

1 **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E**  
2 **TOXICOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO SECO DA *Anadenanthera***  
3 ***colubrina* (Vell.) Brenan. (ANGICO)**

4 Leizianny Karla Silva<sup>1\*</sup>, Warlla Carine Lira<sup>1</sup>, Cynthia Gisele de Oliveira Coimbra &  
5 Risonildo Pereira Cordeiro.

6 <sup>1</sup>Universidade Tabosa de Almeida ASCES-UNITA

---

\*Contato: Leizianny Karla Silva, Rua Travessa Largo da paz n.39 Centro Toritama-Pe CEP 55125-000  
E-mail: leizianny@hotmail.com

7 **RESUMO:**A *Anadenanthera colubrina* (Vell.) é uma espécie arbórea nativa da América do  
8 Sul. Pertence á família Fabaceae.Possui propriedades curativa, atividades antioxidante, anti-  
9 inflamatória, anti-proliferativa, antialérgico e antitrombótico. Este estudo buscou avaliar a  
10 atividade antimicrobiana e determinar o potencial tóxico contra *Artemia salina*. O estudo foi  
11 do tipo laboratorial experimental – observacional, através da Concentração Mínima Inibitória  
12 (CIM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA).Com base nos valores da  
13 concentração inibitória mínima (CIM) obtidas verificou-se que o extrato foi mais ativo contra  
14 as cepas *S. agalactiae*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Cepas *S.aureus*, *E.coli*, *Klebsiella* e *C.*  
15 *albicans* se mostraram resistentes a todas concentrações. Com relação à Concentração  
16 Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) o extrato foi ativo apenas frente a uma cepa, *P.*  
17 *aeruginosa*.. No bioensaio de toxicidade foi constatado experimentalmente que o extrato  
18 apresenta valores de CL50 µg/mL na faixa de 3.574,30006 µg/mL, que designar que amostra  
19 analisada não indica uma toxicidade relevante ao teste da *Artemia salina*. Os estudos  
20 revelaram que o extrato da planta, *Anadenanthera colubrina*, apresenta potencial para  
21 produção de fármacos o que propõe a necessidade de novos estudos.

22 **Palavra-chave:** Planta, Bactéria, Toxicidade.

23 **ABSTRACT:***Anadenanthera colubrina* (Vell.) Is a tree species native to South America. It  
24 belongs to the Fabaceae family. It has healing properties, antioxidant, anti-inflammatory, anti-  
25 proliferative, anti-allergic and antithrombotic activities. This study aimed to evaluate the  
26 antimicrobial activity and determine the toxic potential against *Artemia salina*. The study was  
27 experimental - observational, through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and  
28 Minimum Inhibitory Adherence Concentration (CIMA). Based on the values of the minimum  
29 inhibitory concentration (MIC) obtained, it was verified that the extract was more active  
30 against *S. agalactiae*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* strains. Strains *S.aureus*, *E.*  
31 *coli*, *Klebsiella* and *C. albicans* showed resistance at all concentrations. Regarding the  
32 Minimum Inhibitory Adherence Concentration (CIMA) the extract was active only against a  
33 strain, *P.aeruginosa*. In the toxicity bioassay it was verified experimentally that the extract  
34 presented values of LC50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  in the range of 3.574.30006  $\mu\text{g} / \text{ML}$ , which designate  
35 which sample tested does not indicate a toxicity relevant to the *Artemia saline* test. The  
36 studies revealed that the extract of the plant, *Anadenanthera colubrina*, presents potential for  
37 drug production, which proposes the need for new studies.

38 **Keywords:**Plants; Bacteria; Toxicity

## 39 INTRODUÇÃO

40 As plantas têm sido, desde a antiguidade, um recurso ao alcance do ser humano. O  
41 homem encontrou nas chamadas plantas medicinais, virtudes que foram transmitidas de  
42 geração a geração. Essas plantas têm significado um marco na história do desenvolvimento de  
43 nações. Até nas sociedades mais industrializadas, o uso de vegetais *in natura* pela população  
44 vem, cada vez mais, se intensificando (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

45 O crescente uso de fitoterapia, normalmente de forma criteriosa e indiscriminada, em  
46 conjunto com a escassez de estudos de alta qualidade neste domínio e acesso limitado à  
47 literatura sobre o tema, têm levantado muitas questões sobre a eficácia e segurança dos  
48 medicamentos à base de plantas. O conhecimento empírico acumulado ao longo dos anos,  
49 com base na tradição cultural, juntamente com descobertas científicas tem mostrado que as  
50 plantas medicinais e fitoterápicas trazem benefícios para o corpo, bem como pode causar  
51 efeitos adversos e toxicidade e ser contraindicada (ALEXANDER GARCIA & SIMÕES,  
52 2005).

53 A maior parte da região Nordeste do Brasil é composta por dois importantes Biomas, a  
54 Caatinga e a Mata Atlântica, com características peculiares de clima e fisionomia, possuindo  
55 espécies vegetais de grande importância (RODRIGUES *et. al;* 2006), essa região é uma das  
56 menos protegidas no Brasil (ALBUQUERQUE *et. al;* 2006). A Caatinga é uma das  
57 vegetações mais ameaçadas do planeta, e, apesar disto, esta exclusividade não foi suficiente  
58 para direcionar muitos estudos botânicos nesta área (ALBUQUERQUE *et. al;* 2006).

59 A Caatinga constitui um rico ecossistema exclusivamente brasileiro, com grande  
60 diversidade de espécies e elevada incidência de endemismo. Em recente levantamento  
61 florístico de todo o território brasileiro, o bioma caatinga apresentou o total de 4.322 espécies  
62 de plantas com sementes, sendo 744 endêmicas deste bioma, o que corresponde a 17,2% do

63 total de táxons registrados (FORZZA *et al.*, 2012). Tais mecanismos possibilitam a  
64 sobrevivência das espécies em condições edafoclimáticas do semiárido nordestino  
65 (ANDRADE-LIMA, 1981). morfologicamente diferentes e distribuídos em todos os  
66 ecossistemas terrestres (SILVA *et. al*, 2013).

67 O Brasil é um país privilegiado em relação ao emprego da fitoterapia, pois possui  
68 25% da flora mundial e um patrimônio genético de grande potencial para o desenvolvimento  
69 de novos medicamentos (CASTILHO, 2009). Na fitoterapia, em regiões de domínio da  
70 Caatinga, observa-se que entre as espécies vegetais de maior uso aparecem *Myracrodruom*  
71 *urundeuva* Allemão (Aroeira); *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Angico);  
72 e *Poincianella pyramidalys* (Tul.) L. P. Queiroz (Catingueira), (SILVA & FREIRE, 2010;  
73 MARINHO *et al.*, 2011).

74 *Anadenanthera colubrina* (Vell.) é uma espécie arbórea nativa da América do Sul  
75 (VARELA; ALBORNOZ, 2013). Pertence á família Fabaceae e subfamília Mimosoideae.  
76 (VIANA *et. al*; 2014). Possui propriedades curativas e é comumente utilizada na medicina  
77 popular como bebida, xarope, tintura ou macerado. O extrato hidroalcoólico *in vitro* tem  
78 atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* esterpes. Também possui atividades  
79 antioxidante, anti-inflamatória, anti-proliferativa, antialérgico e antitrombótico. A maceração  
80 da casca administrada por via oral é usada no tratamento de processos inflamatórios como  
81 bronquite, gastrite, pneumonia e resfriado (PESSOA *et. al*; 2012).

82 Este projeto tem como finalidade avaliar o potencial antimicrobiano e toxicológico do  
83 extrato bruto de uma planta da caatinga, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Angico).

## 84 MATERIAL E MÉTODOS

### 85 *Preparação do extrato bruto seco*

86 As folhas da droga vegetal foram colhidas matinalmente pela manhã no sítio São João,  
87 lavada com água corrente, limpa e seca com papel toalha e pesada. Foi seca em estufa com  
88 circulação de ar até peso constante, acompanhado com o auxílio de balança. A droga vegetal  
89 seca foi moída para reduzi-la a pó e encaminhada para maceração em solução alcoólica a 95%  
90 v/v durante 7 dias. O macerado foi filtrado para obtenção do extrato bruto fluido e em seguida  
91 seco em evaporador rotativo à temperatura de 60°C. A secagem foi concluída em uma estufa  
92 de ar rotativo e o extrato bruto seco mantido em um dessecador até sua utilização.

### 93 *Teste microbiológico*

94 Foram utilizadas cepas de bactéria, da coleção do laboratório de controle  
95 microbiológico da ASCES, Gram-negativas: *Escherichia coli*(ATCC 25922), *Pseudomonas*  
96 *aeruginosa*(ATCC 7546), *Klebsiella pneumoniae*(ATCC 1705), das Gram-  
97 positivas *Staphylococcus epidermidis*(ATCC 14990), *Staphylococcus aureus*(ATCC 3613),  
98 *Streptococcus spp.* (ATCC 15913) e do fungo leveduriforme *Candida albicans*(ATCC  
99 10231).

### 100 *Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)*

101 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato foi realizada a  
102 partir da técnica de poços, conforme metodologia determinada por Koneman (2008). Foram  
103 preparadas suspensões de células dos respectivos patógenos em solução salina, com turbidez  
104 equivalente ao tubo nº 0,5 da escala de Marc-Farland. Com o auxílio do swab, semeou-se toda  
105 a superfície do Ágar Mueller-Hinton (para bactérias) ou Ágar Sabouraud (para fungos)

106 contidos em placas de Petri com 9mm de diâmetro com as suspensões dos respectivos  
107 microrganismos.

108 Em cada placa semeada foram feitos quatro poços de 6 mm de diâmetro e inseridos  
109 50µL do extrato em diferentes concentrações, 50%, 25%,12,50% e 6,25% do extrato bruto  
110 seco, o procedimento foi realizado em duplicata.

111 Após essa etapa, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior  
112 mensuração dos halos em milímetros (mm) e determinação da Concentração Inibitória  
113 Mínima (CIM), sendo esta entendida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o  
114 crescimento bacteriano.

#### 115 *Determinação da concentração inibitória mínima de aderência (CIMA)*

116 A avaliação da menor concentração de extrato, em meio de sacarose, necessária para  
117 inibir a aderência dos microrganismos ao tubo do vidro, é denominada como Concentração  
118 Inibitória Mínima de Aderência (CIMA). A Concentração Inibitória Mínima de Aderência foi  
119 determinada na presença de 5% de sacarose, usando-se concentrações crescentes e sucessivas  
120 das soluções diluídas do extrato, onde as linhagens foram sub-cultivadas a 37 °C em caldo  
121 Müller-Hinton (DIFCO), em microaerofilia, por um período de 24 horas, para obtenção de um  
122 inóculo de 10<sup>6</sup> UFC/mL, onde foram incubados nos tubos com os meios acrescentando uma  
123 alíquota de 10µL de suspensão bacteriana, sendo os tubos inclinados a 37°C (KONEMAN,  
124 2008).

#### 125 *Poder inibitório (PI)*

126 O Poder Inibitório foi realizado pela técnica de difusão em poços onde foi observada a  
127 formação de halos inibitórios ao redor dos poços que foram preenchidos com o extrato do  
128 meio Ágar Muller-Hinton, contendo a bactéria semeada. Realizou-se a pesagem de 0,5 g do  
129 extrato bruto seco da amostra em comparação com os halos ocorridos no antibiótico padrão

130 utilizado, no caso, Amoxicilina, encaminhada na pesagem de 1g. Após este processo, as duas  
131 amostras foram devidamente diluídas nas mesmas concentrações, posteriormente, foi  
132 verificado o diâmetro dos halos que se formaram ao redor dos poços contendo os extratos e  
133 avaliou-se as concentrações presentes nos mesmos, caracterizando a bactéria como: sensível,  
134 intermediária ou resistente para determinadas concentrações (KONEMAM, 2008).

### 135 **Avaliação da atividade tóxica**

136 Os ovos de *Artemia salina* foram encubados durante um período de 48 h para que  
137 houvesse a eclosão das larvas (Metanúplios) estas foram separados em 7 grupos contendo 12  
138 metanauplios em cada grupo. O primeiro grupo recebeu a solução controle (água marinha) e  
139 as 6 seguintes receberam diferentes concentrações (1000µg/mL, 750µg/mL, 500µg/mL,  
140 250µg/mL, 100µg/mL, e 50µg/mL) do extrato do Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.)  
141 Brenan), as *Artemias* foram colocadas por um período de 24h sob iluminação artificial. As  
142 observações foram feitas após este período, quando se contabilizou o valor numérico de larvas  
143 vivas e mortas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

144

## 145           **RESULTADO E DISCUSSÃO**

146           O extrato etanólico bruto foi avaliado frente às cepas fúngicas e bacterianas descritas  
147 neste trabalho e os resultados são apresentados na Tabela 1 e Tabela 2. Com base nos  
148 valores da concentração inibitória mínima (CIM) obtidas verificou-se que o extrato foi mais  
149 ativo contra as cepas *S. agalactiae*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. Cepas *S.aureus*, *E.coli*,  
150 *Klebsiella* e *C. albicans* se mostraram resistentes a todas concentrações.

151           Em um ensaio realizado por Violante et al. (2015) utilizando o extrato obtido das  
152 folhas de *Anadenanthera colubrna*, demosntrou que entre as cepas bacteriana utilizadas a  
153 mais sensível foi *S.aureus* com CIM de 250 µg/mL.

154           Outro estudo feito por Bustamante et al. (2010) utilizando o extrato etanólico bruto da  
155 casca da *P. emarginatus* que faz parte da família Fabaceae, inibiu o crescimento de todas as bactérias,  
156 entre elas, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e do fungo *C. albicans*.

157           Com base nos valores obtidos da Concentração Inibitória Mínima de Aderência  
158 (CIMA) o extrato foi ativo apenas frente a uma cepa, *P. aeruginosa*. Em relação às outras  
159 cepas,se mostraram resistente a todas concentrações testadas.

160           No bioensaio de toxicidade, evidenciou após 24 horas de exposição sob iluminação  
161 artificial da *Artemia salina Leach*, verificou-se que não houve grande número de óbitos na  
162 maioria das concentrações e condições testadas da amostra de *Anadenanthera colubrina*.  
163 Diante das circunstâncias, foi constatado experimentalmente que o extrato apresenta valores  
164 de CL50 µg/mL na faixa de 3.574,30006 µg/mL, que designar que amostra analisada não  
165 indica uma toxicidade relevante ao teste da *Artemia salina Leach* (CL50), uma vez que a  
166 baixa toxicidade só é considerada as substâncias que tenham TAS> 1000µg/mL (1µg/mL =  
167 1ppm).

168 Um estudo feito por Violante et al. (2015) demonstrou que o extrato bruto de todas as  
169 espécies testadas, entre elas, *Anadenanthera colubrina* não apresentaram atividade citotóxica  
170 sobre as larvas de *A. salina*. As amostras foram consideradas inativas, pois apresentaram  
171 DL<sub>50</sub> superior a 1000 µg/mL.

172 Outro estudo feito por Caldas et al. (2009) utilizando o óleo-resina de copaíba  
173 (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) demonstrou que nenhum dos três animais expostos  
174 apresentou morbidade ou mortalidade nas primeiras 24 h após a exposição e durante o período  
175 do estudo. Desta forma, repetiu-se o teste com outros três animais, o que confirmou o  
176 resultado anterior.

## 177 **CONCLUSÕES**

178 O extrato bruto seco da *Anadenanthera colubrina* apresentou atividade antimicrobiana  
179 frente aos microrganismos testados tanto Gram negativos como Gram positivos. Quanto ao  
180 seu potencial de inibição na formação de biofilme frente apenas a Gram negativas. Em relação  
181 a toxicidade evidencia-se com potencial medicamentoso por não apresentar toxicidade  
182 relevante. Os estudos revelaram que o extrato da planta, *Anadenanthera colubrina*, apresenta  
183 potencial para produção de fármacos o que propõe a necessidade de novos estudos.

184 **REFERÊNCIAS**

- 185 Albuquerque UP. Hanazaki N. Como pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos  
186 fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidade e perspectiva. *Revista Brasileira*  
187 *Farmacognosia*.V. 16, 2006.
- 188 Alexander G. & Simões. Fitoterapia baseada em evidencias. Parte 1. Medicamentos  
189 Fitoterápicos elaborados com ginkgo, hipérico, kava e valeriana. *Acta Farmacêutica*  
190 *bonaerense*.V. 24 n.2, 2005.
- 191 Andrade-Lima D.A. The Caatingas dominium. *Rev. Bot.*V. 4 n.1, 1981.
- 192 Bustamante KGL. et. al. Evaluation of antimicrobial activity of crude ethanol extract from the  
193 bark of "sucupira branca" (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. *Rev. Bras. Plantas.*  
194 *Med.* 12 (3): 2010.
- 195 Caldas ED. et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de  
196 copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 19 (4): 2009.
- 197 Castilho, AR. et. al; Produtos naturais em Odontologia. *Revista Saúde*.2009.
- 198 Forzza RC. et. al; New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. *Bio*  
199 *Science*.V. 4 n. 1, 2012.
- 200 Koneman, EW. et al.*Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido.* 6<sup>a</sup>.  
201 Edição. Editora Guanabara Koogan, 2008.
- 202 Marinho MG. V. et. al; Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga  
203 no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas*  
204 *Medicinais.* V. 13 n.2, 2011.
- 205 Miguel MD, Miguel OG. Desenvolvimento de fitoterápicos. *Editores Robe*.1999.
- 206 Pessoa WS. et. al; Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous  
207 wound healing in rats. *Acta Cir. Bras.* V.27 n.10, 2012.

208 Rodrigues ACC. Biometria de frutos e sementes, germinação e crescimento do angico  
209 (Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. Cebil (Griseb.) Altschyll) em diferentes  
210 condições de substrato e luminosidade. *Biota Neotrop.* V.6 n.1, 2006.

211 Silva MIG. et. al; Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção á saúde da  
212 família no município de Maracanaú (CE). *Rev. Bras. Farmacogn.* V. 16, 2013.

213 Silva TS, Freire EMY. Abordagem etnobotânica sobre plantas medicinais citadas por  
214 populações do entorno de uma unidade de conservação da Caatinga do Rio Grande do Norte,  
215 Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai.* V. 12 n. 4, 2010.

216 Varela RO., Albornoz PL. Morpho-anatomy, imbibition, viability and germination of the seed  
217 of Anadenanthera colubrine var. cebil (Fabaceae). *Rev. Bio. Trop.* V. 61 n.3, 2013.

218 Viana ML. et. al; Morphology and genetics of Anadenanthera colubrina var. cebil (Fabaceae)  
219 tree from Salta (Northwestern Argentina). *Rev. Bio. Trop.* V.62 n.2, 2014.

220 Violante IMP, Pazin GV, Dias da Silva YSA, Ferreira WR, Luiz WT, Kaffashi S, Lima Neto  
221 GA. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e  
222 antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. *Rev. Bras. Plantas*  
223 *med.* 17 (4): 2015.