

Atividade antimicrobiana de *Aspidosperma nitidum* benth (apocynaceae)

Antimicrobial activity of *Aspidosperma nitidum* benth (apocynaceae)

Actividad antimicrobiana de *Aspidosperma nitidum* benth (apocynaceae)

Heliton Patrick Cordovil Brígido^{1,2}, Bárbara Tamires Chaves Ramos², Mipcia Katyucia Borges da Paz², Mírian Letícia Carmo Bastos³, Maria Fâni Dolabela^{1*}.

RESUMO

Objetivo: Descrever a atividade antimicrobiana de *Aspidosperma nitidum*. **Métodos:** O extrato (EE) foi submetido à partição ácido-base obtendo-se as frações de alcaloides (FA) e de neutros (FN). Para verificar a atividade antimicrobiana, inicialmente realizou-se screening pelo teste de disco difusão em ágar frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*. Para as amostras que apresentaram halo de inibição no teste de disco difusão em ágar, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo teste de microdiluição utilizando o MTT. **Resultados:** No teste de difusão em ágar, o EE, FA, FN inibiram o crescimento de bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Não houve inibição do crescimento para as outras cepas. Na determinação da CIM, o EE, FA e FN apresentaram CIM de 1000 µg/mL para *E. coli*. Frente à cepa de *S. aureus*, o EE apresentou CIM de 250 µg/mL, sendo considerado moderadamente ativo, já as frações FA e FN foram considerados de fraca atividade, pois apresentaram CIM de 500 µg/mL. **Conclusão:** A maior atividade antimicrobiana do extrato frente a *S. aureus* pode estar relacionada com alcaloides β-carbolínicos, ou com um possível sinergismo entre esta classe de alcaloides e alcaloides indólicos.

Palavras-chave: *Aspidosperma*, Alcaloides, Antibacteriano.

ABSTRACT

Objective: Describe the antimicrobial activity of *Aspidosperma nitidum*. **Methods:** The ethanolic extract (EE) was subjected to acid-base fractionation aimed at obtaining alkaloid-rich fraction (FA) and neutral fraction (FN). For checking antimicrobial activity, a screening by diffusion disc test was performed against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*. For samples that showed an inhibition halo in the agar diffusion disk test, a microdilution test in MTT was used to determine their minimum inhibitory concentration (MIC). **RESULTS:** In the agar diffusion test, EE, FA, and FN inhibited *S. aureus* and *E. coli* growth. There was no growth inhibition for the other strains. In MIC determination, the EE, FA and FN presented MIC of 1000 µg/mL against *E. coli*. In the *S. aureus* strain, the EE showed a MIC of 250 µg/mL, considered moderately active, whereas the FA and FN fractions had low activity, as they presented a MIC of 500 µg/mL. **Conclusion:** The Greater antimicrobial activity of the extract facing *S. aureus* may be available with β-carbolinic alkaloids, or with a possible synergism between this class of alkaloids and indole alkaloids.

Keywords: *Aspidosperm*, Alkaloids, Antibacterial.

¹ Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém - PA. *E-mail: fanidolabela20@gmail.com

² Faculdade Cosmopolita, Belém - PA.

³ Núcleo de Pesquisa em Educação e Saúde na Amazônia (NUPESA), Tucuruí - PA.

RESUMEN

Objetivo: Describir la actividad antimicrobiana de *Aspidosperma nitidum*. **Métodos:** El extracto etanólico (EE) se sometió a la partición ácido-base obteniendo las fracciones de alcaloides (FA) y neutrales (FN). Para verificar la actividad antimicrobiana, se realizó un cribado utilizando la prueba de disco de difusión de agar contra las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*. Para las muestras que mostraron un halo de inhibición en la prueba de disco de difusión de agar, la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) se realizó mediante la prueba de microdilución usando MTT. **Resultados:** En la prueba de difusión en agar, EE, FA, FN inhibieron el crecimiento de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*. No hubo inhibición del crecimiento para las otras cepas. Al determinar la MIC, EE, FA y FN presentaron una MIC de 1000 µg/mL para *E. coli*. La cepa frontal de *S. aureus* mostró una MIC EE 250 µg/mL, y se considera moderadamente activa, ya que las fracciones FN y FA se consideraron actividad débil, mostraron una MIC de 500 µg/mL. **Conclusión:** La mayor actividad antimicrobiana del extracto contra *S. aureus* puede estar relacionada con alcaloides β-carbolínicos, o con un posible sinergismo entre esta clase de alcaloides y alcaloides indólicos.

Palabras clave: Aspidosperm, Alcaloides, Antibacterianos.

INTRODUÇÃO

A antibioticoterapia é utilizada como primeira opção no tratamento de diversas infecções microbianas (BECKER K, et al., 2006). No entanto, o aumento da resistência aos antibióticos e outras drogas antimicrobianas é observado na atualidade (WHO, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 700.000 pessoas morrem em decorrência da resistência bacteriana a esses medicamentos, configurando um grave problema de saúde pública, atingindo proporções mundiais, podendo ocasionar morte de 10 milhões de pessoas anualmente até o ano de 2050. Associado a isso, a maioria dos fármacos utilizados como antimicrobianos ocasionam efeitos nocivos ao organismo, comprometendo o bem-estar e a saúde (BERQUÓ LS, et al., 2004).

Nesse contexto, a busca por fármacos com ação antimicrobiana torna-se urgente, e as plantas medicinais podem fornecer alternativas promissoras para desenvolvimento dessas novas terapias (KLEIN T, et al., 2009). Dentre as plantas com atividade antimicrobiana, destacam-se espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae) que apresentam derivados do loideschiquimato, especialmente taninos e alcaloides, metabólitos com grande potencial terapêutico (SIMINSKI T, et al., 2015). Ademais, espécies pertencentes a esta família caracterizam-se quimicamente pela ocorrência frequente de alcaloides (SCHRIPSEMA J, et al., 2004).

Espécies do gênero *Aspidosperma* são usadas pela medicina popular em doenças parasitárias como malária e leishmaniose. Também são usadas em diversas infecções e em feridas de difícil cicatrização (BOURDY G, et al., 2001; OLIVEIRA FQ, et al., 2003). No entanto, apesar do potencial terapêutico, espécies deste gênero carecem de estudos, como é o caso da *Aspidosperma nitidum*, popularmente conhecida como carapanaúba (Brasil) Jaroro hariraros, apokuita e padapan (Suriname), gabetillo (Bolívia), objeto de estudo do presente trabalho (FERREIRA-NETO WM, 1988).

A. nitidum é encontrada no continente americano, numa área que se estende do Panamá ao Brasil, sendo florescente principalmente entre os meses de julho a setembro. Morfologicamente esta espécie se caracteriza por árvores de 7 a 40 metros de altura, com tronco sulcado ou lamelado (FERREIRA-NETO WM, 1988). É uma planta bastante utilizada na medicina tradicional. Há relatos do uso em inflamações do útero e ovários, em problemas relacionados à diabetes e problemas do estômago. Também é usada contra câncer, e ainda como contraceptivo (RIBEIRO JELS, et al., 1999). Há também indicação para Malária e seu tratamento sintomático. Na Colômbia, o látex de *A. nitidum* é utilizado por índios para tratamento da hanseníase, contra febre e reumatismo (RIBEIRO JELS, et al., 1999; WENIGER B, et al., 2001).

Estudos fitoquímicos realizados em *A. nitidum* demonstraram o isolamento de vários alcaloides como: 10-metoxi-18,19-dihydrocorinanteol, corinanteol, aspidospermina, quebracamina, ioimbina, ácido harmanocarboxílico, ácido 3-metil-harmanocarboxílico, di-hydrocorinanteol, des-hidroisirikina e braznitidumina (ARNDT RR et al., 1967; MARQUES MFS, et al., 1996; PEREIRA MM, et al., 2007).

Apesar do vasto uso na medicina tradicional e da diversidade fitoquímica da espécie, nenhuma das abordagens apresentadas avaliou *A. nitidum* quanto ao seu potencial antimicrobiano, tornando essencial estudos que abordem essa questão. Sendo assim, o objetivo do trabalho consistiu em avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e de suas frações obtidos a partir da casca de *A. nitidum*.

MÉTODOS

Material vegetal

Cascas do tronco de *A. nitidum* foram coletadas na rodovia estadual PA-150 (“coordenadas S 02° 09' 50.3” e W 048° 47' 56.9”), no estado do Pará, em agosto de 2017. A excisata encontra-se depositada em um Herbário do referido estado. O projeto está cadastrado na plataforma do sistema nacional de gestão e patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SIGGEN) sob inscrição A2C3188.

Microrganismos

Foram utilizados isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* gentilmente cedidas pelo Laboratório Beneficente de Belém (R. dos Mundurucus, 1818 - Batista Campos, Belém - PA, 66035-360), em ágar nutriente e mantidas em refrigerador a 8°C até a realização dos testes.

Preparação do extrato e obtenção das frações

As cascas de *A. nitidum* foram lavadas em água corrente e secas em estufa de ar circulado (40°C, por 7 dias). O material seco foi submetido à moagem em moinho de facas. O pó da planta foi submetido à maceração com etanol a 96° GL (proporção 1:10). A solução etanólica foi filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida até total evaporação do álcool, obtendo-se o extrato etanólico seco (EE).

O EE (5 g) foi submetido à partição ácido: base, sendo solubilizado em etanol (4,0 mL) e adicionado solução aquosa de ácido clorídrico a 3% (7,5 mL). Esta solução foi extraída com diclorometano (250 mL por 3 vezes), obtendo-se a fração de neutros (FN). A camada aquosa ácida foi alcalinizada com hidróxido de amônio a 10 % (NH₄OH) até pH 9, seguida de nova extração com diclorometano (250 mL por 3 vezes), sendo obtida uma camada aquosa alcalina e uma camada orgânica (fração de alcaloides-FA).

Atividade antimicrobiana

Avaliação Preliminar da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato e suas frações (FA e FN), foi empregado o método de disco difusão em ágar. Esse ensaio serviu como *screening* para selecionar as amostras que obtiveram atividade antimicrobiana para posterior verificação da concentração inibitória mínima (CIM). No método de disco difusão, as culturas bacterianas desenvolvidas em caldo Mueller-Hinton por 24 horas foram diluídas (cerca de 10⁸ UFC/mL) e semeadas por esgotamento total na superfície de ágar Mueller-Hinton. A seguir, discos de papel de filtro (6 mm) impregnados com as amostras (EE, FA e FN) a serem testados foram colocados sobre a superfície do ágar inoculado na dose de 1000 µg/disco e incubados por 48 horas a 37°C.

Como controle negativo foi utilizado discos impregnados com Dimetilsulfóxido (DMSO), solvente utilizado para solubilização das amostras. Como controles positivos foram utilizados os antibióticos Amoxicilina/Clavulanato e Gentamicina. Para leitura dos resultados, as amostras que apresentaram halo de inibição ao redor dos discos foram consideradas positivas e as que não apresentaram foram consideradas negativas (BAUER AW, et al., 1966; NCCLS, 2003).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As amostras consideradas positivas na atividade antimicrobiana de avaliação preliminar foram submetidas à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo. As culturas bacterianas desenvolvidas em caldo Muller-Hinton e diluídas (cerca de 10⁸ UFC/mL) foram colocadas em placas de 96 poços previamente dosificadas com as amostras (EE, FA e FN) nas concentrações de 1000

µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,5 µg/mL, 15, 625 µg/mL. Como controle negativo utilizou-se o DMSO (CLSI, 2015). Como controle positivo amoxicilina/clavulanato para *S. aureus* e gentamicina para *E. coli* nas concentrações de 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,5 µg/mL, 15, 625 µg/mL, 7,814 µg/mL, 3,906 µg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após período de incubação, foram acrescentados 10µL de solução de MTT (5mg/mL), e as placas foram novamente incubadas por 4h. A CIM é a menor concentração das amostras testadas onde não houve crescimento bacteriano visível (CHAUD MV, et al., 2005). Os resultados da CIM foram interpretados como: CIM < 100 µg/mL: ativo, entre 100 a 500 µg/mL: moderadamente ativo, entre 500 a 1000 µg/mL: fraca atividade e acima de 1000 µg/mL: inativo (DALL' AGNOL R, et al., 2003; TANAKA JCA, et al., 2005).

RESULTADOS

No processo de extração do pó das cascas de *A. nitidum* através da maceração com etanol, obteve-se um rendimento de 8,78% de extrato (87,8 g). O fracionamento desse extrato por partição ácido-base, gerou as frações de neutros (24,73%) e alcaloides (20,56%).

Na avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato e suas frações (FA e FN) no teste de disco difusão em ágar sobre os microrganismos, verificou-se que todas amostras foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, pois observou-se halo de inibição ao redor dos discos, logo foram consideradas positivas (Tabela 1). Por outro lado, frente às cepas de *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*, tanto o extrato quanto suas frações (FA e FN) foram considerados negativos, pois não houve formação de halo de inibição ao redor dos discos (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana das amostras obtidas de *Aspidosperma nitidum*.

Microrganismos	Amostras (1000 µg/disco)			
	EE	FA	FN	CP*
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+

Legenda: EE: extrato etanólico; FA: fração de alcaloides; FN: fração de neutros; CP: controle positivo - *Amoxicilina/CLAV e Gentamicina; +: Positivo; -: Negativo.

Fonte: Brígido HPC, et al., 2020.

Na determinação da concentração inibitória mínima, o EE obtido da casca de *A. nitidum* apresentou CIM de 250µg/mL frente à cepa de *S. aureus*, sendo considerado moderadamente ativo. Já as frações FA e FN apresentaram CIM de 500 µg/mL, possuindo fraca atividade antimicrobiana. Em *E. coli*, tanto o EE quanto as frações FA e FN apresentaram fraca atividade, pois apresentaram CIM de 1000 µg/mL (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras obtidas de *Aspidosperma nitidum*.

Microrganismos	Amostras (µg/mL)			
	EE	FA	FN	CP*
<i>Escherichia coli</i>	1000	1000	1000	3,906
<i>Staphylococcus aureus</i>	250	500	500	3,906

Legenda: EE: extrato etanólico; FA: fração de alcaloides; FN: fração de neutros; CP: controle positivo - *Amoxicilina/CLAV e Gentamicina.

Fonte: Brígido HPC, et al., 2020.

DISCUSSÃO

A investigação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico e de suas frações obtidos a partir da casca de *A. nitidum*, demonstrou que a planta possui atividade antimicrobiana promissora contra cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Tratando-se da questão relacionada à resistência dos microrganismos aos medicamentos disponíveis, esse resultado serve como base para futuros estudos para o desenvolvimento de fármacos antimicrobianos.

Uma característica importante ao se analisar antimicrobianos é que o perfil de inibição de crescimento bacteriano pode variar entre diferentes microorganismos quando em contato com diferentes substâncias usadas como antimicrobianas (VOLKART PA, et al., 2017). Neste estudo, inicialmente, foi avaliado o comportamento de 5 cepas (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*) com relação ao crescimento e formação de halos de inibição ao redor dos discos contendo amostras de *A. nitidum* (EE, FN e FA) através do teste de disco difusão em ágar (Tabela 1).

Nesse ensaio, apenas *S. aureus* e *E. coli* foram sensíveis a todas as amostras testadas (EE, FA e FN), inibindo o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* no teste de disco difusão em ágar (**Tabela 1**). Atividade semelhante foi observada por outros autores, utilizando outras espécies do gênero *Aspidosperma* (AGRIPINO DG, et al., 2004; TANAKA JCA, et al., 2006; OLIVEIRA VB, et al., 2009).

Tal atividade foi relacionada aos alcaloides, por alguns autores. Tanaka JCA, et al. (2006), por exemplo, sugerem que a atividade do extrato metanólico da casca de *Aspidosperma ramiflorum* frente à cepa de *S. aureus* esteja relacionada com a alta quantidade de alcaloides, dentre eles o alcaloide isolado da espécie, a ramiflorina, que também apresentou atividade frente a esta cepa. Estudo realizado por Oliveira VB, et al. (2009) atribuiu a atividade antimicrobiana de *Aspidosperma excelsum* frente à cepa de *E. coli* aos alcaloides indólicos.

Quando analisamos as outras cepas Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*), observamos que o extrato e suas frações foram considerados inativos (Tabela 1). Outros estudos também demonstram a inatividade das *Aspidospermas* frente a bactérias gram-negativas (OLIVEIRA VB, et al., 2009; PESSINI GL, 2012). O extrato etanólico e frações obtidas de *A. tomentosum*, *A. macrocarpum* e *A. pyrifolium* foram inativas em *P. aeruginosa*, entretanto, também foram inativas em *E. Coli* (PESSINI GL, 2012). Outro estudo também mostra que o extrato bruto obtido de *A. ramiflorum*, *A. pyricolum*, *A. olivaceum*, *A. dispersum*, *A. pyrifolium*, *A. polyneuron* foram inativos contra *P. Aeruginosa* (OLIVEIRA VB, et al., 2009).

A inatividade da ação antimicrobiana de cepas Gram-negativas no teste de disco-difusão pode estar relacionada com diferenças estruturais entre os tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que conferem diferentes graus de permeabilidade de substâncias na parede bacteriana, sendo que, bactérias Gram-negativas possuem maior seletividade quanto à passagem de substâncias. A presença de estruturas como membrana externa e cápsula, presença de porinas ou, até mesmo, não transcrição de canais de porinas - a partir de mecanismos de resistência bacteriana - que podem dificultar a ação de substâncias ativas das amostras investigadas (KONEMAN EW, et al., 1999; BRUNTON L, HILAL-DANDAN R, 2015).

Além do perfil antimicrobiano ser variável entre microrganismos, como comentado anteriormente, neste estudo, também percebe-se diferença de perfil de atividade antimicrobiana relacionada às amostras estudadas, as quais variaram na determinação da concentração inibitória mínima, variando de atividade moderada (EE - CIM de 250 µg/mL para *S. aureus*) à atividade fraca (FA e FN - CIM de 500 µg/mL para *S. aureus*; EE; FA e FN - atividade antimicrobiana fraca para *E. coli*). Primeiramente, observa-se que, além do tipo de metabolito secundário presente (alcaloides), também, pode-se observar a interferência da concentração de metabólitos na amostra.

Portanto, outra hipótese para a inatividade da ação antimicrobiana em tais cepas (**Tabela 2**) pode estar relacionada com a concentração de substâncias ativas presente nas amostras, ou seja, o extrato e frações FA e FN podem apresentar baixa concentração de compostos ativos ou ainda, não apresentar nenhuma molécula ativa sobre as cepas. Essa característica pode estar relacionada com o fracionamento das amostras obtidas, uma vez que o fracionamento pode aumentar a atividade de compostos químicos ativos (GALUCIO NCR, 2014) e poderá também diminuir tal atividade.

O presente estudo mostrou que o fracionamento do extrato etanólico não contribuiu para a atividade antimicrobiana na cepa em questão, pois, ao analisarmos o seu fracionamento, tanto a fração rica em alcaloides (FA) quanto a FN apresentaram CIM de 500 µg/mL (**Tabela 2**). Ao analisarmos *E. coli* frente às amostras de *A. nitidum*, tanto o EE quanto suas frações FA e FN apresentaram atividade fraca (CIM: 1000 µg/mL; Tabela 2). A *E. coli* também faz parte das bactérias Gram-negativas e esse achado pode estar relacionado a estrutura anatômica e fisiológica desse tipo de bactéria, como citado anteriormente.

Diante do exposto, observa-se ação antimicrobiana promissora para o EE – o qual apresentou atividade antimicrobiana no teste de difusão em ágar e foi ensaiado para determinação da CIM para cada uma das espécies bacterianas (OSTROSKY EA, et al., 2008) e mostrou melhor CIM frente a cepa de *S. aureus* (CIM: 250µg/mL; Tabela 2).

Assim como nesse estudo, a família Apocynaceae mostra ação antimicrobiana quando estudada por outros autores. Relacionado ao gênero *Aspidosperma*, muitos autores relatam tal atividade tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas. Conegero LS, et al. (2003), ao avaliar a atividade do extrato bruto metanólico de *A. glandulosa* na avaliação da CIM, verificou-se moderada atividade (125 a 250 µg/mL).

O extrato bruto etanólico da casca da raiz de *A. tomentosum* demonstrou atividade antibacteriana fraca sobre *S. aureus* e *B. subtilis* e a fração de alcaloides do caule de *A. pyriformium* apresentou atividade moderada para *S. aureus* e *B. subtilis*. (PESSINI GL, 2012). O extrato metanólico das cascas do caule de *A. ramiflorum* demonstrou atividade moderada em *B. subtilis* e *S. aureus* e *E. faecalis* (TANAKA JCA, et al, 2006). O extrato bruto etanólico de *A. pyricolum* e *A. Olivaceum* foram moderadamente ativos contra cepas de *B. subtilis* (OLIVEIRA AJB, 2009).

Relacionado a outros gêneros de Apocynaceae, essa ação também é relatada. Brandão DLN, (2012) verificou que o extrato e fração de alcaloides obtidos de *Geissospermum vellosii* apresentaram CIM de 125 µg/mL frente a *S. Aureus*. Gonçalves DM, et al. (2011) demonstraram que o extrato de obtido de *Tabernaemontana catharinensis* teve atividade antimicrobiana *in vitro* frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Dando enfoque aos metabólitos presentes em espécies de Apocynaceae, verifica-se constantemente a presença de alcaloides como constituintes ativos. *Tabernaemontana catharinensis*, por exemplo, possui composição química rica em alcalóides indólicos, mostrando o potencial biológico desses constituintes. Os alcaloides indólicos extraídos de *Aspidosperma marcgravianum* exibiram atividade antimicrobiana e citotóxica. Assim como, alcaloides indólicos isolados de *Aspidosperma excelsum* Benth apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (PEREIRA MM, et al., 2007).

Além disso, há estudos que evidenciam os alcaloides como compostos ativos para atividade antimicrobiana. Na avaliação da atividade antimicrobiana, da espécie *Zanthoxylum stelligerum*, por exemplo, houve inibição do crescimento *in vitro* de microrganismos e os autores indicaram a substância pura diidroqueleritrina, um alcalóide benzofenantridínico, como uma das substâncias ativas responsáveis por esta atividade. Essa espécie apresentou uma discreta atividade frente a cepa de *S. aureus*. O alcaloide diidroqueleritrina exibiu um espectro de ação mais amplo que o perfil do extrato que o originou, o extrato metanólico da raiz da planta. Também houve atividade antimicrobiana frente a cepas Gram positivas e *E. coli*, uma bactéria Gram negativa (SILVA CV, et. al, 2010).

No presente estudo, a partir dos resultados positivos para CIM, podemos considerar que a ação apresentada pode estar relacionada com os metabólitos presentes em *A. nitidum*. Estudos fitoquímicos demonstraram que *A. nitidum* é constituída majoritariamente por alcaloides indólicos e alcaloides β-carbolínicos (ARNDT RR et al., 1967; MARQUES MFS, et al., 1996; PEREIRA MM, et al., 2007).

Brígido HPC, (2019) analisando a composição do EE, FA e FN obtido da casca de *A. nitidum* em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD), verificou que extrato etanólico apresentou compostos sugestivos de alcaloides β-carbolínicos e de alcaloides indólicos, a fração de alcaloides e a fração de neutros apresentaram compostos sugestivos apenas de alcaloides indólicos, mostrando que o fracionamento do extrato por partição ácido: base não foi eficiente para separação de alcaloides β-carbolínicos para estas frações. Neste contexto, tais resultados levantam a hipótese de que a maior atividade antimicrobiana do extrato frente à cepa de *S. aureus* pode estar relacionada com alcaloides β-carbolínicos, ou com um possível sinergismo entre esta classe de alcaloides e alcaloides indólicos.

Apesar de os resultados não se mostrarem inicialmente atrativos para a atividade antimicrobiana nesse estudo, mostram-se promissores, já que espécies de *Aspidosperma* são usadas na medicina tradicional para o tratamento de feridas, o que instiga a investigação sobre tal uso, sobretudo, por apresentarem metabólitos

com diversas atividades biológicas, como é o caso dos alcaloides. Além disso, a investigação bacteriana dessas espécies de *Aspidosperma* podem ser averiguadas novamente, com fracionamento mais detalhado e realizado frente a outras cepas de bactérias. Devendo-se considerar também estudos que evidenciem fatores relacionados ao organismo, mecanismo de ação, até mesmo para suprir mecanismos de resistência bacteriana ou possível uso como adjuvante nos tratamentos e sinergismo farmacológico.

Tais resultados levantam a importância da pesquisa realizada a partir de produtos naturais. Sendo essencial que estudos preliminares de ação antimicrobiana sejam realizados para levar ao direcionamento estudos minuciosos de investigação fitoquímica. Relacionado ao estudo da espécie em questão, é primordial saber se há a presença de alcaloides já isolados em estudos anteriores em outras espécies de *Apocynaceae* e, futuramente, contribuir para a pesquisa de novos fármacos com ação antimicrobiana, sendo o primeiro relato de estudo de ação antimicrobiana de *A. nitidum*.

CONCLUSÃO

Foi demonstrado que o extrato e suas frações (FA e FN) obtidos de *A. nitidum* possuem potencial antimicrobiano contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Tal atividade pode estar relacionada com a presença de alcaloides. Sendo assim, os resultados obtidos estimulam a continuidade do estudo, visando o isolamento de substâncias, na perspectiva de revelar um composto com alta atividade antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS E FINANCIAMENTO

Os autores agradecem a Faculdade Cosmopolita, ao Laboratório Beneficente de Belém e ao Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas (LFDN) da Universidade Federal do Pará.

REFERÊNCIAS

1. AGRIPINO DG, et al. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and NA-damaging activities. I. Atlantic rain forest- Ecological station Juréia-Itatins. *Biota Neotropica*, 2004; 4(2): 1-15.
2. ARNDT RR, et al. Alkaloid studies- LVIII: the alkaloids of six *Aspidosperma* species. *Phytochemistry*, 1967; 6(12): 1653-58.
3. BAUER AW, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 1966; 45(4): 493-6.
4. BECKER K, et al. Infectious diseases – a global challenge. *International Journal of Medical Microbiology*, 2006; 296: 179-185.
5. BERQUÓ LS, et al. Utilização de medicamentos para tratamento de infecções. *Revista de Saúde Pública*, 2004; 38(3): 358-64-528.
6. BOURDY G, et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the tacana indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 2001; 77(1): 91-8.
7. BRANDÃO DLN. *Portulaca pilosa* L. e *Geissospermum vellosii*. Estudos Botânicos, Farmacognósticos, Fitoquímicos e Atividades Biológicas. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.
8. BRÍGIDO HPC. Atividade Antileishmania in vivo da Casca de *Aspidosperma nitidum* Benth. Ex Müll. Arg. (*Apocynaceae*). Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica). - Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará, Belém, 2019; 70 p.
9. BRUNTON LL, HILAL-DANDAN R. Princípios gerais do tratamento antimicrobiano. In: manual de farmacologia e terapêutica de GOODMAN & GILMAN. 2 ed. Porto Alegre (RS): Mc Graw Hill/Artmed, 2015; 829-833.
10. CHAUD MV, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2005; 15(4): 316-320.
11. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Wayne, CLSI, 2015; 10th ed. M07-A10.
12. CONEGERO LS, et al. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (*Euphorbiaceae*). *Química nova*, 2003; 26(6): 825-7.
13. DALL' AGNOL R, et al. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*, 2003; 10(6-7): 511-6.
14. FERREIRA-NETO WM. *Aspidosperma* Mart., norm. cons. (*Apocynaceae*): estudos taxonômicos. Tese de Doutorado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988; 431p.
15. GALUCIO NCR. Estudos fitoquímicos, Citotoxicidade e Genotoxicidade de *Eleutherine Plicata* Herb., Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Pará, Belém, 2014; 90 p.

16. GONÇALVES DM, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC Revista Brasileira Plantas Medicinai, 2011; 13 (2): 197-202.
17. KLEIN T, et al. Fitoterápicos: Um mercado promissor. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2009; 30(3): 241-8.
18. KONEMAN EW, et al. Diagnóstico microbiológico texto e Atlas Color. 5. Ed. Buenos Ayres: Panamerica, 1999.
19. MARQUES MFS, et al. Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. Phytochemistry, 1996; 41(3): 963-7.
20. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). 2003; Pennsylvania. 8th ed. 19087-1898.
21. OLIVEIRA FQ, et al. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. Revista Brasileira de Plantas Medicinai, 2003; 5(2): 23-31.
22. OLIVEIRA VB, et al. Atividade biológica e alcaloides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. Revista Brasileira de Plantas Medicinai, 2009; 11(1): 92-9.
23. OLIVEIRA AJB, et al. Preliminary studies on the antibacterial activity of ethanol crude extracts and alkaloids from species of *Aspidosperma*. Pharmaceutical Biology; 2009; 47(1): 1085-1089.
24. STROSKY EA, et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, 2008; 18(2): 301-307.
25. PEREIRA MM, et al. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). Revista Química Nova, 2007; 30(4): 970-983.
26. PESSINI GL. Evaluation of antimicrobial activity of three *Aspidosperma* species. Pharmacology online 2012; 1(1): 112-119.
27. RIBEIRO JELS, et al. Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. 19. ed. Manaus: Midas Printing, 1999; 568-81p.
28. SCHRIPSEMA J, et al. Alcaloides indólicos in *Aspidosperma*. In: SIMÕES CMO, et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2004. Porto Alegre/ Florianópolis: 689-716.
29. SILVA CV, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste brasileiro. Brazilian Journal of Pharmacognosy, 2010; 20(3): 355-360.
30. SIMINSKI T, et al. Avaliação da atividade Antimicrobiana das espécies *Aspidosperma nitidum*, *Annona crassiflora* e *Annona mucosa* frente cepas ATCC. Enciclopedia Biosfera, 2015.
31. TANAKA JCA, et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). Química Nova, 2005; 28(5).
32. TANAKA JCA, et al. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2006; 39(3): 387-391.
33. VOLKART PA, et al. Avaliação da susceptibilidade e resistência bacteriana aos agentes controladores do crescimento de uso hospitalar e industrial. Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, 2017; 21(1): 25-32.
34. WENIGER B, et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. Journal of Ethnopharmacology, 2001 78(2-3):193-200
35. WHO. Antimicrobial resistance, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.