



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO- UFRPE
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA- UAST

PAULO SÉRGIO DA SILVA PEREIRA

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Schinopsis brasiliensis* ENGL.**

Serra Talhada-PE, 2019

PAULO SÉRGIO DA SILVA PEREIRA

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Schinopsis brasiliensis* ENGL.**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Carlos André de Souza

Serra Talhada-PE, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

P436p Pereira, Paulo Sérgio da Silva

Prospecção química e avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* ENGL / Paulo Sérgio da Silva Pereira. – Serra Talhada, 2019.

46f.: il.

Orientador: Carlos Andre de Souza

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2019.

Inclui referências.

1. *Schinopsis brasiliensis*. 2. Plantas medicinais. 3. Compostos bioativos.
I. Souza, Carlos Andre de, orient. II. Título.

CDD 540

PAULO SÉRGIO DA SILVA PEREIRA

**PROSPECÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO
EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Schinopsis brasiliensis* ENGL.**

Monografia apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Licenciado em Química.

Aprovada em 23 de maio de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos André de Souza – UFRPE- UAST

Orientador

Prof. Dr. Rogério de Aquino Saraiva – UFRPE- UAST

1ª Avaliador

Prof. Dr. Virgínia Medeiros de Siqueira– UFRPE- UAST

2ª Avaliador

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais e a minha irmã, por toda força e dedicação para a minha formação

AGRADECIMENTOS

A minha mãe por ser um exemplo de empatia, força e inteligência; ao meu pai por sempre me demonstrar que o caminho certo é o do trabalho duro, honestidade e coragem e que através disto os meus sonhos poderiam ser realizados; a minha irmã pelo companheirismo e exemplo de capacidade intelectual; aos meus primos, em especial Kleber, que me ensinou lições que guardarei por toda a vida. Espero a todos não decepcionar.

A todos os meus amigos, em especial os que sempre estiveram comigo, me dando coragem e força, mesmo quando ela se esvaía de vocês; em especial Sinval que sempre esteve comigo, aconselhando e vivenciando todos os problemas que o destino não se cansou de nos oferecer, você é um irmão que Deus me deu. A Davi, que sempre me motivou a seguir os meus sonhos por mais loucos que fossem; se eu tive coragem de recomeçar e seguir em um curso que tenho orgulho todos os dias de pertencer, foi porque você esteve comigo, sem medir esforços para ajudar-me nos momentos em que mais precisei; a Amanda por pintar o meu mundo quando ele não tinha mais cores e por demonstrar-me que realmente ao lado de um homem que almeja ser grande, tem uma mulher de força e garra para conquistar o mundo; a John que se tornou um grande amigo; a Idalina que sem dúvidas temos uma amizade que ultrapassa as gerações e o tempo; a Lilian, pela qual tenho enorme carinho e gratidão.

Aos meus amigos do jiu-jitsu e meu professor Ramom, que me demonstraram que por mais que um caminho possa ser íngreme e difícil, com companheirismo ele se torna mais fácil, muito obrigado.

Aos meus professores, em especial o meu orientador Carlos André, por sempre estar disposto a me auxiliar. Eu sei que não foi fácil no início, você aceitou orientar uma pessoa que não se demonstrava brilhante, mas sempre demonstrou acreditar no meu potencial e isso me deu forças para sempre buscar o meu melhor. Se hoje recebo algum elogio no meu ambiente profissional, foi porque você me lapidou. Muito obrigado por me demonstrar a complexidade e beleza da ciência. À professora Virginia, que considero como uma segunda orientadora no meu projeto de iniciação científica, muito obrigado por me salvar tantas vezes e por sempre ter tempo para sanar as minhas dúvidas.

Aos professores do grupo GEPeQ, por sempre estarem dispostos a avaliar as minhas apresentações e contribuir para o meu trabalho.

Ao grupo NEFP, pelo qual tenho um enorme carinho e dedicação. Obrigado a todos que contribuíram na minha pesquisa de forma indireta ou direta, como Lucas, Valécia e Kathleen; aos meus orientadores: professora Kelem, que me ajudou muito na minha pesquisa mesmo quando estava ocupada, sempre arrumou tempo para esclarecer qualquer dúvida e ao professor Adriano pela disponibilidade de instrumentos e reagentes, e por ser um exemplo de pesquisador comprometido com a ciência.

À FACEPE, pela concessão da bolsa de iniciação científica, à Capes pela bolsa de iniciação à docência e à Universidade Federal Rural de Pernambuco e seus técnicos, em especial a Danilo.

Muito obrigado a todos que contribuíram na minha formação acadêmica, pois ela só foi possível porque tive todos vocês ao meu lado.

“Acreditar significa: libertar em nós o indestrutível, ou mais exatamente, libertar-se, ou mais exatamente, ser indestrutível, ou mais exatamente: ser.”

Franz Kafka

RESUMO

A descoberta dos antibióticos foi um marco para a proteção contra doenças graves, porém com o uso indiscriminado destes medicamentos houve mutações em alguns microrganismos, que desenvolveram certa resistência a alguns medicamentos conhecidos. devido a isso foi necessária a busca por biomoléculas, provenientes de alguns organismos como as plantas, que possuem uma diversidade molecular importante que pode contribuir para a resolução desse problema, tornando-se crucial para o desenvolvimento de novos fármacos. O objetivo deste trabalho foi analisar alguns constituintes químicos das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Baraúna), encontrada no Parque Estadual Mata da Pimenteira localizado no município de Serra Talhada Pernambuco, verificando o seu potencial antimicrobiano. Para isso foi utilizado algumas metodologias disponível na literatura para realização dos testes qualitativos fitoquímicos, quantificação de polifenóis totais, cromatografia líquida de alta eficiência e teste de microdiluição, para verificar e quantificar a capacidade antimicrobiana do extrato etanólico bruto (EEB) da baraúna, ácido gálico, antibiótico (amoxicilina para controle positivo) e mistura entre o antibiótico e EEB da baraúna. Foram identificados nos testes qualitativos fitoquímicosas seguintes classes de compostos: taninos, fenóis, flavonóis, flavononas, flavonoides, flavonas, xantonas e alcalóides. Foram obtidos 571 µg/mL de polifenóis totais, no HPLC foi revelado a presença de ácido gálico e possível identificação de vanilina e ácido caféico. Nos testes microbiológicos do EEB da baraúna e amoxicilina em mistura apresentou concentração de inibição mínima contra todos os microrganismos testados como: *Klebsiella pneumoniae*(1600 µg/mL), *Bacillus subtilis* (800 µg/mL), *Samonella sp.*(1600 µg/mL)e *Escherichia coli* (1600 µg/mL). Pode-se concluir a presença de ácido gálico como componente majoritário além de outras classes de metabolitos secundários. Foi possível comprovar que a melhor atividade sinérgica (extrato + antibiótico) foi para *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

The discovery of antibiotics was a milestone for protection against serious diseases, but with the indiscriminate use of these drugs there were mutations in some microorganisms, which developed some resistance to some known drugs, due to this it was necessary to search for biomolecules from some organisms such as plants, that have important molecular diversity that can contribute to the resolution of this problem, becoming crucial for the development of new drugs. The objective of this work was to analyze some chemical constituents of *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Baraúna), found in the Mata da Pimenteira State Park located in the municipality of Serra Talhada Pernambuco, verifying its antimicrobial potential. For this purpose, some methodologies were used in the literature to perform qualitative phytochemical tests, quantification of total polyphenols, high performance liquid chromatography and multipole agar test to verify and quantify the antimicrobial capacity of the crude ethanolic extract (EEB) of Baraúna, gallic acid, antibiotic (amoxicillin), and a mixture of antibiotic and EEB from barauna. The following phytochemical qualitative tests were identified: tannins, phenols, flavonols, flavonones, flavonoids, flavones, xanthonones and alkaloids. 571 µg / mL of total polyphenols were obtained, the presence of gallic acid and possible identification of vanillin and caffeic acid were revealed in HPLC. Microbiological tests of BSE of barauna and amoxicillin in a mixture showed minimal inhibition concentration against all microorganisms tested as: *Klebsiella pneumoniae* (1600 µg / mL), *Bacillus subtilis* (800 µg / mL), *Samonella sp.* and *Escherichia coli* (1600 µg / ml). It is possible to conclude the presence of gallic acid as a major component in addition to other classes of secondary metabolites. It was possible to prove that the best synergistic activity (extract + antibiotic) was for *Bacillus subtilis*.

SUMÁRIO

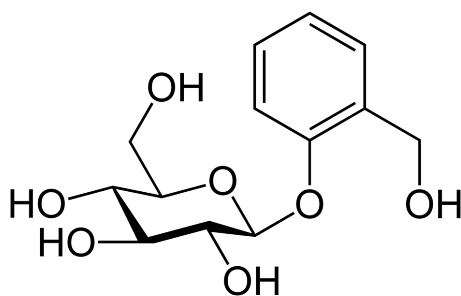
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DA <i>Schinopsis brasiliensis</i> ENGL.	15
2.2 ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS DA <i>Schinopsis brasiliensis</i> ENGL.	17
2.3 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA <i>Schinopsis brasiliensis</i> ENGL.	18
2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA E A BUSCA POR NOVOS ANTIBIÓTICOS.....	20
3. OBJETIVOS.....	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. ESCOLHA DA PLANTA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	23
4.2. ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	23
4.3.1. OPERAÇÕES PRELIMINARES.....	24
4.3.3. TESTE PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONOÍDES	24
4.3.4. TANINOS E FENÓIS	25
5.2.2. TESTE PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONOÍDES	32
5.2.3. TANINOS E FENÓIS	32
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. INTRODUÇÃO

Desde o surgimento das civilizações humanas os produtos oriundos das plantas são empregados para as mais diferenciadas funcionalidades, como alimentação, moradia ou no tratamento de patologias. Através da experimentação e do conhecimento empírico algumas sociedades conseguiram observar padrões entre as doenças e os diferentes tipos de tratamentos, tendo como destaque as sociedades Egípcia, Greco-romana e Chinesa, assim como mencionado por Viegas (2006).

Com o desenvolvimento das civilizações, o conhecimento sobre produtos naturais avançou com passar do tempo, isso foi possível principalmente devido a descoberta de moléculas orgânicas a partir de metodologias sintéticas que foram importantes para o progresso e bem-estar em nossas vidas. Um exemplo, foi a obtenção do ácido acetilsalicílico *Aspirina*®, em 1899 por Felix Hofmann (químico que trabalhava na indústria Bayer), a partir do ácido salicílico (FIORUCCI et al., 2002). Esta molécula é encontrada na casca do salgueiro *Salix alba* que na Roma Antiga, os médicos tratavam as dores de cabeça, de estômago e de ouvido utilizando o extrato dessa planta obtido pela decocção de folhas e da casca (figura 1). VIEGAS, 2006); (LEROUX, 1830)

Figura 1: Salicina (casca do salgueiro)

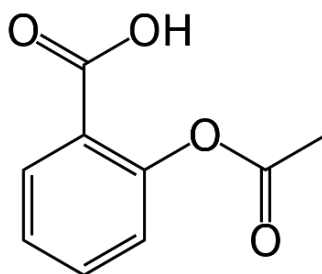


Fonte. digichem.org

A salicina após hidrólise fornece duas moléculas diferentes: a glicose e o álcool salicílico (aglicona), possui um sabor amargo (mesmo com uma molécula de açúcar) e as propriedades farmacológicas conhecidas desde a Antiguidade. Por outro lado, a sua forma oxidada (ácido salicílico) era muito mais potente do que a salicina possuindo propriedades de baixar a febre (antipirético), aliviar a dor (analgésico) e

combater infecções (anti-inflamatório). Sua desvantagem era devido a maior acidez desse composto, que como consequência provocava irritação no estômago. Por isso, para contornar esse problema Hofmann sintetizou o ácido acetilsalicílico *Aspirina*®, a partir da reação entre o ácido salicílico e anidrido acético em meio ácido. Com isso, verificou que era menos irritante a mucosa do sistema digestivo, e após testes em humanos a droga era bem tolerada sem perder suas propriedades farmacológicas (figura 2).

Figura 2: Ácido acetilsalicílico (*Aspirina*®)



Fonte. digichem.org

Assim como no caso da Aspirina, o estudo das interações entre biomoléculas presentes nas plantas e patologias, já comprovou a sua devida importância, pois alguns princípios ativos destes organismos vegetais são utilizados até hoje, porém na sua versão sintética devido aos avanços tecnológicos, da mesma forma que Montanari e Bolzani (2001) destacam sobre o desenvolvimento das pesquisas em produtos naturais.

Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje, ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo de morfina, quinina, cânfora e cocaína. (MONTANARI; BOLZANI, 2001, p.105)

Os mais diferentes tipos de patologias ainda assolam a humanidade, entre elas estão as doenças causadas por microrganismos como os fungos, vírus e bactérias, que por sua vez podem causar doenças mais brandas como a acne ou mais ameaçadoras como a tuberculose provocado pelo *Mycobacterium tuberculosis*.

O desenvolvimento de medicamentos como os antibióticos foram um marco para a proteção contra doenças graves e manutenção da nossa saúde, porém com o uso indiscriminado destes produtos foram provocados mutações em alguns microrganismos, que desenvolveram uma resistência a alguns antibióticos conhecidos; assim como Santos (2004, p. 65) destaca: “O uso indiscriminado de antibióticos aumenta a pressão seletiva e, também, a oportunidade da bactéria ser exposta aos mesmos. Aquela oportunidade facilita a aquisição de mecanismos de resistência.”

Como citado anteriormente, as plantas possuem uma diversidade molecular importante que pode contribuir para a resolução desse problema devido a sua alta resistência contra estes organismos, tornando-se crucial a sua compreensão molecular para o desenvolvimento de novos fármacos.

Os vegetais possuem dois tipos de metabólitos, o primário que está ligado às funções mais básicas para a manutenção de sua sobrevivência (carboidratos, proteínas, lipídios entre outros) e os secundários que possuem a função de atrair polinizadores ou de repelir e matar possíveis ameaças (taninos, flavonóides, alcalóides e etc.). Segundo Gobbo-Neto e Lopes:

“Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais. (Gobbo-Neto, Lopes, 2007, p.374)

Em outras palavras mesmo uma planta sendo bastante pesquisada a mesma pode apresentar compostos químicos e atividades biológicas distintas ou em quantidades diferentes, pois a produção dos metabólitos secundários depende do ecossistema em que as plantas estão inseridas, logo se tornam cruciais pesquisas em diversos locais, tendo em vista que o Brasil é um país territorialmente grande.

O Parque Estadual Mata da Pimenteira que está localizado na região semiárida no município de Serra Talhada-PE, possui aproximadamente 887,24 hectares sendo a vegetação predominante a caatinga, com diversas plantas consideradas medicinais que sofrem com condições que vão desde temperaturas altas a estresse hídrico vem se destacando como um importante local para a realização de pesquisas.

Plantas como *Schinopsis brasiliensis* Engl., conhecida popularmente como baraúna, baúna, braúna-parda e diversos outros nomes. É uma planta com princípios biológicos bastante estudados, porém muitos desses estudos não trazem uma descrição química detalhada dos seus componentes do metabolismo secundário, o que torna importante a realização de mais pesquisas sobre essa planta que poderão proporcionar novas descobertas na área da química.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

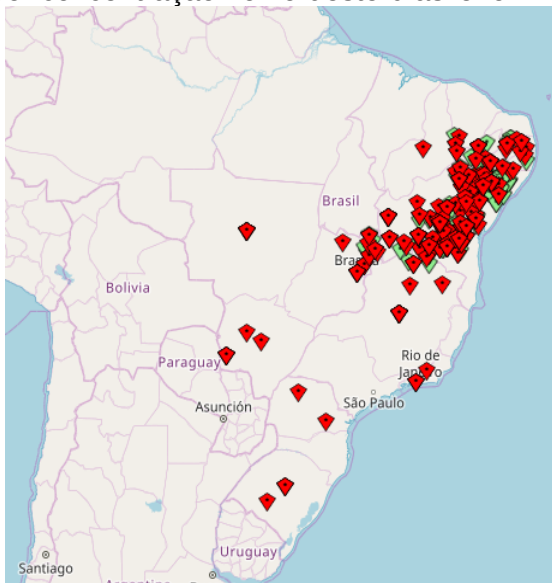
2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DA *Schinopsis brasiliensis* ENGL.

A *Schinopsis brasiliensis* Engl. conhecida popularmente como: braúna, baraúna, baúna, braúna-parda entre diversos outros nomes é uma planta pertencente à família das Anacardiaceae, que possui aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies, encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais por todo o planeta (LUZ, 2011). Nesta família os indivíduos possuem características lenhosas resiníferas, sendo as folhas simples ou compostas, tendo as flores dialipétalas, isostêmones ou obdiplostêmones com ovário súpero, em geral uni ou tricarpelar, porém unilocular e uniovulado, produzindo frutos carnosos ou secos unisseminados (LUZ, 2011).

Um dos gêneros pertencentes a essa família é o *Schinopsis*, sendo constituído por 14 espécies, utilizados principalmente na indústria do couro (curtimento) ou na indústria de madeira devido a sua resistência a umidade, ataque de insetos e radiação ultravioleta (WILLIAMS, MILLER & GNAGSTAD, 2001). Por causa principalmente da sua composição química, as espécies desse gênero possuem uma maior resistência a organismos como os fungo e os cupins. Essa característica é atribuída principalmente a presença de taninos e compostos fenólicos. (WILLIAMS, MILLER & GNAGSTAD, 2001)

A baraúna é um dos representantes mais estudados desse gênero, possivelmente devido à presença em todo o território nacional principalmente na região nordeste, na figura 3 é apresentado os locais atuais onde a mesma foi identificada e registrada no Brasil.

Figura 3: Mapa botânico da Baraúna mostrando a sua distribuição no Brasil, com maior concentração no nordeste brasileiro.



Fonte: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora>>

Esse organismo possui porte arbóreo, podendo se desenvolver até uma altura de aproximadamente 12 metros, e 20 a 60 cm de diâmetro, com ramos dotados de espinhos. As folhas são compostas, imparipinadas, de cor verde escuras na parte superior e pálidas na inferior (BRAGA, 1976). Na figura 4 temos a exsicata da Braúna.

Figura 4: Demonstração morfológica das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. através da sua Exsicata.



Fonte. <<http://www.naturezabela.com.br>>

Na literatura encontra-se diversas pesquisas que comprovam que a mesma é rica em diversos componentes químicos como os taninos, que segundo alguns autores pode ser encontrado em raízes, flores, frutos, folhas, cascas e na madeira, assim como Ribeiro et al. (2014) e Souza (2015) demonstram. Estes componentes servem para proteger as plantas contra os herbívoros e as doenças patogênicas”. Logo o estudo desse organismo, torna-se crucial principalmente em pesquisas que busquem por princípio bioativos.

2.2 ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS DA *Schinopsis brasiliensis* ENGL.

Como citado anteriormente, através da experimentação alguns povos observaram que as plantas podem conter propriedades medicinais contra diversas enfermidades que assolam a humanidade, essa percepção também ocorreu com a família Anacardiaceae, precisamente com a *S. brasiliensis* Engl. São encontrados na literatura, com diversos usos terapêuticos registrados na medicina popular.

A Baraúna é utilizada de diversas formas, como em decoctos das folhas e cascas para o tratamento de dores no estômago e fígado, sendo a sua alcoolatura mais confiável, devido a garantia da preservação das propriedades anti-histéricas e nervostênicas, além do chá da sua casca que segundo a medicina popular pode curar dores no ouvido e de dentes (CARVALHO, 2008; FERNANDES, 2011; CHAVES et al 2011) conforme citado por Oliveira (2018, p. 2).

Devido a Baraúna estar presente principalmente na região nordeste (Figura 3), encontramos maiores relatos da sua utilização pratica nesta região, como na população de Assaré conforme Ribeiro et al. (2014). Em sua pesquisa Ribeiro et al. (2014), revelam que a população do Assaré do estado do Ceará – Brasil, utilizavam a braúna para curar dores no estômago e no fígado através do método de decocção. Este processo também é utilizado para sanar dores na coluna, nos nervos e gripe (JÚNIOR et al., 2014). Em outros municípios a mesma é utilizada como lambedor para o tratamento de doenças gastrointestinais.

Devido ao uso popular deste organismo, os pesquisadores tiveram indícios sobre as suas prováveis propriedade biológicas como mencionado por Chaves et al

(2008), logo diversas pesquisas foram desenvolvidas visando a busca de biomoléculas com princípios bioativos nas diferentes áreas do conhecimento.

2.3 COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA *Schinopsis brasiliensis* ENGL.

Devido principalmente ao uso popular desta planta, diversas pesquisas científicas estão sendo realizadas com o intuito de demonstrar e comprovar que esse organismo possui as mais diferenciadas propriedades biológicas, algumas delas estão expressas na Tabela 1. Como podemos perceber diversos organismos citados são patogênicos.

Tabela 1: Algumas pesquisas realizadas na atualidade que confirmam a atividade microbiológica da Baraúna.

Atividade Biológica	Tipos de extratos	Microorganismo	Referências
Antifúngica	Hidroalcoólico	<i>Candida albicans</i>	Raimundo e Toledo (2016)
	Etanólico		Jovito (2016)
Antibacteriano	Etanólico em partição com: Hexano, Clorofórmio e Acetato de etila	<i>Streptococcus mutans</i> ¹	Souza (2015)
		<i>Streptococcus oralis</i> ¹	
		<i>Streptococcus mitis</i> ¹	
		<i>Streptococcus salivarius</i> ¹	
		<i>Staphylococcus aureu</i> ¹	
		<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	
Antibacteriano	Hidroalcoólico	<i>Escherichia coli</i> ²	Santos Neto (2016)
Antimicrobiano	Metanol Acetato de Etila n- Hexano	<i>Staphylococcus aureu</i> ¹	Saraiva et al. (2013)

Antibacteriano	Hidroalcoólico	<i>Escherichia coli</i> ²	Santos (2018)
		<i>Pseudomonas</i>	
		<i>aeruginosa</i> ²	
		<i>Salmonella</i>	
		<i>choleraesysus</i> ²	
		<i>Micrococcus luteus</i> ¹	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ¹	
		<i>Bacillus subtilis</i> ¹	

Coloração: Gram-positiva¹, Gram-Negativa²

Em todos os microrganismos citados na tabela 1, a baraúna obteve algum resultado no quesito inibição, o que em primeira instância torna-lhe algo a ser entendido de forma sistemática. Principalmente como fonte alternativa no tratamento de bactérias multirresistentes.

A utilização em microrganismos multirresistentes foi realizado por Saraiva et al. (2013), que obteve resultados satisfatórios com o extrato bruto das folhas da baraúna, fracionado em: n-hexano, acetato de etila e metanol, contra espécie multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, que é considerado um importante patógeno devido a uma combinação de virulência mediada por toxina, invasividade e resistência a antibióticos (LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

Saraiva et al. (2013) obtiveram resultados interessantes, como a concentração inibitória mínima dos componentes isolados de 50 e 25 µg/mL. Demonstrando uma alta ação até em colônias resistentes.

Algumas pesquisas avaliam outros tipos de propriedades biológicas como a realizada por Silva (2014), que avaliou a capacidade mutagênica e antimutogênica do extrato etanólico da baraúna em células, porém não foi obtido resultado de atividade biológica nas suas pesquisas.

Diversos metabólitos secundários são identificado na literatura como: taninos, flavonóides, fenóis, triterpenos, esteróides e polifenóis por Raimundo e Toletto (2016) em suas pesquisas bibliográficas; Souza (2015) identificou e quantificou taninos, flavonóides e polifenóis através da utilização do espectrofotômetro e Santos (2018) conseguiu perceber a presença de triterpenos e taninos pelos os testes qualitativos de Mattos, no extrato hidroalcoólico.

Estes metabólitos estão provavelmente ligados às propriedades biológicas da Baraúna. Não é novidade que alguns possuem efeitos anestésicos como também

reagem na parede celular da membrana dos microrganismos causando a morte ou inibição dos mesmos.

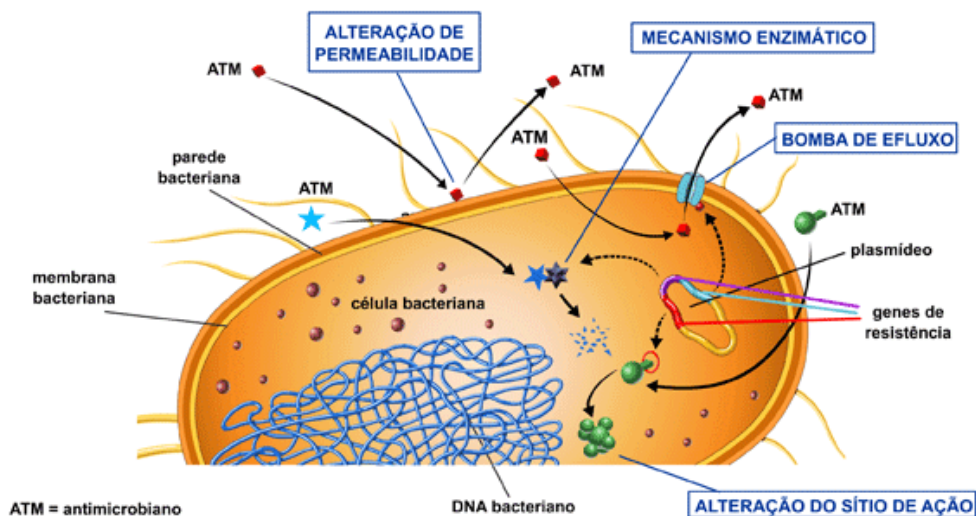
2.4 RESISTÊNCIA BACTERIANA E A BUSCA POR NOVOS ANTIBIÓTICOS

As bactérias são seres unicelulares, identificadas por van Leeuwenhoek nos anos de 1670 após a invenção do microscópio. Porém, apenas no século XIX acreditamos na possibilidade destes micro-organismos serem causadores dos mais diferenciados tipos de patologias (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Devido aos problemas relacionados ao desenvolvimento de doenças, foi necessário a criação de substâncias químicas que conseguissem inibir ou levar estes microrganismos a morte, porém com o uso irregular destes agentes antimicrobianos, as bactérias desenvolveram resistência a esses componentes que Segundo Mota et al. (2005) pode ocorrer tanto nos homens como nos animais que posteriormente podem infectar os humanos.

Os mecanismos de resistência foram desenvolvidos para desativar essas substâncias das mais diferenciadas formas, entre eles estão: Bombas de Efluxo, Alteração da Permeabilidade da Membrana Externa, Produção Enzimática e Alteração Genética do Alvo (Castanheira 2013). Assim como demonstrado na figura 5.

Figura 5: Mecanismo de defesa antimicrobiano



Fonte. Anvisa

As bactérias podem desenvolver colônias totalmente imunes a antibióticos de duas formas, a primeira é o compartilhamento genético dos genes e a segunda é a reprodução assexuada dos componentes com essa mutação (Castanheira 2013).

O desenvolvimento desta resistência tem ocasionado problemas assim como destacado por Silveira (2006): “O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antibióticos e agentes quimioterápicos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública.” Logo é necessário a busca por novos antibióticos que esses organismos ainda não tenham desenvolvido defesas.

Guimarães; Momesso e Pupo (2010) descrevem os caminhos que as novas pesquisas estão para o desenvolvimento de novos antibióticos entre eles a descobertas de moléculas antimicrobianas através de plantas, segundo os mesmos: “ As plantas também podem contribuir na descoberta de novos antibióticos, pois é possível que produtos naturais antimicrobianos possam ser biossintetizados para prevenir e/ou combater o ataque de micro-organismos patogênicos às plantas.” Logo a descoberta e a produção de um antibiótico através de organismos vegetais se demonstra ser promissor.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. (Baraúna), coletado no Parque Estadual Mata da Pimenteira localizado no município de Serra Talhada Pernambuco, e avaliar o potencial antibacteriano de extratos.

3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar alguns constituintes químicos do extrato etanólico de *Schinopsis brasiliensis* ENGL. (Baraúna) por meio de testes fitoquímicos qualitativos e cromatografia líquida de alta eficiência;
- Determinar os polifenóis totais, através de espectrofotometria;
- Determinação da CIM dos componentes do extrato etanólico por meio do teste de microdiluição em placas multipoços;
- Avaliar a atividade sinérgica do extrato bruto com o antibiótico a amoxicilina.

4. METODOLOGIA

Os métodos utilizados para a obtenção dos extratos etanólicos e testes qualitativos fitoquímicos, seguem a metodologia de Mattos (2009) e Barbosa (2001) considerando algumas modificações, devido a limitação dos aparelhos e reagentes disponibilizados no laboratório.

4.1. ESCOLHA DA PLANTA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

Foi utilizada uma referência bibliográfica (SILVA, 2013), contendo o mapa botânico da área, logo após foi realizado um levantamento bibliográfico sobre as espécies, e então realizado a identificação botânica do organismo escolhido (*S. brasiliensis ENGL.*) com o auxílio dos Taxonomistas Dr. André Laurênio de Melo e Maria Crislayne dos Santos Souza.

4.2. ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA E OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

O método utilizado foi o de Barbosa (2001), o qual consistiu na coleta do material vegetal. A primeira coleta aconteceu no dia 10 de novembro de 2017, a segunda no dia 13 de abril de 2018 e a terceira no dia 17 de outubro de 2018 das 8h às 12h no Parque Estadual Mata da Pimenteira. Sendo levado para o laboratório de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco, unidade de Serra Talhada-PE, onde foram devidamente pesadas em uma balança analítica (ACCULA) em seguida as folhas foram colocadas em uma estufa ventilada (New Lab) por 72 horas a 50 °C. Logo após secadas, as folhas foram trituradas com o auxílio de um triturador mecânico e levadas para o Erlenmeyer onde foi utilizado uma proporção de 1:4 de álcool etílico P.A a 99,8 % para cada 100 g do extrato bruto. A vidraria foi fechada e coberta com papel alumínio por 72 h a temperatura ambiente, o extrato foi filtrado a vácuo e levado ao evaporador rotativo e pôr fim a um dessecador até as análises serem realizadas.

4.3. TESTES QUALITATIVOS FITOQUÍMICOS

4.3.1. OPERAÇÕES PRELIMINARES

Todos os testes fitoquímicos foram realizados em triplicadas pela metodologia de Matos (2011) e Barbosa (2001). Para a preparação da solução mãe foram utilizados cerca de 1 g de extrato seco para 50 mL de etanol 99,8 % P.A resultando numa concentração de 0,02 g/mL.

4.3.2. FLAVONÓIS, FLAVONONAS, FLAVONOIDES E XANTONAS

Para identificar a presença dos constituintes foi realizado o teste de Shinoda (HCl concentrado e magnésio) que consistiu no seguinte procedimento: colocou-se em um tubo de ensaio 1 mL da solução mãe do extrato bruto, adicionado 1mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. Em seguida foi adicionado à solução 1 cm de fita de magnésio. A formação de uma coloração rosa caracteriza a presença de flavonoides.

4.3.3. TESTE PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONOIDES

Foi colocado 3 mL da solução mãe em três béqueres contendo o extrato dissolvido em etanol P.A, um levado ao pH 3 o segundo a pH 8,5 e o terceiro a pH 11(alcalinizada com NaOH e acidificadas com HCl) , segundo a metodologia a mudança na coloração é indicativo da presença dos metabólicos como mostra a tabela 2:

Tabela 2: Resultado dos testes (Matos 2009)

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido ⁽³⁾	Alcalino ^(8,5)	Alcalino ⁽¹¹⁾
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chaconas e Auronas	Vermelha	-	Verm. Púrpura

Flavonóis	-	-	Verm. Laranja
------------------	---	---	---------------

Fonte. MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 3 ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

4.3.4. TANINOS E FENÓIS

Para a verificação qualitativa de fenóis e taninos, foram utilizadas duas soluções em concentrações diferentes para uma maior visualização e avaliação da reação pretendida.

Primeira solução de FeCl_3 a 1%: pesou-se 1 g de cloreto férrico para então ser dissolvido em 100 mL de álcool etílico a 70%.

Segunda solução de FeCl_3 a 9%: Dissolveu-se 9 g de cloreto férrico em 100 mL de álcool etílico a 70%.

Branco: água destilada com as soluções de cloreto férrico.

A presença de precipitação de cor azul é um indicativo da presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, taninos catéquicos (taninos condensados) consequentemente fenóis

Teste da Gelatina: o seguinte teste foi realizado através da metodologia disponibilizado pela sociedade brasileira de farmacognosia, que consiste na adição de gotas de uma solução de gelatina na concentração de 2,5 % no extrato bruto. A presença de precipitação indica que o teste é positivo para taninos.

Em todos os testes foram colocados cerca de 2 mL da solução mãe do extrato bruto e então acrescentado 5 gotas das soluções.

4.3.5. SAPONINAS

Para esse teste foram utilizados 3 mL da solução mãe do extrato bruto em 2 mL de água destilada e então agitado vigorosamente durante 2 min em tubo fechado.

Resultado: Caso a camada de espuma permanece-se estável por mais de meia hora o resultado deve ser considerado positivo.

4.3.5 ALCALOIDES

A reação geral para alcalóides foi baseada na formação de complexos insolúveis (precipitados). Para a identificação da presença desta classe de compostos foram separadas porções de 2mL da solução mãe em tubos de ensaio diferentes e adicionados três gotas dos seguintes reagentes:

Tubo 1: Reagente de Mayer: Será dissolvido 1,35 g de Hg_2Cl_2 e 5 g de KI em água e até chegar a 100 mL. Esta solução reage com quase todos os alcaloides em meio ácido dando precipitados brancos.

Tubo 2: Reagente de Bouchardat: foram dissolvidos 4 g de KI e 2 g de I_2 em 100 mL de água. A solução reage com alcaloides formando precipitado marrom.

Tubo 3: Reagente de Dragendorff: para este reagente foram preparadas duas soluções:

- Solução A: Pesa-se 8g de $\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ que são dissolvidos em 20mL de Ácido Acético.

- Solução B: Dissolve-se 27,2g KI em 50mL de água destilada.

A solução “A” foi adicionada aos poucos sobre a solução “B”. Se ocorrer a formação de precipitado vermelho após a adição deste reagente, então indicará a presença de alcalóides.

4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

Na determinação do teor de polifenóis totais, foi utilizado o método de Chandra e Mejía (2004) com algumas modificações realizadas por Souza (2015). Logo, adicionou-se 1 mL da solução aquosa do extrato a 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1 N, a mistura permaneceu em repouso por 2 minutos, em seguida, foi adicionado 2 mL Na_2CO_3 a 20% (p/v), que permaneceu em repouso por mais 10 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 757 nm em espectrofotômetro, com um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na_2CO_3 . Para a curva analítica, foi utilizado uma solução padrão de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico que foi preparada pela dissolução de 10 mg do padrão em 100 mL de água destilada. Através dessa solução foram realizadas diluições nas concentrações

de 10,20,30,40 e 50 µg/mL. A concentração de polifenóis foi considerada em microgramas equivalentes de ácido gálico.

4.5. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

O seguinte teste foi realizado no laboratório de pós-graduação em produção vegetal, com a colaboração dos professores Dra. Kelem Silva e Dr. Adriano do Nascimento Simões. As amostras do extrato bruto da baraúna foram diluídas em água nas concentrações 0,25, 0,20, 0,15, 0,10 e 0,05 mg/mL. E posteriormente, filtradas em filtro com tamanho de poro 0,45 µm de PTFE CROMAFIL®. Seguindo a metodologia de Fernandes (2015) com modificação para o método isocrático.

Logo após foram adicionadas no aparelho de UHPLC+ (ThermoScientific) Ultimate 3000 controlado pelo software *Chromeleon Chromatography Management System* com coluna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm). através do método isocrático: composição do eluente (proporção): ácido acético 2%/metanol (60/40); fluxo 1 mL/min; comprimento de onda $\lambda = 270$ nm; volume de injeção 20 µL; tempo de corrida: 30 min.

Os padrões usados foram: ácido gálico, ácido cafeico e vanilina nas concentrações 0,25, 0,20, 0,15, 0,10 e 0,05 mg/mL.

4.6. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO

Os seguintes testes foram realizados com a colaboração da professora Dra. Virgínia Medeiros de Siqueira no laboratório de microbiologia 1 localizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)- Unidade acadêmica de Serra Talhada (UAST); para isso, foram utilizadas as seguintes bactérias: *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Samonella* sp., e *Escherichia coli*. As bactérias foram replicadas por 24 h antes dos testes.

Preparou-se uma solução denominada como I de etanol com o extrato, com 64 mg em 1 µl de etanol gerando uma solução de 64 mg/µl para ser então dissolvida na proporção de 1:100 em caldo Mueller- Hinton, ou seja, transferiu-se 1 mL da solução I para 99 µl de caldo nutriente, esta é a solução II que ficou na concentração de 6400 µg/mL,

Para a determinação do CIM, colocou-se 200 µl de caldo nutriente em cada poço sendo no primeiro poço adicionado 200 µL da solução II e assim sucessivamente até o oitavo, obtendo-se concentrações de: 3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 e 25 µg/mL.

Logo após em cada poço foi adicionado 10 µL da suspensão bacteriana em salina a 0,85 % correspondente a 10^8 UFC/mL (0,5 MC Farland). As placas multipoços foram inoculadas a 35°C por 24 horas.

A CIM foi determinada pela menor concentração de extrato bruto capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano, visto a olho nu.

Para avaliação da atividade sinérgica, foi utilizado a metodologia de Mackay et al. (2000) com algumas modificações nas concentrações. O extrato bruto foi misturado na proporção de 1:1 com o antibiótico amoxilina, para então obtermos os resultados das concentrações inibitória fracionadas (CIF). A CIF consisti em uma razão da CIM do extrato bruto em combinação com o antibiótico dividido pelo valor da concentração inibitória mínima do antibiótico isolado. Esse coeficiente indica a associação dos extratos com o antibiótico produziu efeito: sinérgico ($CIF \leq 0,5$), indiferente ($4,0 > CIF > 0,5$) ou antagonista ($CIF > 4,0$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

As folhas foram coletadas no parque estadual Mata da Pimenteira em Serra Talhada-PE, em uma localização aproximada de 7°56'07,6" de latitude sul (s) e 38°18'01,7" de longitude oeste (w). Foram realizadas três coletas, onde posteriormente conduzimos a vários tipos de processos como citados na metodologia. Na figura 6 temos o produto inicial (as folhas logo após serem retiradas da planta) e o final (Extrato bruto da Baraúna).

Figura 6: (A)- Folhas da primeira coleta da baraúna
(B) – extrato bruto depois da volatilização do solvente.

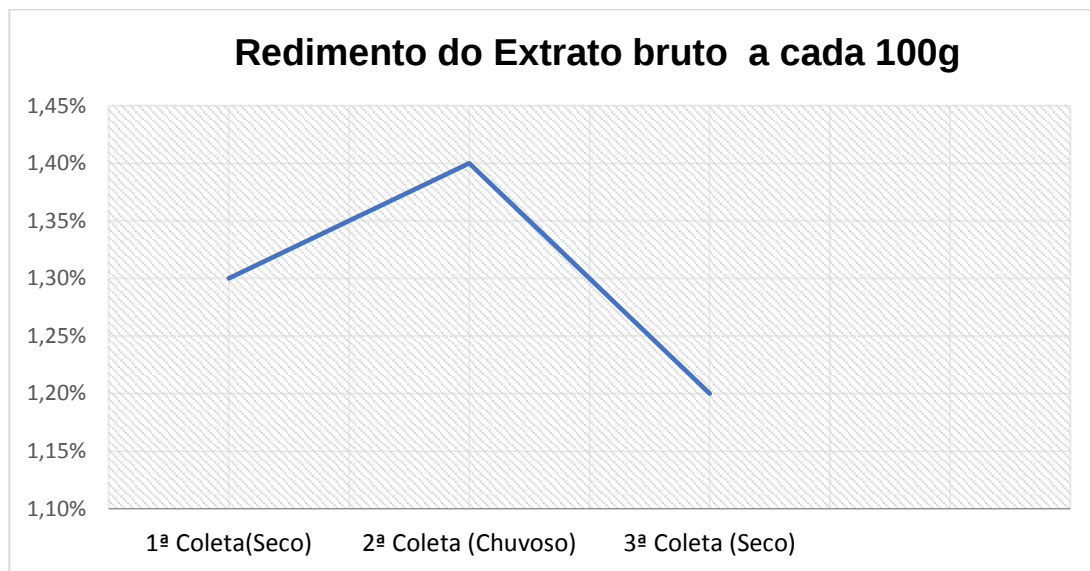


Fonte. Autoria própria

As coletas foram realizadas nos dias: 10 de novembro de 2017, 13 de abril de 2018 e 17 de outubro de 2018, que respectivamente corresponde as estações de primavera, outono e primavera novamente. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007) as estações do ano, podem influenciar no desenvolvimento de metabólitos secundários por ocasionar fatores abióticos como disponibilidade hídrica para a planta. Devemos levar em consideração esse fator nas duas estações distintas, pois como bem sabemos a água é necessária para que a fotossíntese ocorra, logo sem uma boa vazão da mesma através do xilema para os órgãos fotossintetizantes, haverá menor concentração dessas biomoléculas.

Foram coletadas respectivamente: 346,0189 g; 311, 0244g e 500,0000g de folhas frescas. No gráfico1 é apresentado o rendimento das três coletas a cada 100g de material vegetal utilizados no processo.

Gráfico 1: Porcentagem de rendimento a cada coleta



Fonte: dados da pesquisa

Como podemos perceber a segunda coleta obteve um maior rendimento, isso pode ter ocorrido devido ao fato de ser a única entre as duas que não ocorreu na primavera, como citado anteriormente isso pode influenciar no desenvolvimento dos metabólitos secundários, pois segundo Simões et. al. (2017) diversos fatores influenciam na produção de metabólitos secundários como a disponibilidade hídrica para a planta.

A obtenção do extrato bruto foi concluída quando o mesmo demonstrava uma consistência semi-sólida, pois o intuito era que a maior parte do solvente tivesse sido volatilizada para não ocorrer interferências nos resultados pelo etanol.

5.2. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA QUALITATIVA

A prospecção fitoquímica qualitativa foi realizada como citado na metodologia, com a solução mãe do extrato em etanol na concentração de 0,02 g/mL. Não houve mudanças consideráveis nos resultados de uma coleta para outra, o extrato bruto quando dissolvido apresentou uma média de pH bastante ácida de 3,2 que talvez

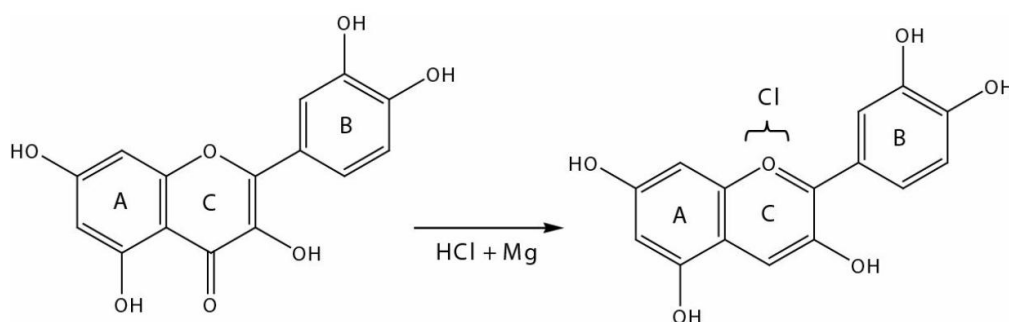
possa ser justificado, devido a quantidade de ácidos orgânicos que possam ter sido extraídos na maceração.

5.2.1. FLAVONÓIS, FLAVONONAS, FLAVONOIDES E XANTONAS

Assim como descrito na metodologia foi adicionado 1 mL do ácido clorídrico e 1 cm de fita de magnésio a solução mãe do extrato bruto, que ocasionou uma coloração levemente rosa que segundo Mattos (2011) e Barbosa (2001) indica a presenças de flavonoides e seus derivados.

Segundo Simões et al. (2017.p 224) o teste para flavonoides é positivo devido ao seguinte motivo: “Essa reação tem por base a redução dos derivados flavonoídicos, de cor amarela, em antocianos, com coloração avermelhada. O processo de redução mediado por magnésio metálico em meio de ácido clorídrico, em geral, ocorre no anel C da estrutura dos flavonóis e flavonas, gerando um núcleo antociânico.” Simões se refere ao anel demonstrado na figura 7.

Figura 7: Reação da cianidina



Fonte: Simões et al. 2017

Os flavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenil propanoides, sendo um dos compostos fenólicos mais abundantes na natureza, famosos por serem compostos antioxidantes pertencentes aos metabólitos secundários das plantas, onde possuem principalmente função de proteger esses organismos contra os raios solares (SIMÕES et. al., 2017).

Em alguns trabalhos sobre *Schinopsis brasiliensis* Engl. de outras localidades, foram identificados ou determinando a quantidade destes metabólicos (Flavonóides) como: Raimundo (2016), Souza (2015) e Santos (2018).

5.2.2. TESTE PARA ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS E FLAVONOIDES

Devido ao resultado do teste anterior, esta análise foi realizada para confirmar os dados, pois além de fácil execução também pode gerar outros tipos de dados para uma maior compressão química.

A coloração da amostra, quando em pH 11, adquiriu uma coloração amarela intensa como a figura 8 demonstra, segundo Mattos (2011) esse comportamento indicaria a possível presença dos grupos das Flavonas, Flavonóis e Xantonas.

Figura 8: Extrato bruto sendo submetido a alteração de pH.



Fonte: Autoria própria

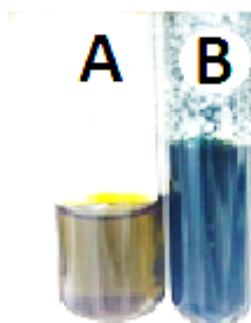
Como citado anteriormente este resultado torna-se importante devido as propriedades biológicas principalmente antioxidantes dessas moléculas (SIMÕES et. al., 2017). As pesquisas vêm demonstrando a presença de flavonoides como dito anteriormente, assim como Raimundo (2016) destaca na sua revisão bibliográfica, porém não foram encontrados dados sobre o seguinte grupo.

5.2.3. TANINOS E FENÓIS

Após a reação da solução mãe com FeCl_3 , houve uma precipitação de coloração azul intensa como é demonstrado na figura 9, que segundo Mattos (2011) e Barbosa (2001) indica a presença de taninos hidrossolúveis.

Não é novidade a presença deste metabólito na baraúna, que por sua vez são compostos fenólicos solúveis em água com massa molecular que varia entre 500 a 3.000 daltons. Utilizados principalmente nas indústrias de curtimento de couros devido a sua capacidade de precipitar celulose, pectinas e proteínas, famosos por seu sabor adstringente em frutos como a uva (SIMÕES et. al., 2017).

Figura 9: (A)- Extrato bruto diluído. (B) Extrato Após ser submetido ao teste.



. Fonte: Autoria própria

Segundo Simões et al. (2017.p 235) “os taninos possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água”. Possivelmente foi o que ocorreu no teste, pois ao reagir com FeCl_3 talvez houve a formação de um complexo (provavelmente octaédrico devido a coloração do precipitado ser azul).

No teste da gelatina um precipitado de coloração escura foi formado devido provavelmente à precipitação de algumas proteínas contidas nestas soluções.

Resultados semelhantes também foram encontrados por: Souza (2015), Santos (2018), Assunção et. al (2016), Ferreira et al (2016), Chaves et al (2011) entre outros.

5.2.4 SAPONINAS

O seguinte teste consistiu na diluição do extrato em água, para então ser agitado intensamente por 2 min, caso a espuma permanecesse por 15 min então o resultado deveria ser considerado positivo, isso ocorre segundo Simões et al (2017) devido as saponinas em água formarem uma espumas abundante com ação

detergente e emulsificante, por possuir na sua estrutura uma parte polar e outra apolar assim como os detergentes. Logo, a presença dela expressaria tal comportamento.

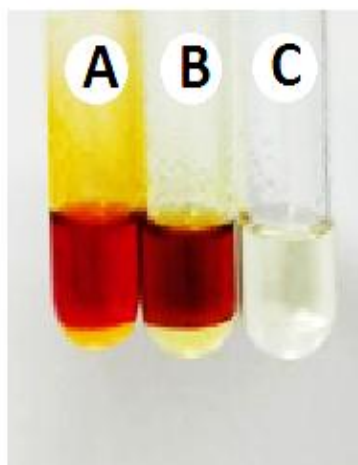
De início o extrato da Baraúna apresentou uma leve formação de espuma na superfície, porém com o passar do tempo percebemos que a mesma não persistiu por 15 minutos, então consideramos o resultado do teste negativo.

Almeida et al. (2018), encontrou nas suas pesquisas bibliográficas autores que identificarão e quantificaram esse componente na baraúna, devido a essa informação tentamos refazer o teste em triplicada com concentrações diferentes, porém o resultado foi o mesmo.

5.2.4. ALCALOIDES

Após uma purificação ácido-base do extrato bruto, o mesmo foi submetido aos testes de: Mayer (Branco), Bouchard (Marrom) e Dragendorff (Laranja), pois segundo Barbosa (2001) quando essas soluções entram em contato com o extrato, vão sofrer precipitações em conjunto aos compostos nitrogenados como os alcalóides. Os resultados foram positivos para todos os testes. Na figura 10 podemos verificar a precipitação.

Figura 10: (A)- teste de Dragendorff, (B) teste de Bouchard e (C) teste de Mayer



Fonte: Autoria própria

Os alcalóides são compostos nitrogenados provenientes de aminoácidos (“Alcaloides verdadeiros”) que geralmente estão na sua forma básica, onde apresentam características biológicas diversas, que vão desde anestésicas como a

morfina até microbiológicas como alguns trabalhos apontam, é um dos metabólitos secundários com maior importância industrial, principalmente na área da saúde (SIMÕES et. al., 2017).

Nas nossas pesquisas bibliográficas percebemos que poucos trabalhos relatam ter identificado esses metabólitos entre eles Chaves (2011) que através das metodologias de Morita e Assumpção (1972), Matos (1988), Costa (2000) e Simões (2004) chegou ao mesmo resultado.

5.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

Os compostos fenólicos ou polifenóis nas plantas possuem diversos tipos de atividades biológicas, como: atração de polinizadores, proteção contra os raios UV, insetos, bactérias entre outros, como também nos seres humanos, por exemplo, os taninos e flavonóides e sua capacidade antioxidante (Peres, 2018; Simões et al. 2017).

Sendo assim a descoberta e quantificação destes compostos torna-se crucial, devido as suas diversas capacidades biológicas com ênfase na antimicrobiana, devido ao que se pretende estudar neste trabalho.

Logo através da metodologia realizada por Chandra e Mejiia (2004) com modificações feitas por Souza (2015), foi obtido uma concentração de 571 µg/mL de polifenóis totais, um pouco menor que a de Souza (2015) que obteve uma concentração de 598,55 µg/mL na partição realizada com etanol e maior que Lima (2016) que quantificou 386,75 µg/mL deste grupo de biomoléculas na Baraúna com o mesmo solvente e metodologia.

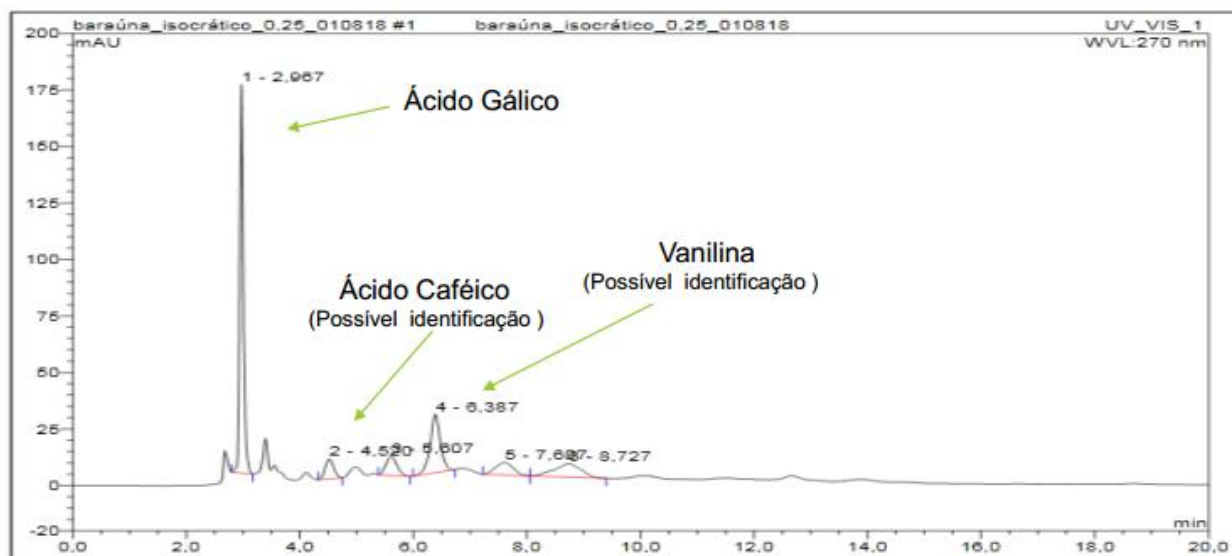
Vale apenas salientar que os metabólitos secundários são produzidos em relação ao ecossistema em que a planta está inserida, assim como Peres (2018) relata, logo um mesmo tipo de organismo pode apresentar concentrações de alguns componentes químicos diferentes dependendo da localidade das plantas, provavelmente foi o que ocorreu com o resultado relatado anteriormente.

5.4. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC)

Após a preparação das amostras o extrato etanólico bruto da baraúna foi diluído e filtrado para ser então injetado no equipamento em modo isocrático, sendo a fase móvel ácido acético 2% e metanol (60/40); foram observados seis picos no cromatograma (figura 11) com tempos de retenções de: 2,97; 4,52; 5,61; 6,39; 7,61 e 8,73 minutos, através dos seguintes resultados foram utilizadas soluções padrões de compostos com concentrações diferentes para a construção da curva de calibração. Os picos com tempo de retenção 7,61 e 8,73 minutos não foram identificados, porque não foi possível a comparação com os padrões disponíveis em nosso laboratório. Então, foram designados como componentes desconhecidos.

Inicialmente, as injeções foram realizadas em modo gradiente seguindo a metodologia proposta por Fernandes (2015), mas os primeiros cromatogramas saíram com picos invertidos ou com muito ruído que comprometiam a identificação dos compostos no extrato.

Figura 11. Cromatograma do extrato das folhas da Baraúna



Fonte: Dados da Pesquisa

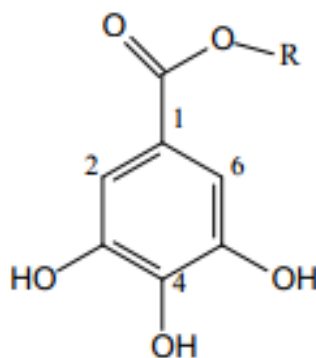
5.3.1 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO GÁLICO

Assim como mencionado anteriormente o primeiro pico do extrato saiu por volta de 2,97 minutos, bem próximo ao do padrão do ácido gálico (3,1 minutos), resultando

em uma diferença de 0,13 minutos. Dessa forma, foi confirmada a presença do ácido gálico no extrato etanólico bruto.

O ácido gálico é uma molécula proveniente do metabolismo secundário das plantas, pertencente ao grupo dos compostos fenólicos que por sua vez, segundo Barbosa (2010): “Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula”. Na figura 12 temos a forma estrutural dessa molécula e dos seus derivados como galato de metila, elucidada por Moreira (2009) através da técnica de RMN.

Figura 12: Fórmula estrutural do ácido gálico e os seus derivados



Fonte: Moreira (2009)

O ácido gálico e os seus derivados têm demonstrado diversas atividades biológicas, como inibir a cadeia respiratória do parasita *Trypanosomacruzi*, possuir atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, e também apresentar toxicidade em hepatócitos de ratos (BARBOSA, 2010, p.13). Em alguns casos possui capacidade antioxidante.

Os testes para quantificação foram feitos seguindo a metodologia onde foi construída uma curva de calibração para calcular a concentração desse composto.

Foi obtido a concentração de 0,045 mg/mL de “ácido galico” no extrato, alguns autores como Moreira (2009) chegaram a isolar e identificar alguns componentes químicos da baráúna entre eles o ácido gálico, porém não quantifica a presença desse composto, já Fernandes et. al (2015), através de outro método utilizado, quantificou essa molécula obtendo uma concentração de 0,10 µg/mL. Há bastante estudos sobre a identificação do ácido gálico, porém poucos que se propõem a quantificar o que torna importante a realização dessa pesquisa.

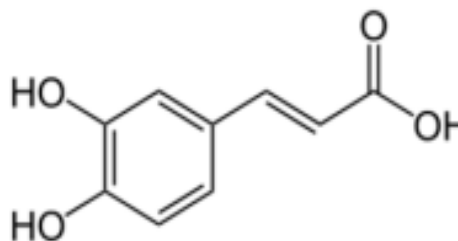
Esse resultado pode estar relacionado com o relatado anteriormente (identificação qualitativa de taninos), pois os taninos hidrossolúveis são como “polímeros de ácidos gálicos” que ao sofrer uma reação de hidrólise liberam esta molécula

5.3.2 IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO

O segundo pico saiu por volta dos 4,52 minutos enquanto o do padrão do ácido cafeico 4,59 minutos, ocasionando uma diferença de 0,07 minutos de retenção, o que possivelmente pode nos dar um indício que se trata das mesmas moléculas.

O ácido caféico é um composto fenólico de relevante importância, possuindo duas hidroxilas na posição 3 e 4 no anel do ácido cinâmico como a figura 13 demonstra, é bastante encontrado no tecido vegetal, sendo consumido pelos humanos e animais através da alimentação (vegetais, vinho, azeite de oliva, café entre outros). Já foi constatado diversas propriedades biológicas desse ácido entre elas: antioxidante, antitrombose, anti-hipertensivo, antifibrótico, antiviral, anti-tumora. (ARAUJO, 2017, P.09)

Figura 13: Forma estrutural do ácido caféico



Fonte: Moreira (2009)

Na revisão sistemática realizada, não foram encontradas evidências da sua identificação ou quantificação na *Schinopsis brasiliensis* Engl, o que impede afirmar a presença do referido composto no momento.

5.3.3 IDENTIFICAÇÃO DA VANILINA

O terceiro composto, possivelmente vanilina, foi detectado devido ao tempo de retenção da sua solução padrão, que ocorreu por volta dos 6,13 minutos, enquanto

no extrato bruto 6,39 minutos, ocasionando uma diferença de 0,26 minutos por ser bem próximo consideramos que possivelmente trata-se dessa molécula.

A vanilina ou a 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído é considerado um dos compostos aromáticos mais apreciados no mundo devido ao seu aroma de baunilha, sendo um flavorizante importante para alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos. Alguns estudos confirmam a atividades biológicas dessa molécula, como: antimutagênico, antioxidante, conservante e antimicrobiano. Essa molécula é principalmente obtida da planta *Vanilla planifolia*, porém é encontrada em outros organismos vegetais (DAUGSCH E PASTORE 2005, p.642).

Apesar da sua importância industrial a vanilina é pouco estudada e quantificada, assim como ocorreu com o ácido caféico não foram encontrados estudos de identificação ou quantificação deste composto na *Schinopsis brasiliensis Engl.*

5.4. TESTE DE PLACA MULTIPOÇOS

Devido aos dados coletados nos experimentos e nas pesquisas bibliográficas, consideramos o ácido gálico o componente majoritário da Baraúna. Por isso foi utilizado o mesmo nos testes microbiológicos, para verificação do seu desempenho em relação aos microrganismos utilizados e com isso verificar se a atividade antimicrobiana desta planta está atribuída a essa molécula. A avaliação do antibiótico puro ocorreu para termos uma pequena amostra dos medicamentos disponibilizados no mercado, sendo a sua mistura com extrato um sistema para avaliação do sinergismo desses dois componentes, assim como demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Resultado do teste microbiológico do extrato bruto e de substâncias adicionais

MICRORGANISMOS	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA µg/mL			
	ANTIBIÓTICO (Amoxicilina)	EXTRATO + ANTIBIOTICO	EXTRATO BRUTO (Baraúna)	ÁCIDO GÁLICO
<i>Klebsiella pneumonia</i>	25	800	1600	100

<i>Bacillus subtilis</i>	-	800	800	50
<i>Samonella sp.</i>	50	1.600	1600	200
<i>Escherichia coli</i>	25	800	1600	100

Fonte: Dados da Pesquisa

O ácido gálico puro foi a substância com menor concentração inibitória mínima contra a *Klebsiella pneumoniae* (exceto o antibiótico). O extrato bruto conseguiu inibir na concentração de 1600 µg/mL, e em 800 µg/mL em associação com antibiótico que apesar de uma inibição mínima maior que o padrão de ácido gálico (100 µg/mL), alguns fatores de interferentes podem estar ocorrendo, neste tipo de extração outros componentes químicos como: as clorofilas, lipídios, proteínas entre outros, também fazem parte do extrato bruto, logo o padrão de ácido gálico estando na sua forma pura é esperado um melhor resultado que o extrato etanólico bruto da baraúna, devido a presença de outros componentes químicos que interferem aumentando a concentração mínima inibitória.

A *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo gram-negativo que pode ser encontrado em locais como água, solo, plantas e esgoto. Apresenta resistência a antimicrobianos, sendo um problema de saúde pública e motivo de preocupação em todos os campos da saúde (MOREIRA; FREIRE, 2013).

É uma bactéria responsável pela produção de uma enzima denominada carbapenemase, que confere resistência aos antibióticos da classe dos carbapenêmicos: meropenem, ertapenem e imipenem (CUNHA, 2014). Tal enzima não é restrita a uma espécie bacteriana, podendo ser sintetizada também por *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas spp.*, por exemplo (SEIBERT et al., 2014). Devido aos fatores mencionados anteriormente, a *K. pneumoniae* é considerado um microorganismo que necessita de fontes alternativas no tratamento.

Alguns estudos com o extrato bruto etanólico da *S. brasiliensis* Engl. indicam a presença de atividades microbiológica, assim como Machado (2012) que através da

metodologia de difusão em meio sólido com disco e cavidades em placas conseguiu halos de inibição de 24 e 23 mm respectivamente.

A menor concentração mínima inibitória foi contra o *Bacillus subtilis* tanto do extrato sozinho quanto misturado com antibiótico mostrou a mesma concentração 800 µg/mL, enquanto para o ácido gálico apresentou 50 µg/mL. Esse desempenho pode ser justificado devido à composição química da baráúna, onde segundo Fernandes (2015) o ácido gálico é o seu componente majoritário e com propriedades microbiológicas, logo é esperado que essa atividade biológica foi originada por esse componente.

A *Bacillus subtilis* é uma bactéria aeróbica facultativa gram-positiva, podendo ser frequentemente encontrada no solo (GARCIA, 2008). É utilizada para o biocontrole principalmente de enfermidades de plantas, assim como também para aumentar a produtividade de culturas, promovendo o crescimento de vegetais ocasionado pelo aumento da fixação de nitrogênio, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Consideradas bactérias antagônicas, agem significativamente por antibiose, produzindo grande variedade de metabólitos antifúngicos (FILHO et al., 2010). Até o momento, apenas Santos (2018) através de outra metodologia testou este microrganismo.

Na *Samonella sp*, a concentração inibitória mínima foi de 1600 µg/mL, tanto no extrato bruto + antibiótico quanto no antibiótico puro, por outro lado o ácido gálico apresentou uma concentração de 200 µg/mL, esse resultado foi importante devido principalmente à *Samonella sp* pertencer a um grupo de bactérias que tendem a ser patogênicas. Até agora, não foram encontrados estudos que relatassem a interação da *Schinopsis brasiliensis* Engl. com esses microrganismos.

Para a *Escherichia coli* foi obtido uma concentração inibitória mínima de 1600 µg/mL no extrato bruto, 800 µg/mL para o extrato bruto + antibiótico, e 100 µg/mL com ácido gálico, esses resultados demonstram ser importantes devido a *E. coli* ser uma bactéria patogênica (SAMEGIMA, 2008).

Entre as décadas de 40 e 50 foram descritas cepas de *E. coli* causadoras de diarreia tanto no homem quanto em outros animais, como boi, ovelha e cachorros. Tais cepas que induzem diarreia foram inicialmente nomeadas como *E. coli* enteropatógenicas (EPEC). No entanto, estudos posteriores possibilitaram que as mesmas

fossem agrupadas em diferentes classes de acordo com seus mecanismos de infecção e fatores de virulência (ALMEIDA, 2013).

Na Baraúna alguns estudos como o de Souza (2015) relataram uma concentração inibitória mínima de 250 µg/mL na partição em etanol, vale apenas salientar que nestas partições são utilizados vários tipos de solventes de polaridade diferenciadas, tornando algumas fases mais “limpas” devido ao acúmulo de componentes nas fases anteriores.

Na atividade sinérgica entre o antibiótico (amoxicilina) e o extrato bruto da Baraúna foi obtido CIF igual a 32 em todos os microrganismos com exceção do *B. subtilis* que não houve a inibição do antibiótico e consequentemente não foi possível calcular este resultado. Segundo a metodologia de Mackay et al. (2000) os resultados foram antagônicos. Isso pode ter ocorrido devido ao extrato bruto ter precipitado quando entrou em contato com o antibiótico, devido aos inúmeros componentes químicos presentes no mesmo não foi possível apontar qual componente foi responsável devido a quantidade de componentes químicos encontrados nos extratos de plantas, logo é necessário a purificação do extrato para a realização de outros métodos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos testes qualitativos fitoquímicos conseguimos constatar a presença de diversos metabólitos secundários como: taninos, fenóis, flavonóis, flavononas, flavonoides, flavonas, xantonas e alcalóides.

Com a utilização do espectrofotômetro e do método citado anteriormente, foi possível determinar a concentração de polifenóis totais, onde foi obtida uma concentração de 571 µg/mL destes compostos.

Com a cromatografia líquida de alta eficiência HPLC-UV, foi identificado e determinado a concentração do ácido gálico, e possível presença de ácido caféico e vanilina no extrato etanólico bruto da *Schinopsis brasiliensis* Engl.

O resultado do teste microbiológico demonstrou ser bastante promissor para a proposta da pesquisa, a baraúna obteve inibição contra todos os microrganismos testados, porém a atividade sinérgica deve ser reconsiderada devido à precipitação dos dois compostos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. C. F. et al. BRAÚNA - *Schinopsis brasiliensis* Engl. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS E SUA UTILIZAÇÃO NA MEDICINA POPULAR: UMA REVISÃO. In: III CONBRACIS, 3., 2018, Campina Grande. **Anais**. Online: Iii Conbracis, 2018. v. 3, p. 1 - 8.

ANVISA. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais**. 2018.

Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>>. Acesso em: 12 jan. 2019]

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, 2001.

BORREGO, J. V. M. **Historia de La Agronomía**. 2. ed. Llanera, asturias: EdicionesMundi-prensa, 2014.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3.ed. Fortaleza: **Escola Superior de Agricultura de Mossoró**, 540p, 1976.

CASTANHEIRA, B. A. M. G. **Mecanismos de resistência a antibióticos**. 2013. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacia, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

CHAVES, T. P. et al. Atividade antimicrobiana das folhas de *Schinopsis brasiliensis engler*. **Biofar**, [s.l.], v. 5, n. 02, p.11-17, jan. 2011.

COSTA, A. F. **Farmacognosia Experimental**. v. III, 3 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2000.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.642-645, fev. 2005.

Farmacognosia: da planta ao medicamento. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.333-365, 2017.

FERNANDES, F. H. et al. Development of a rapid and simple HPLC-UV method for determination of gallic acid in *Schinopsis brasiliensis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.208-211, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.006>.

FIORUCCI, A. R., Soares, M. H. F. B., Cavaleiro, E. T. G. Ácidos orgânicos: dos primórdios da química experimental à sua presença em nosso cotidiano. *Química Nova na Escola*, nº 15, 2002.

FRANÇA, F. Ordem: Sapindales: Família: Anacardiaceae. 2014. Disponível em: <<http://sistematicafanerogamasbio266uefs.blogspot.com.br/2014/06/ordem-sapindales-familiaanacardiaceae.html>>. Acesso em: 12 Jan. 2019

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

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

III Congresso brasileiro de ciências da saúde, 3., 2018, Campina Grande. **Braúna - *Schinopsis brasiliensis* engl. propriedades farmacológicas e sua utilização na medicina popular: uma revisão**. Campina Grande: Conbracis, p. 8, 2018.

JOVITO, V. C. **Atividade anti-candida e análise da citotoxicidade do extrato das folhas da *Schinopsis brasiliensis* ENGL.** 2016. 46 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

Leroux, H. "Mémoire relatif à l'analyse de l'écorce de saule et à la découverte d'un principe immédiat propre à remplacer le sulfate de quinine" (Memorial a respeito da casca de salgueiro e a descoberta de uma substância adequada para substituir imediatamente o sulfato de quinino" **Journal de chimie médicale, de pharmacie et de toxicologie**. Chez Bécheteune. 6: 340–342, 1830.

LUZ, C. L. S. **Anacardiaceae R. Br. na flora fanerogâmica do estado de São Paulo**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Botânica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MACKAY ML, MILNE K, GOULD IM. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. **Int J Antimicrob Agents**. v. 15, p. 125, 2000.

MODELO3:Resistência Microbiana – **Mecanismos e Impacto Clínico**, 2007 (Pesquisado a: 11/03/2019) Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm

MOTA, R. A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [s.l.], v. 42, n. 6, p.465-470, 1 dez. 2005. Universidade de São Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2005.26406>.

MATOS, F.J.A., **Introdução à fitoquímica experimental**. UFC Edições. p. 44-46, (1988).

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental. 3 ed.** Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, B. O. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antioxidante dos extratos hexânico e diclorometânico das folhas de *Schinopsis brasiliensis* ENGL. (*Anacardiaceae*)**. 2009. 192 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.

MORITA, T.; Assumpção, R.M.V. **Manual de soluções, reagentes e solventes: padronização, preparo, purificação**. São Paulo: Edgard Blücher. p. 627, 1968.

PEREIRA JÚNIOR, L. et al. Espécies da Caatinga como alternativa para o desenvolvimento de novos fitofármacos. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 4, p.509-520, out. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.024212>

RAIMUNDO, J.S.; TOLEDO, C. E. M. Plantas com atividade antifúngica no tratamento da candidíase: uma revisão bibliográfica. **Revista UningÁ Review**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.75-80, dez. 2016.

RIBEIRO, D. et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 16, n. 4, p.912-930, maio 2014.

SANTOS N.; MOISES G. **Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da casca de *Schinopsis brasiliensis* frente à cepas de *Escherichia coli* de espectro estendido (esbl)**. 2016. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande - PB, 2016.

SANTOS, A. S. **Avaliação das atividades antibacterianas e antifúngicas e triagem fitoquímica de extratos hidroalcoólicos de espécies vegetais coletadas no bioma caatinga**. 2018. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologias em Saúde, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, 2018.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p.413-423, dez. 2007

SANTOS, N. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto - Enfermagem**, [s.l.], v. 13, n., p.64-70, 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-07072004000500007>

SARAIVA, A. M. et al. Atividade antimicrobiana e sinérgica das frações das folhas de *Schinopsis brasiliensis* Engl. frente a clones multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 15, n. 2, p.199-207, jan. 2013.

SILVA, M. B. **Avaliação in vivo do potencial mutagênico e antimutagênico do extrato obtido das folhas de *Schinopsis brasiliensis* engl. através do teste de micronúcleo em camundongos.** 2014. 25 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – Pb, 2014.

SILVA, T. G. F. ALMEIDA, A. Q. Climatologia e Características Geomorfológicas. Ln: SANTOS, E. M.; MELO- JUNIOR, M.; SILVA-CAVALCANTE, JS.; G.V.L. **Parque Estadual Mata da Pimenteira: Riqueza natural e Conservação da Caatinga.** Recife: EDUFRPE. 34- 46 p. 2013.

SILVEIRA, G. P. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NO COMBATE A RESISTÊNCIA BACTERIANA. **Quim. Nova**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.844-855, mar. 2006.

SIMÕES, C. M. O. et, al. **Farmacognosia do produto natural até o medicamento.** 1 Ed. Artmed, Porto alegre, 2017

SIMÕES, C. M. O., Schenkel, E. P. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, 12 Ed. p. 35-40, 2002.

SOUZA, P. H. S. **Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos.** 2015. 137 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande/PB, 2015.

VIEGAS, C. et al. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, [s.l.], v. 2, n. 26, p.326-337, jan. 2006.

WILLIAMS, R. S.; MILLER, R.; GANGSTAD, J. Characteristics of ten tropical hardwoods from certified forest in Bolívia. Part I weathering characteristics and dimensional change. **Wood and fiber science.** v. 33, n. 4, p. 618-626, 2001.