

## INIBIÇÃO DA DEGRADAÇÃO OXIDATIVA DA DESOXIRRIBOSE E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO CETOAQUOSO DA CASCA DO CAULE DO *STRYPHNODENDRON ROTUNDIFOLIUM* MART.

Francisco Junio Dias<sup>1</sup>, Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues<sup>2</sup>, Gerson Javier Torres Salazar<sup>3</sup> José Galberto Martins da Costa<sup>4</sup>

**Resumo:** Este trabalho busca a atividade antioxidante e antibacteriana do extrato cetoaquoso de *Stryphnodendron rotundifolium* Mart. conhecido popularmente por barbatimão. Para o ensaio antioxidante foi utilizado o método de degradação oxidativa da desoxirribose 2-DR *in vitro*, foram utilizados agentes pro-oxidantes Fe<sup>+2</sup> 50µM; Fe<sup>+2</sup> 50µM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM, em dois sistemas, um de pré-tratamento e outro de tratamento concomitante, a leitura foi feita por espectrometria em 532nm. No ensaio para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), foi testado o extrato em diferentes concentrações, contra 8 linhagens de bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas e na modulação, foi utilizado o extrato com antibióticos, sendo utilizado duas bactérias e quatro antibióticos com diferentes mecanismos de ação. No sistema de pré-tratamento obteve-se os resultados de 72% de proteção contra o Fe<sup>+2</sup> 50µM, e contra o Fe<sup>+2</sup> 50µM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM foi de 43% na concentração 0,2mg/mL. No tratamento concomitante foi de 68,6% de proteção contra Fe<sup>+2</sup> 50µM e 33% contra o Fe<sup>+2</sup> 50µM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM na concentração 0,2mg/mL. A CIM mostrou baixa inibição do crescimento bacteriano em contrapartida a modulação mostrou resultados na menor concentração testada que foi 0,5µg/mL.

**Palavras-chave:** *Stryphnodendron rotundifolium* MART., Antioxidante, Antibacteriano.

### 1. Introdução

O gênero *Stryphnodendron* (Fabaceae), atualmente inclui 21 espécies e uma subespécie, com distribuição geográfica característica no Norte (PA, AM, TO), Noroeste (MA, PI, CE, BA), Centro-Oeste (MT, GO, MS), Sudeste (MG, SP), Sul (PR) e ambiente de caatinga no Brasil (Forzza, 2010). Dentre as várias espécies o *S. rotundifolium* Mart. conhecida popularmente na Chapada do Araripe (nordeste brasileiro) como barbatimão, tem sido muito utilizado como meio de fitoterapia no tratamento de várias doenças.

Dados da literatura confirmam o uso popular da casca do caule de espécies do gênero *Stryphnodendron* para tratar diversos distúrbios que afetam a saúde humana, especialmente infecções (Souza et al., 2009), processos inflamatórios (Lima et al., 1998) e leucorreia e outros problemas ginecológicos (Oliveira et al., 2012), e para antibacterianos (Oliveira et al., 2011), anti-úlceras (Rodrigues et al., 2008), efeitos antifúngicos (Ishida et al., 2006) e cicatrização de feridas (Lopes et al., 2005). Os efeitos medicinais do barbatimão são atribuídos ao elevado teor

---

1 Universidade Regional do Cariri, email: juniordias195@gmail.com

2 Universidade Regional do Cariri, email: fabiolafer@gmail.com

3 Universidade Regional do Cariri, email: timotygertor@yahoo.com

4 Universidade Regional do Cariri, email: galberto.martins@gmail.com

# XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018  
Universidade Regional do Cariri

de taninos em sua composição química, podendo atingir níveis de 20% a 50% (LIMA et al., 2010).

Os taninos se dividem em dois grandes grupos, taninos hidrolisáveis e condensados, também chamados de proantocianidinas. Os taninos hidrolisáveis são constituídos por uma mistura de fenóis simples, galotaninos e elagitaninos, que quando hidrolisado formam o ácido gálico e ácido elágico, que possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante (Rodrigues D. F 2013).

## 2. Objetivo

Determinar a capacidade do extrato de proteger a desoxirribose da degradação oxidativa causada por radicais livres e  $Fe^{+2}$ .

Avaliar a atividade antibacteriana frente a diferentes linhagens bacterianas por diferentes mecanismos de ação.

## 3. Metodologia

O extrato foi obtido a partir da casca do caule do *S. rotundifolium*, que passou por uma extração hexânica para remoção de lipídeos, em seguida uma extração cetoaquosa de proporção 7:3 por 72h, seguido por um processo de liofilização onde se obteve o extrato em pó e pronto para testes.

A inibição da degradação da desoxirribose 2-DR *in vitro*, foi determinada de acordo a metodologia de (J.M. Gutteridge, 1981) baseada na quantificação do principal produto desta degradação, o malonildialdeído MDA, um composto de três carbonos formado a partir do ataque do radical hidroxil à 2-DR segundo (Cheeseman et al., 1988).

O MDA formado a partir da degradação da 2-DR, foi detectado e quantificado espectrofotometricamente em meio ácido através da adição de ácido tiobarbitúrico (TBA) que, depois de aquecido, formou um cromóforo (MDA-TBA<sub>2</sub>) com pico de absorção em 532nm e coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ )  $14.900M^{-1}cm^{-1}$ . (J.M. Gutteridge 1985, Gutteridge JM 1981). A formação de adutos em meio ácido está provavelmente iniciada pelo ataque nucleofílico que implica o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MDA (figura 1), seguido da desidratação e posterior reação do intermediário aduto 1:1 com uma segunda molécula de TBA (D. R. Janero, 1990).

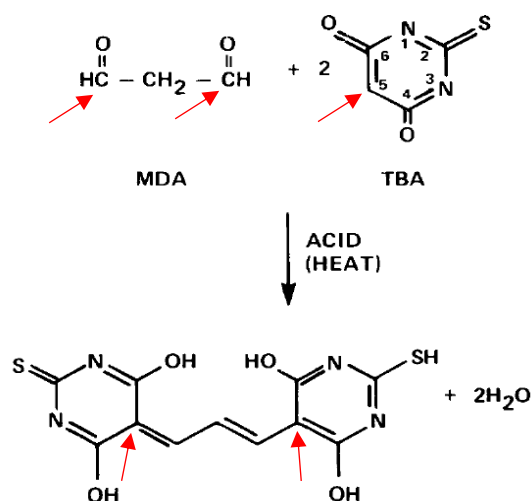


Figura 1: Reação do TBA com MDA, formando adulto cromóforo.

# XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018  
Universidade Regional do Cariri

O radical hidroxil foi gerado pelas seguintes condições pro-oxidantes: **i)** FeSO<sub>4</sub>, e **ii)** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais FeSO<sub>4</sub>. Em seguida, foi separado em duplicata a 2-DR (3 mM) foi pre-incubada a temperatura ambiente durante 20 min, com tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4) nas duas condições pro-oxidantes, **i)** 0,05 mM FeSO<sub>4</sub>; **ii)** 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais 0,05mM FeSO<sub>4</sub>, em seguida incubada a 37 °C durante 60 min em ausência e presença dos extratos em concentrações finais de [0.075; 0.1 e 0.2]mg/mL. As reações foram realizadas mediante a adição de ácido tricloroacético (TCA) 2,8% e de (TBA) 0,8%. Depois, as reações foram aquecidas durante 20 min a 100 °C. A absorbância foi determinada em um espectrofotômetro UV/Visível em comprimento de onda de 532nm, e os resultados foram expressos como porcentagem (%) de proteção contra a degradação oxidativa em função dos controles, a raiz da equação de (Mauricio Â. Q. 2006).

$$\text{Proteção 2-DR (\%)} \text{ Inibição} = \frac{[(\text{Abs. Controle} - (\text{Abs. Extrato} - \text{Abs. Branco}))]}{\text{Abs. Controle}} \times 100\%$$

Abs. Controle é a absorbância da 2-DR com o pro-oxidante sem extrato, Abs. Extrato é a absorbância da 2-DR com pro-oxidante com extrato, e Abs. Branco é a absorbância do pro-oxidante com extrato sem 2-DR.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizada para avaliar a ação microbiológica do extrato cetoaquoso em diferentes concentrações. O extrato foi avaliado com base nos documentos M7-A6 para bactérias. Foram utilizadas 6 linhagens de bactérias, sendo três Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC- 2503), *Streptococcus mutans* (ATCC- 0046) e *Bacillus cereus* (ATCC- 33018) e três Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC- 15442), *Escherichia coli* (ATCC- 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC- 10031). As bactérias foram previamente reavivadas, utilizou-se meio de cultura *Brain Heart Infusion Broth* (BHI 3,8%) e incubadas durante 24 h a 35 ± 2°C em estufa bacteriológica. Logo após, procedeu-se a padronização do inóculo a uma suspensão que continha aproximadamente 1 x 10<sup>8</sup> UFC/mL (0,5 unidades de turbidez nefelométrica - escala McFarland). Em seguida, essa suspensão foi diluída a 1 x 10<sup>6</sup> UFC/mL em caldo BHI 10%, e volumes de 100µL foram adicionados e homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido de diferentes concentrações do extrato, resultando num inóculo final de 5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL.

Foram pesados 0,01g do extrato e diluído em 9ml de água destilada mais 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo uma solução de 1024µg/mL. Seguiram-se diluições seriadas nas placas em concentrações que variaram de 512 a 8µg/mL. Os testes foram realizados em triplicata e as placas incubadas em estufa a 35 ± 2°C, durante 24 h. As placas contendo bactérias foram lidas por colorimetria pela adição de 25µL do corante resazurina (0,01%) em cada poço, corante este de aspecto roxo e que reage com as células bacterianas vivas, gerando uma coloração roseada.

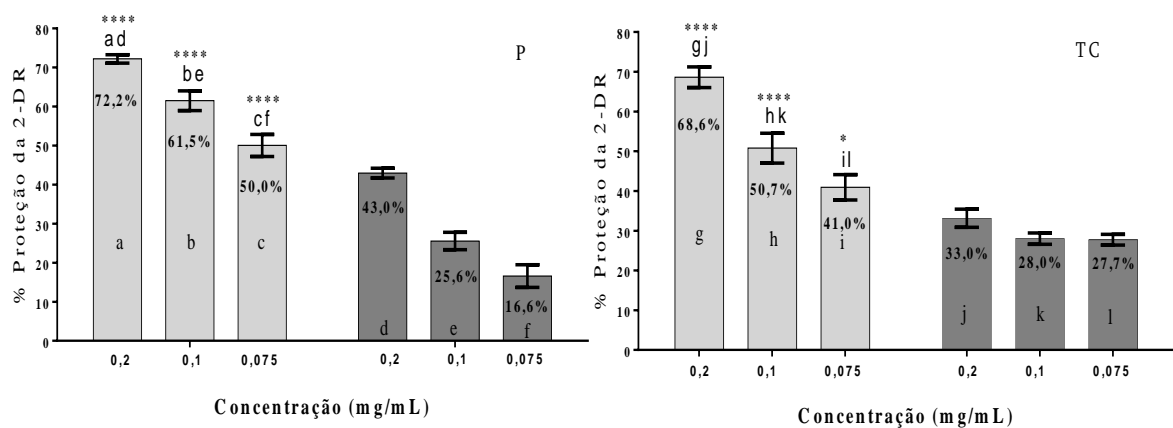
Para análise do potencial modulatório do extrato, utilizou-se antibióticos aminoglicosídeos (canamicina e gentamicina), que atuam na síntese da parede celular e antibióticos beta-lactâmicos (benzilpenicilina e cefalotina), que atuam inibindo a síntese de proteínas seja atuando nos ribossomos ou impedindo a síntese de DNA, seguiu-se a metodologia proposta por Coutinho et al. (2008). Considerando os resultados do ensaio anterior, concentração inibitória mínima

# XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018  
Universidade Regional do Cariri

(CIM), as linhagens bacterianas testadas foram uma Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC- 10031) e uma Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC-33018). O teste foi realizado na presença e na ausência do extrato cetosaquoso da casca do caule do *S. rotundifolium*. Os inóculos bacterianos (CIM/8) em BHI 10% foram distribuídos em placas de microdiluição seguido da adição das concentrações das soluções dos antibióticos (1.024µg/mL), através de diluições seriadas. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas em estufa bacteriológica e a leitura realizada por colorimetria pela adição de 25µL da solução de resazurina (0,01%) com o mesmo ensaio anterior (CIM).

## 4. Resultados



Porcentagem (%) de proteção da 2-DR do extrato cetosaquoso do *S. rotundifolium*, em dois sistemas de degradação *in vitro*: ■ Fe<sup>+2</sup> 50µM; ■ Fe<sup>+2</sup> 50µM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5mM. Esquema de proteção em um sistema de pre-tratamento (P); esquema de proteção em um sistema de tratamento concomitante (TC).

Os valores são expressos como as médias ± S.E.M. (n=4). (ANOVA de Uma- via, seguido do Test multiple – comparisons Tukey's). Foi usado o programa GraphPad Prism 6.0.

\*: Diferencia significativa dos níveis de proteção nos sistemas pro-oxidantes entre concentrações igual, o número de estrela indica o grau de diferença significativa.

Os resultados indicam que o extrato exerce uma maior atividade antioxidante na condição pro-oxidante de Fe+2 quando comparado com a condição pro-oxidante de Fenton. Podemos dizer, que essa proteção no sistema de Fe+2 é principalmente via formação de quelatos, e que o extrato já não é tão efetivo na contra o radical hidroxil em comparação ao íon Fe+2. O extrato mostrou uma proteção da 2-DR correlacionada positivamente com o aumento da concentração tanto nos sistemas de P e TC.

No ensaio concentração inibitória mínima não houve inibição do crescimento bacteriano nas concentrações do extrato testadas, que foram: 512; 256; 128; 64; 32; 16; e 8µg/mL.

Na modulação obteve-se os seguintes resultados por bactérias testadas: *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva), Benzilpenicilina 0,5µg/mL, Cefalotina 0,5µg/mL, Gentamicina 8µg/mL, Canamicina 0,5µg/mL. *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa) Benzilpenicilina 16µg/mL, Cefalotina 0,5µg/mL, Gentamicina 4µg/mL, Canamicina 0,5µg/mL.

# XXI Semana de Iniciação Científica da URCA

05 a 09 de novembro de 2018  
Universidade Regional do Cariri

## 5. Conclusão

O extrato mostrou significativa atividade antioxidante, quanto a proteção da degradação da desoxirribose frente aos sistemas de degradação  $\text{Fe}^{+2}$  50 $\mu\text{M}$  e  $\text{Fe}^{+2}$  50 $\mu\text{M}$  +  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,5mM (Fenton), indicando ser mais efetivo na proteção contra o sistema pro-oxidante de  $\text{Fe}^{+2}$  50 $\mu\text{M}$ , sugerindo que seu mecanismo de proteção é preferentemente via formação de quelatos.

Os resultados obtidos do ensaio concentração inibitória mínima (CIM) com o extrato cetoaquoso da casca do caule do barbatimão, mostraram baixa atividade na inibição do crescimento bacteriano, não havendo inibição nas concentrações testadas, sugerindo então que a concentração inibitória mínima seria  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ . Os resultados da modulação com o extrato se mostraram significativos, tanto da classe dos aminoglicosídeos quanto dos beta-lactâmicos, mostrou melhor resultado contra bactéria gram-positiva por ter uma estrutura celular mais simples, portanto mais facilmente destruída.

## 6. Referências

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.

BASTOS, R.A.A.; LOPES, A.M.C. A fitoterapia na Rede Básica de Saúde: o olhar da enfermagem. *Rev. Bras. Cienc. Saude*, v.14, n.2, p.21-8, 2010. Disponível em: Acesso em: 23 jun. 2013.

Cheeseman KH, Beavis A, Esterbauer H. Hydroxyl-Induced-Catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. *Biochem J.* 1988 Jun 15; 252(3) – 649-53.

D. R. Janero. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Review Article. Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 9, pp. 515-540, 1990.

Gutteridge JM. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free-radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett.* 1981 Jun 15;128 (2): 343-6.

J.M. Gutteridge. Superoxide dismutase inhibits the superoxide driven Fenton reaction at two different levels. Implications for a wider protective role. *FEBS Lett.* 185 (1985) 19-23.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. MORAES, M.E.A.; SANTANA, G.S.M. Aroeirado-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. *Funcap*, v. 3, p. 5-6, 2001.

RODRIGUES, D.R.; Mendes F.F.; NORONHA, A.D.F.F et. al. O EXTRATO DA CASCA DE BARBATIMÃO, *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM ANIMAIS p *ENCICLOPÉDIA BIOSFERA*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 2013 1587