J.M. *et al.* A Deep Learning Approach to Antibiotic Discovery. **CellPress**, v. 180, n. 4, p. 688-702, 2020.

STROTHMANN A.L., *et al.*, Antiparasitic treatment using herbs and spices: A review of the literature of the phytotherapy. **Brazilian journal of Veterinary Medicine**. v. 44, 2022.

UGBOKO, H. U., *et al.* Importância antimicrobiana das plantas medicinais na Nigéria. **The Scientific World Journal**, p. 1-10, 2020.

VENÂNCIO, E. T. **Estudo dos efeitos comportamentais e neuroquímicos do extrato padronizado de Justicia pectoralis (chambá) em camundongos**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

VERA, J. R.; PASTRANA, P. F.; FERNÁNDEZ, K.; VIÑA, A. Actividad antimicrobiana in vitro de volátiles y no volátiles de Lippia alba y extractos orgánicos y acuoso de Justicia pectoralis cultivadas en diferentes pisos termicos del departamento del Tolima. **Scientia et Technica - UTP**. ISSN 0122-1701, Año XIII, n. 33, 2007.

VILLA, J.; MORENO-MORALES, J.; BALLESTÉ-DELPierre, C. Current landscape in discovery of novel antibacterial agents. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n.5, p. 596-603, 2020.

WAWROSCHE, C.; ZOTCHEV, S.B. Produção de metabólitos secundários de plantas bioativas por meio de tecnologias in vitro - status e perspectivas. **Micrrobiologia Aplicada e Biotecnologia**, v. 105, p. 6649-6668, 2021.

WEBSTER, G.L. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. **Ann. Missouri Bot. Gard.**, v. 81, n. 33, 1994.

WINTER, M., *et al.* Antimicrobial resistance acquisition via natural transformation: context is everything. **Current Opinion in Microbiology**, v. 64, p. 133–138, 2021.

WOHLLEBEN, W., *et al.* Antibiotic drug discovery. **Microbial Biotechnology**, v. 9, p.541-548, 2016.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 209-234.