

Avaliação do potencial biológico da *Tabebuia aurea* (Silva Manso) como fonte de moléculas bioativas para atividade antimicrobiana, antiedematogênica e antirradicalar

SANTOS, R.F.E.P.¹; CONSERVA, L.M.¹; BASTOS, M.L.A.^{1*}; CAMPESATTO, E.A.¹

¹Universidade Federal de Alagoas, Escola de Enfermagem e Farmácia. Campos A.C. Simões, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro dos Martins, Maceió – AL, CEP: 57072-900 *Autor para correspondência: lysetebastos@gmail.com

RESUMO: As espécies da família Bignoniaceae e do gênero *Tabebuia* são amplamente utilizadas na medicina tradicional e possuem um forte potencial terapêutico. Diante disso, objetivou-se avaliar o potencial biológico da *Tabebuia aurea*, determinando a atividade antimicrobiana; por meio do método da microdiluição em caldo, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); antiedematogênica, pelo ensaio de edema de orelha induzido por capsaicina; e antirradicalar, frente ao radical DPPH. Os extratos etanólicos de *T. aurea* não evidenciaram citotoxicidade, exceto o extrato etanólico da flor nas concentrações > 0,5 mg mL⁻¹. O extrato etanólico da flor foi ativo com ação bactericida frente a *S. epidermidis* (CIM de 0,06 mg mL⁻¹) enquanto o extrato etanólico da folha foi moderadamente ativo frente a *S. epidermidis* (CIM: 0,25 mg mL⁻¹) e *S. aureus* (CIM: 0,50 mg mL⁻¹) sugerindo ação bacteriostática para ambas as linhagens. Os dois extratos apresentaram ação antiedematogênica, com inibição do edema de 40,50% pelo extrato etanólico da flor e de 41,73% pelo extrato da folha. *T. aurea* não apresentou atividade antirradicalar. Os resultados comprovam o perfil antibacteriano e antiedematogênico com ausência de citotoxicidade pela *T. aurea*. Sugere-se a continuação dos testes com frações e substâncias isoladas das flores e folhas da referida espécie vegetal, bem como de experimentos *in vivo*, como forma de agregar evidências visando à busca de novos fitoterápicos.

Palavras-chave: *Tabebuia aurea*. Antimicrobianos. Viabilidade Celular.

ABSTRACT: Biological potential assessment of *Tabebuia aurea* (Silva Manso) as a source of bioactive molecules for antimicrobial, antiedematogenic and antiradical activity. The species of Bignoniaceae family and genus *Tabebuia* are widely used in the traditional medicine and have a great therapeutic potential. The aim of the current research was to evaluate the biological potential of the *Tabebuia aurea*, determining its antimicrobial activity by the microdilution broth method, to predict the anti-edematogenic Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by ear edema assay induced by capsaicin; and the antiradical one, towards DPPH. The ethanol extracts of *T. aurea* showed no cytotoxicity, except for the flower ethanol extract in concentrations above > 0.5 mg mL⁻¹. The ethanol extract of the flower was active, with bactericidal action, against *S. epidermidis* (MIC 0.06 mg mL⁻¹) and the ethanol extract of moderately active recto *S. epidermidis* (CIM: 0.25 mg mL⁻¹) and *S. aureus* (MIC: 0.50 mg mL⁻¹) were bacteriostatic for both strains. Both extracts had antiedematogenic action on the inhibition of edema of 40.50% by the ethanol extract of the flower and 41.73% by leaf extract. *T. aurea* did not show antiradical activity. The results indicate the antibacterial and antiedematogenic profile with no cytotoxicity by the *T. aurea*. It suggests the continuation of tests with isolated fractions and substances of flowers and leaves of that plant species as well as *in vivo* trials, in order to enhance the evidences targeted on finding new herbal medicines.

Keywords: Herbal Medicinal. *Tabebuia aurea*. Antimicrobials. Cell Viability.

INTRODUÇÃO

Tabebuia aurea é uma espécie arbórea pertencente à família Bignoniaceae e ao gênero *Tabebuia*, comum na caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, no Cerrado, Floresta Amazônica e Pantanal, sendo utilizada para fins ornamentais, medicinais, construção civil, entre outros (Lorenzi, 2002).

Os estudos sobre as atividades biológicas de *T. aurea* são escassos, porém esta espécie é usada popularmente como anti-inflamatório, contra a gripe (Souza & Felfili, 2006) e para picada de cobra (Reis et al., 2014). O extrato etanólico de suas hastas evidenciou atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* com concentrações letais médias (9-54 µg ml⁻¹) bem abaixo do limite superior de 100 µg ml⁻¹, estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (Silva et al., 2007).

Estudos fitoquímicos com *T. aurea* isolaram flavonóides (Guerbas Neto, 2003) e terpenóides (Soares, 2006). Barbosa-Filho et al. (2004) isolou oito substâncias a partir das cascas do caule de *T. aurea* (β-sitosterol; lapachol; os ácidos veratric, betulínico e p-anísico; cinamato de metila e de (p-hidroxi)etila; 3,4',5-triidroxi-7-metoxiflavona).

Estes compostos isolados das cascas de *T. aurea* evidenciaram um potencial antimicrobiano, por meio do teste de difusão em disco, contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Monilia sitophila*. Segundo Barbosa-Filho et al. (2004), estes resultados dão suporte aos usos medicinais tradicionais desta espécie.

Espécies do gênero *Tabebuia* têm sido usadas empiricamente como fonte de agentes anti-inflamatório, antitumorais e antimicrobianos (Franco et al., 2013). Resultados de pesquisas básicas pré-clínicas desenvolvidas com este gênero evidenciaram o forte potencial antimicrobiano e antirradicalar, com ausência de citotoxicidade (Vasconcelos et al., 2014; Silva et al., 2014).

A literatura demonstra que espécies do gênero *Tabebuia* são amplamente utilizadas na medicina tradicional, e apresentam forte potencial terapêutico, o que se justifica a necessidade de avaliar o potencial biológico de *Tabebuia aurea*, determinando sua atividade antimicrobiana, antiedematogênica e antirradicalar, de partes como flores e folhas, as quais ainda não têm relato destas atividades.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 300 g das folhas e 300 g das flores da *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth.

& Hook. f. ex. S. Moore, conhecida popularmente como craibeira, ipê-amarelo ou “paratudo”, em outubro de 2012, na Reserva Ecológica do Castanho, Delmiro Gouveia/AL, região do semi-árido alagoano (Coordenadas geográficas: 9° 26' 20.5" S e 37° 53' 54.7" W). A identificação foi feita no Instituto do Meio Ambiente do Estado de Alagoas, onde uma exsicata encontra-se catalogada com o MAC nº 56122.

A pesquisa foi aprovada com nº do processo 011/2014 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL).

A secagem das folhas e flores foi realizada a sombra com ar circulante durante 60 dias. Depois de dessecadas, as amostras foram trituradas e submetidas à maceração a frio com álcool etílico a 97%, de 72 em 72 horas. A cada filtração, a solução com extrato foi concentrada em evaporador rotativo a 40 °C e mantido em estufa banho-maria, para evaporação do solvente residual e obtenção do extrato etanólico.

Ensaio de viabilidade celular

Segundo a metodologia descrita por Lima et al. (2006), avaliou-se a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem *Swiss*, utilizando o Método Colorimétrico Metiltetrazolium (MTT), baseado na atividade das mitocôndrias pela redução do MTT.

As células foram plaqueadas (3 x 10⁵/por poço) e ficaram “over night”, durante à noite, após foram expostas à diferentes concentrações dos extratos (1.000, 500, 200 e 100 µg mL⁻¹) por 48 horas. Os controles continham células com meio de cultura (Meio Dulbecco Modificado por Eagle - DMEM) e com o diluente Dimetilsulfóxido. Após a incubação, foram adicionados 100 µL da solução de MTT e as placas foram reincubadas (4 horas em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂) e lidas em um leitor de microplacas (530 nm). Os resultados foram analisados pelo programa *Graphpad Prism 5.0*® usando ANOVA, seguido do teste Dunnett, relacionado à lise. Os valores foram considerados significativos quando *p<0,05.

Microdiluição em Caldo

Foram utilizadas linhagens padronizadas pela *American Type Cell Collection* – ATCC/Manassas - VA/USA. São elas: bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 31488) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Enterobacter*

aerogenes (ATCC), *Shigella flexneri* (ATCC), *Salmonella enterica* (ATCC 1307), *Acinetobacter calcoaceticus* (ATCC 23055); e o fungo *Candida albicans* (ATCC 24433).

A atividade antimicrobiana foi determinada por meio da Concentração Inibitória Mínima (CIM), conforme o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012a). As amostras foram dissolvidas em Cremophor a 2%, obtendo-se 20 mg mL⁻¹.

Os inóculos foram preparados em Solução Salina Tamponada e a suspensão bacteriana foi determinada pela turvação do tubo 0,5 da escala de Mc Farland (1,5 x 10⁸ UFC/mL), diluída numa proporção de 1:10, obtendo-se entre 5 x 10⁵ UFC/mL e 5 x 10⁴ UFC/poço. A suspensão fúngica, também determinada pelo tubo 0,5 de Mc Farland (1-5 x 10⁶ UFC/mL), foi diluída 1:50 para se conseguir 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL (CLSI, 2012b).

A CIM foi realizada em microplacas de poliestireno de 96 poços. Todos os orifícios foram preenchidos com 100 µL de caldo de cultivo Müeller-Hinton (MH). Nas colunas de 1 a 9 da linha A, 100 µL da solução das amostras foram inoculados, em triplicata, obtendo-se uma concentração de 10 mg mL⁻¹. Em seguida, 100 µL da linha A foi transferido para a B, e após homogeneização para a C, repetindo-se até a linha H. Obtendo-se concentrações decrescentes em mg mL⁻¹ de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,15 e 0,07.

Posteriormente, foram adicionados 5 µL de inóculo microbiano. Para o controle positivo utilizou-se o caldo de cultivo MH e o inóculo microbiano; o controle negativo avaliou a ação inibitória do diluente; e o controle de esterilidade, apenas o caldo MH.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 18 horas para as bactérias e por 28°C por 36 h para o fungo. Após este período, foram adicionados 20 µL de Cloreto de Trifenil Tetrazólio (TTC) a 5% (v/v), corante que promove a coloração das colônias

sem comprometer sua viabilidade, e as placas foram reincubadas por mais 3 horas. A mudança de incolor para vermelho significou a presença de microrganismos e a ausência da coloração vermelha significou a ação inibitória do extrato sobre os microrganismos testados (Ayres et al., 2008; CLSI, 2012a).

A atividade antimicrobiana foi determinada de acordo com os seguintes critérios: CIM ≤ 1,0 mg mL⁻¹ (ativa); 1,0 < CMI ≤ 0,5 mg mL⁻¹ (moderadamente ativa); 0,5 < CMI ≤ 1,0 mg mL⁻¹ (baixa atividade); e CIM > 1,0 mg mL⁻¹ (inativos) (Ayres et al., 2008).

Uma alíquota das CIMs foram plaqueadas em meio *Agar Mueller Hinton* (AMH) ou *Agar Sabouraud Dextrose* (ADS), desprovido de microrganismo. Após 24 horas de incubação a 35°C, para as bactérias, e a 28°C por 48 horas, para os fungos, considerou-se com ação bacteriostática o extrato que inibiu o crescimento do microrganismo na CIM, mas que houve crescimento na subcultura e ação bactericida o extrato que inibiu o crescimento na CIM e também na subcultura (Rocha et al., 2013).

Avaliação da atividade antiedematogênica

Foi realizado o ensaio de edema na orelha induzido por capsaicina em camundongos da linhagem *Swiss*, de acordo com Mantione & Rodriguez (1990) modificado. Foram pesados 10 mg das amostras e solubilizadas em 20 µL de Tween 80, 980 µL de acetona, ficando numa concentração de 0,1%, administrados topicamente 40 minutos antes do estímulo flogístico induzido pela administração local na orelha direita de 20 µL de capsaicina diluída em acetona (12,5 mg mL⁻¹) (RAUH, 2008). Na orelha esquerda foi aplicado somente o veículo (20 µL) utilizado para dissolução.

Os animais foram sacrificados 30 minutos após o estímulo flogístico e suas orelhas foram cortadas e pesadas, numa balança analítica, para obtenção do índice de inflamação. A porcentagem de inibição do edema foi determinada pela fórmula:

$$\% \text{ inflamação} = \frac{\text{Peso da orelha D (Tratada)} - \text{Peso da orelha E (controle)}}{\text{Peso da orelha E (Controle)}} \times 100$$

Foram avaliados 4 grupos experimentais com n=6. No controle positivo foi avaliada a ação tópica da dexametasona (10 mg mL⁻¹), agente antiinflamatório, e no controle negativo apenas a capsaicina. Os resultados foram analisados pelo programa *Graphpad Prism 5.0*[®], usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os valores foram considerados significativos quando *p<0,05.

Avaliação da atividade antirradicalar

De acordo com Soler-Rivas et al. (2000), realizaram-se os testes qualitativos e após a dissolução dos extratos em clorofórmio (CHCl₃), alíquotas (2 µL) foram aplicadas em cromatoplasas 5 x 20 (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck), eluídas em solventes, e aplicou-se o controle positivo (+)-Catequina (2µL, 1 mg mL⁻¹ em CHCl₃). Em seguida, as cromatoplasas foram imersas, durante 10 segundos, em solução metanólica do radical sintético 2,2-difenil-1-picrilidazila (DPPH) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 0,4 mM e secas. O surgimento de manchas amareladas sob um fundo roxo nos sugeriu uma possível capacidade sequestradora de radicais livres.

Posteriormente, foi determinada a curva de calibração do DPPH, por meio de uma solução estoque de DPPH metanólica (40 µg mL⁻¹ ~ 100 µMol L⁻¹) e foram feitas diluições seriadas de 40 a 1 µg mL⁻¹, submetidas à análise em espectrofotômetro UV/VIS, (SP-220 da Biospectro e UV mini-1240 Shimadzu®) a 515 nm. Como controle positivo utilizou-se MeOH grau HPLC.

A curva foi construída a partir dos valores médios de absorbância de cada solução do DPPH versus as concentrações de 1 a 40 µg mL⁻¹, por

meio da análise de regressão linear utilizando o programa *Microcal Origin Pro 8.0* (Figura 1). Esta análise forneceu a equação matemática da curva de calibração: $Y = A + B \cdot x$, no qual: A = coeficiente linear; B = coeficiente angular ou inclinação da reta; x = concentração de DPPH aos 60 minutos; com seu desvio padrão e coeficiente de correlação.

Os extratos etanólicos que forneceram resultados positivos nos testes qualitativos foram solubilizados em metanol (MeOH) grau HPLC obtendo-se concentrações de 12,5 a 200 µg mL⁻¹ para a avaliação quantitativa. Alíquotas de 0,1 mL dessas concentrações foram diluídas em 0,9 mL de solução metanólica do DPPH (100 µmol L⁻¹). Da mesma maneira as soluções estoques dos controles positivos padrões: Ácido Ascórbico e BHT (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) foram preparados. A leitura da absorbância das concentrações, em triplicata, contra a solução de MeOH grau HPLC foi realizada em intervalo de 15 minutos em espectrofotômetro a 515 nm. As absorbâncias das soluções foram registradas contra um branco (MeOH, grau HPLC).

A partir da equação matemática $Y = A + B \cdot x$ e dos valores de absorbâncias obtidos pela média no tempo de 60 minutos, juntamente com os coeficientes angulares e lineares da reta da curva de calibração foi possível determinar a percentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}), conforme a fórmula:

$$\% \text{DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{\text{T=60}} / [\text{DPPH}]_{\text{T=0}} \times 100$$

Em que: %DPPH_{REM} = percentagem da concentração de DPPH que restou; [DPPH]_{T=60} = concentração de DPPH aos 60 minutos; e [DPPH]

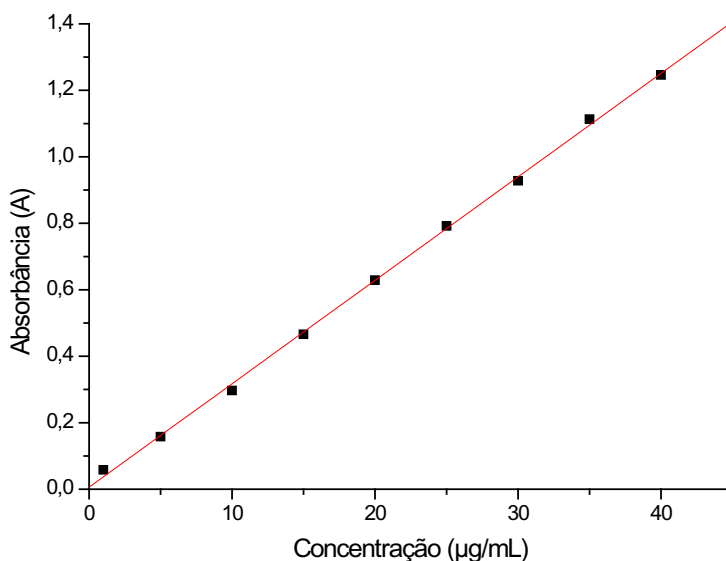


FIGURA 1. Curva de calibração construída a partir dos valores médios de absorbância de cada solução do DPPH versus as concentrações utilizadas (1 a 40 µg mL⁻¹). Maceió/AL, 2014.

TABELA 1. Concentração Letal de 50% (CL₅₀) e citotoxicidade máxima dos extratos etanólicos da flor e folha de *T. aurea* frente aos macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem Swiss. Maceió/AL, 2014.

Parte da Planta	CL ₅₀ (mg mL ⁻¹) ^a	Citotoxicidade máxima (%) ^b
Flor	0,565 ± 0,055	73,8 ± 3,5
Folha	> 1,000	NT
Meio	> 1,000	NT
DMSO	> 1,000	NT

^aConcentração Letal de 50 % (CL₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^bMédia ± erro padrão da média (e.p.m) da citotoxicidade máxima em triplicata. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando **p* < 0,05, ***p* < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%; NT: substância não que apresentou atividade letal significativa para célula até a concentração de 1mg mL⁻¹ em relação ao grupo DMSO. Fonte: Autor, 2014.

T₅₀ = concentração de DPPH inicial (40 mg L⁻¹). A curva das amostras foi construída relacionando a %DPPH_{REM} às concentrações avaliadas de cada extrato, por meio da análise de regressão linear utilizando o programa *Microcal OriginPro 8.0*.

A quantidade de antirradical necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (Cl₅₀) foi obtida usando o modelo matemático $Y = A + B.x$, na concentração de DPPH aos 60 minutos. Quanto maior o consumo de DPPH, menor será sua Cl₅₀ e maior a sua capacidade de sequestrar radicais livres. Os extratos que apresentaram valores de Cl₅₀ ≤ 200 µg mL⁻¹ devem ser indicados para continuação de estudos que venham reforçar a atividade antioxidante da *T. aurea*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Viabilidade Celular

O extrato etanólico das folhas no ensaio da viabilidade celular não evidenciou citotoxicidade, uma vez que a CL₅₀ foi superior a concentração máxima utilizada (1,0 mg mL⁻¹). O extrato etanólico não foi citotóxico nas concentrações ≤ 0,5 mg mL⁻¹ (Tabela 1).

Conforme a Figura 2, não houve citotoxicidade estatisticamente significativa do extrato etanólico das folhas em todas as concentrações avaliadas e do extrato etanólico das flores nas concentrações de 0,2 e 0,1 mg mL⁻¹. Na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ o extrato etanólico da flor apresentou citotoxicidade elevada, semelhante à lise celular.

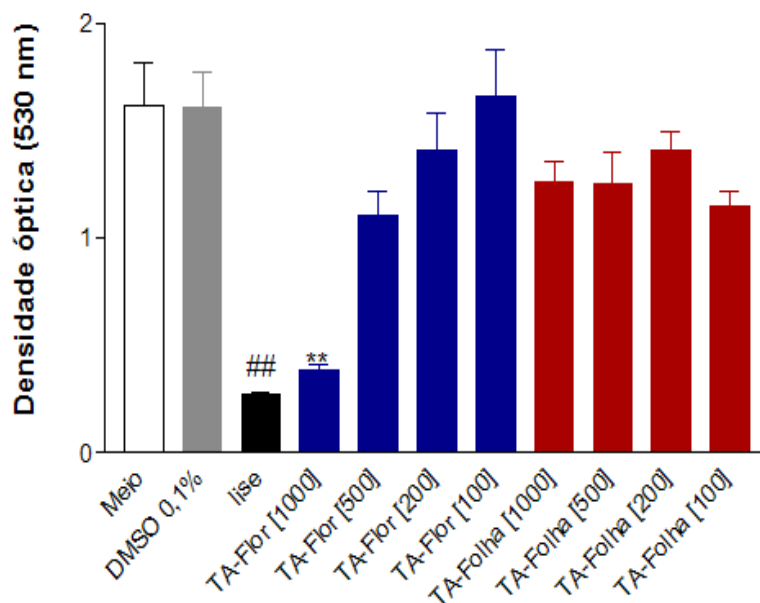


FIGURA 2. Viabilidade celular dos macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem Swiss frente aos extratos etanólicos da flor e da folha de *T. aurea* nas concentrações 1,0; 0,5; 0,2 e 0,1 mg mL⁻¹. Maceió/AL, 2014

Meio: DMEM; DMSO 0,1%: diluente das amostras na concentração de 0,1%; TA-Flor: Extrato etanólico da flor; TA-Folha: Extrato etanólico da folha. As colunas e as barras verticais representam a média ± e.p.m., respectivamente, em triplicata. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando **p* < 0,05, ***p* < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%, usando ANOVA, seguido do teste de Dunnett. ##relacionado à lise. Fonte: Autor, 2014.

Estudo evidenciou que os extratos etanólicos das folhas e das cascas do caule de *T. impetiginosa* apresentaram viabilidade celular pelo ensaio MTT, não induzindo citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem *Swiss* nas concentrações $\leq 1 \text{ mg mL}^{-1}$, o que sugeriu a continuação de estudos *in vivo* (Vasconcelos et al., 2014). As espécies *T. serratifolia* e *T. stenocalyx* não foram citotóxicas em concentrações $< 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (Brandão et al., 2010).

A associação da avaliação da viabilidade celular de um composto à sua atividade biológica é fundamental para determinar sua aplicação, bem como seu índice terapêutico (Freshney, 2000). Os extratos da espécie de *T. aurea* não evidenciaram citotoxicidade significativa, exceto o extrato etanólico da flor, o qual se indica utilizá-lo em concentrações $\leq 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, visto que nestas concentrações não se evidenciou citotoxicidade celular. Estes resultados representam indícios de segurança na utilização terapêutica da espécie vegetal nos testes pré-clínicos *in vivo*.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi avaliada de acordo com os critérios adotados por Ayres et al (2008). Verificou-se que os extratos etanólicos das flores e das folhas de *T. aurea* apresentaram os melhores resultados frente às bactérias Gram-positivas. O extrato etanólico da flor evidenciou-se ativo frente à linhagem de *S. epidermidis*, como uma CIM de $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ (Figura 3). Já o extrato etanólico da folha foi considerado moderadamente ativo frente a esta mesma linhagem, com uma CIM de $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$, e frente

TABELA 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos etanólicos da flor e da folha de *Tabebuia aurea* frente aos microrganismos avaliados. Maceió/AL, 2014.

Concentração Inibitória Mínima – CIM (mg mL^{-1})		
Microrganismo	Flor	Folha
Gram-Positivas		
<i>S. aureus</i>	$>10,00$	0,50
<i>S. epidermidis</i>	0,06	0,12
<i>E. feacalis</i>	$> 10,00$	10,00
Gram-Negativas		
<i>E. coli</i>	10,00	10,00
<i>K. pneumoniae</i>	10,00	10,00
<i>A. calcoaceticus</i>	$>10,00$	10,00
<i>E. aerogenes</i>	$>10,00$	10,00
<i>S. flexneri</i>	10,00	1,00
<i>S. enterica</i>	10,00	10,00

Concentrações bactericidas. Fonte: Autor, 2014.

à linhagem de *S. aureus*, como uma CIM de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ (Tabela 2). Os extratos de *Tabebuia aurea* não evidenciaram ação contra o fungo *C. albicans*.

A CIM de $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ do extrato etanólico da flor apresentou ação bactericida frente às linhagens de *S. epidermidis* e frente às linhagens de *E. coli* e *K. pneumoniae* na CIM de 10 mg mL^{-1} . O extrato etanólico da folha apresentou ação bactericida frente às linhagens de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *A. calcoaceticus*, também na CIM de 10 mg mL^{-1} (Tabela 2). As demais linhagens que evidenciaram sensibilidade frente aos extratos avaliados na CIM

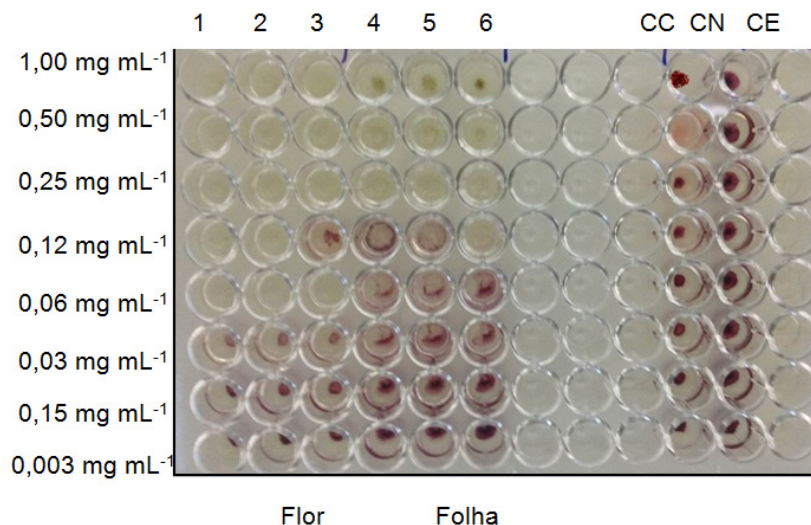


FIGURA 3. Teste de microdiluição em caldo evidenciando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos etanólicos da flor ($0,06 \text{ mg mL}^{-1}$) e da folha ($0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) de *T. aurea* frente à linhagem bacteriana de *Staphylococcus epidermidis*. Maceió/AL, 2014.

Triplícata 1, 2 e 3: Extrato etanólico da flor de *T. aurea*; Triplícata 4, 5 e 6: Extrato etanólico da folha de *T. aurea*; CN: Controle Negativo; CC: Controle de Crescimento; CE: Controle de esterilidade da placa. Fonte: Autor, 2014.

apresentaram ação bacteriostática.

Esta pesquisa evidenciou potencial antibacteriano de *T. aurea* frente à *S. epidermidis*. Quanto à ação sobre as demais bactérias, os extratos etanólicos de *T. aurea* necessitaram de CIMs mais elevadas para sensibilizá-las.

A ausência ou redução da ação bactericida de amostras vegetais frente a bactérias Gram-negativas tem sido observada por outros pesquisadores associadas às peculiaridades dos metabólitos secundários dos extratos, em formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e parede celular, bem como, a característica lipofílica de alguns metabólitos, favorecendo a ruptura da membrana celular dos (Carelli et al., 2011).

Algumas pesquisas corroboram com esta ação reduzida sobre os microrganismos Gram-negativos demonstrando que outras espécies do gênero *Tabebuia*, como *T. ochracea* e *T. rosea* não apresentaram nenhuma ação contra as cepas de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Franco et al., 2013).

Entretanto, outro estudo evidenciou que o extrato etanólico da folha *T. impetiginosa* promoveu uma atividade antimicrobiana fraca contra as cepas Gram-positivas de *S. epidermidis* (CIM \geq 0,62 mg mL⁻¹) e moderada para *S. aureus* (CIM \geq 0,31 mg mL⁻¹) (Vasconcelos et al., 2014). Outra pesquisa demonstrou moderada atividade antimicrobiana de *T. roseo-alba* frente a três bactérias Gram-positivas: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*; e uma Gram-negativa: *K. pneumoniae* (Silva et al., 2014).

Diante disso, esta ação antimicrobiana reduzida ou mesmo ausente pode ser justificada, por se tratar de extratos brutos e a presença de seus fitocomponentes podem interferir na concentração da substância ativa. Ressalta-se então que os testes realizados com extratos brutos tendem a evidenciar resultados das CIMs mais elevadas e certamente seus compostos isolados devem apresentar uma atividade antimicrobiana maior (benfatti et al., 2010).

O ipê-roxo (*T. avellanedae*), por exemplo, não apresentou atividade antimicrobiana *in vitro* (Suo, 2013). Entretanto, seus compostos isolados apresentaram promissora atividade antibacteriana frente às linhagens de estafilococos resistentes à metilicina, mas não foi observada atividade bactericida (MBC $>$ 0,51 mg mL⁻¹) (Pereira et al., 2006).

O extrato etanólico das folhas da espécie *T. pentaphylla* Vell. apresentou atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, com destaque frente à linhagem de *S. aureus* na concentração de 0,78 µg ml⁻¹, que também é bactericida (ROCHA et al., 2013). O *Staphylococcus aureus* foi à única estirpe sensível ao efeito de extratos e frações das espécies de *T. ochracea* e de *T. rosea*. Evidenciou-se a concentração crítica

de 10 mg poço⁻¹ dos extratos brutos, enquanto que as frações de acetato de etilo de ambas as espécies exibiram uma forte atividade antibacteriana na concentração de 1,25 mg poço⁻¹ (Ospina et al., 2013).

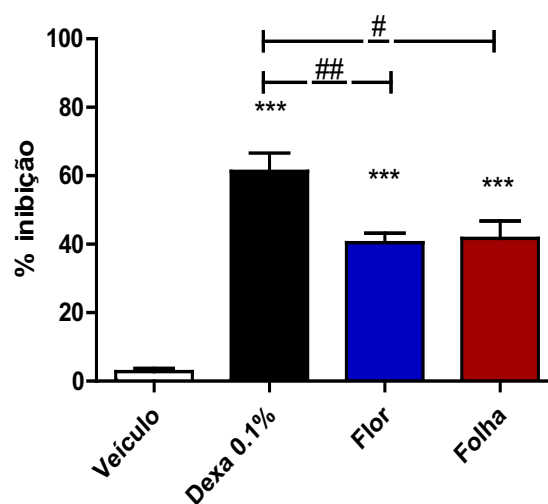
Quanto à ação antifúngica, os extratos de *T. aurea* não evidenciaram ação contra ao fungo *C. albicans*. Porém, os compostos isolados das cascas do caule de *T. aurea* evidenciaram atividade inibitória frente à micobactéria e aos fungos *Candida albicans* e *Monilia sitophila* (Barbosa-Filho et al., 2004).

Atividade antiedematogênica

Os extratos etanólicos da flor e da folha inibiram a formação do edema quando comparado com o veículo, ou seja, evidenciam um perfil antiedematogênico, quando usados topicamente e na concentração de 0,1%. O extrato etanólico da flor apresentou uma porcentagem de inibição do edema de 40,50±2,74% e o extrato etanólico da folha de 41,73±5,08%, considerados estatisticamente significativos quando comparados ao veículo utilizado.

Os extratos etanólicos da folha e da flor diferiram significativamente ($\#p < 0,05$ e $\#\#p < 0,01$, respectivamente) do fármaco padrão utilizado. O Gráfico 3 evidencia que a dexametasona, fármaco

FIGURA 4. Porcentagem de inibição do edema de orelha induzido por capsaicina promovida pelos extratos etanólicos da flor e da folha de *Tabebuia aurea*. Maceió/AL, 2014.



Veículo: Tween 80, etanol e acetona na concentração de 0,1%; Dexa 0,1%: Dexametasona na concentração de 0,1%; Flor: Extrato etanólico da flor de *T. aurea*. Folha: Extrato etanólico da folha de *T. aurea*. As colunas e as barras verticais representam a média ± e.p.m., respectivamente (n=6). Os valores máximos foram considerados significativos quando $***p < 0,001$ comparado ao grupo veículo; $\#p < 0,05$ e $\#\#p < 0,01$, comparado ao grupo Dexa 0,1%, ambos usando ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Fonte: Autor, 2014

padrão utilizado como controle positivo, apresentou atividade anti-edematogênica tópica (inibição de $61,33 \pm 5,40\%$).

Os extratos de *Tabebuia chrysanta* G. Nicholson apresentaram um efeito anti-edematogênico significativo no edema de orelha induzido TPA, com níveis de inibição entre 20% e 23% (Ospina et al., 2011).

Os extratos de *T. rosea* e *T. ochracea* também evidenciaram uma atividade anti-edematogênica que não diferiu estatisticamente do valor apresentado por indometacina usada como referência, sugerindo a presença de fortes metabolitos secundários. O extrato bruto de *T. rósea* apresentou quase metade do efeito anti-edematogênico (38,6%) observado para a indometacina (59,7%), mas suas frações diclorometano (50,1%) e acetato de etila (44,4%) apresentam valores de inibição semelhantes à indometacina, sendo consideradas promissoras (Ospina et al., 2013).

Os resultados de Ospina et al (2013) corroboram com os da presente pesquisa uma vez que foram avaliados extratos brutos e estes demonstraram um perfil anti-edematogênico, apresentando mais da metade do efeito anti-edematogênico observado pela dexametasona, droga de referência utilizada na presente pesquisa..

A atividade anti-inflamatória de plantas está estreitamente relacionada aos constituintes taninos, flavonóides, cumarinas, saponinas e terpenos. Estudos realizados com óleos essenciais obtidos de diferentes espécies vegetais demonstraram ser os terpenóides substâncias com ação anti-inflamatória

(Peana et al., 2004). Estudo das flores e folhas identificou a presença de terpenóides na *T. aurea* (Soares, 2006)

Atividade antirradicalar

Os dois extratos etanólicos da flor e da folha de *T. aurea* apresentaram resultados positivos nos ensaios qualitativos e foram submetidas à avaliação quantitativa. Neste ensaio, os valores de CI_{50} encontrados para as amostras testadas foram muito superiores a $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando ausência da capacidade sequestradora de radicais livres. O Figura 4 evidencia o quão é insignificante a redução do radical livre pelos extratos avaliados, $\mu\text{g mL}^{-1}$), quando comparados com os padrões utilizados: ácido gálico ($CI_{50} 20,53 \pm 1,34 \mu\text{g mL}^{-1}$) e BHT ($CI_{50} 97,86 \pm 2,52 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Figura 5).

Corroborando com os achados da presente pesquisa, as amostras das folhas, galhos e casca do caule de *T. impetiginosa* também evidenciaram resultados positivos nas avaliações qualitativas, porém nos testes quantitativos nenhuma amostra apresentou capacidade sequestradora de radicais livres (Vasconcelos et al., 2014). Extratos e frações da casca interna das espécies de *T. ochracea* e *T. rosea* apresentaram atividade sequestradora de radicais livres pelo mesmo método de mensuração da redução do radical sintético estável DPPH (Ospina et al., 2013).

Seis compostos glicosídeos fenilpropanóides foram identificados e isolados a partir de extratos aquosos da *T. avellanedae* e todos evidenciaram uma forte capacidade sequestradora de radicais

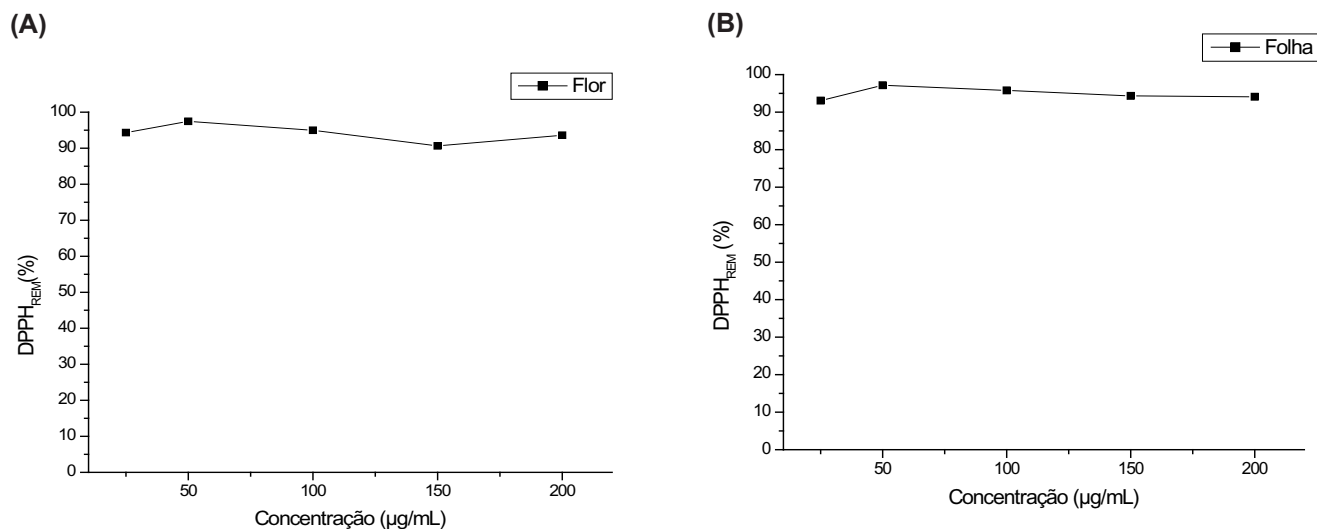
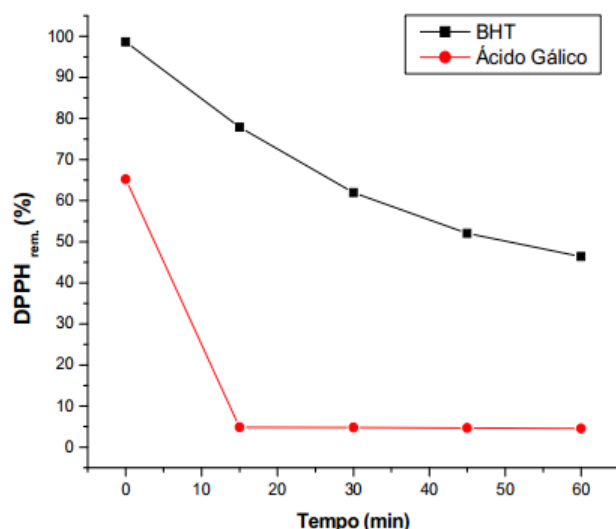


FIGURA 5. A) Curva da percentagem do radical livre sintético 2,2-difenil-1-picrilidazila (DPPH) remanescente frente ao extrato etanólico da flor de *Tabebuia aurea*. (B) Curva da percentagem do DPPH remanescente frente ao extrato etanólico da folha de *T. aurea*. Maceió/AL, 2014.

% DPPH_{REM}: percentagem da concentração de DPPH (radical livre sintético) remanescente. Flor: Extrato etanólico da flor de *T. aurea*. Folha: Extrato etanólico da folha de *T. aurea*. Fonte: Autor, 2014.

FIGURA 6 - Cinética da percentagem do radical livre sintético DPPH remanescente dos padrões sequestradores de radicais livres: ácido gálico e 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol (BHT). Maceió/AL, 2014.



% DPPH_{REM}: percentagem da concentração de DPPH (radical livre sintético) remanescente; BHT(2,6-di-terc-butil-4-metilfenol) e Ácido gálico: controles positivos padrões sequestradores de radicais livres. Fonte: Autor, 2014.

livres no ensaio de DPPH (Suo et al., 2013). Outro estudo que investigou a atividade antioxidante de compostos isolados desta mesma espécie evidenciou uma fraca atividade antioxidante (Suo et al., 2012).

Os extratos etanólicos de *T. aurea* avaliados não evidenciaram atividade sequestradora de radicais livres. Entretanto, segundo Ospina et al. (2013) o fracionamento dos extratos totais das espécies de *Tabebuia* leva a um aumento significativo na atividade de eliminação de radicais livres de DPPH devido ao enriquecimento dos compostos ativos, com isso é relevante investir no fracionamento e particionamento dos extratos desta espécie.

CONCLUSÃO

No estudo da avaliação do potencial biológico da espécie *Tabebuia aurea* evidenciou-se o perfil antibacteriano e antiedematogênico, com ausência de citotoxicidade. No entanto, a atividade antirradicalar não foi evidenciada no presente estudo. A partir dos resultados obtidos sugere-se a continuação dos testes realizados com frações e substâncias isoladas das flores e folhas da referida espécie vegetal, bem como de experimentos *in vivo*,

como forma de agregar evidências visando à busca de novos fitoterápicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CNPq, CAPES e BNB.

REFERÊNCIAS

- AYRES, M.C.C.; et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.1, p. 90-7, 2008.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; et al. Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea*. **Phyton, International Journal of Experimental Botany**, v.73, p.221-28, 2004.
- BENFATTI, C.S.; et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos brutos de espécies de *Eugenia* sp frente a cepas de mollicutes. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n.2, p.33-9, 2010.
- BRANDÃO, G.C.; et al. Antiviral activities of plants occurring in the state of Minas Gerais, Brazil. Part 2. Screening Bignoniaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.5, p.742-50, 2010.
- CARELLI, G.; et al. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilexpara guariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO₂ supercrítico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.110-5, 2011.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard. 3. ed. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012a.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 22. ed. Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012b.
- FRANCO, L.A.O.; et al. Antiinflammatory, antioxidant and antibacterial activity of two species of *Tabebuia* genus. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**. v.18, n.1, p.34-6, 2013.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. Wiley-Blackwell. 6. ed. 2000, 796p.
- GUERBAS NETO, P. **Estudo químico da casca, folhas e cerne de um espécime de *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae) coletado no Pantanal**. 2003. 120p. Dissertação (Mestrado em Química, Área de Concentração em Química Orgânica) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande - MS.
- LIMA, A.P.; et al. Avaliação da atividade antitumoral e citotóxica da Planta *Siolmatra brasiliensis*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.44-6, 2006.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 6. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2014, 384p.
- MANTIONE, C.R.; RODRIGUEZ, R.A. Bradykinin (BK) - receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear

- inflammation in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.99, p.516-518, 1990.
- OSPINA G., L.F.; et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Phenax rugosus* (POIR.) Wedd and *Tabebuia chrysanta* G. Nicholson. **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v.18, n.1, p.49-55, 2011.
- OSPINA, L.A.F.; et al. Actividad antiinflamatoria, antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18 n.1, 2013.
- PEANA, A.T. et al. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. **European Journal of Pharmacology**, v.497, n.3, p.279-84, 2004.
- PEREIRA, P.M.; et al. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.5, n.5, 2006.
- RAUH, L.K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *Vernonias corpioides* (Lam) persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos**. 2008. 119 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PN
- REIS, FP. *Tabebuia aurea* decreases inflammatory, myotoxic and hemorrhagic activities induced by the venom of *Bothrops neuwiedi*. **J. Ethnopharmacology**, v.2, n.158, p.352-37, 2014.
- ROCHA, E.A.L.S.S.; et al. Potencial antimicrobiano de seis plantas do semiárido paraibano contra bactérias relacionadas à infecção endodôntica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.3, p.351-355, 2013.
- SILVA, J.C.; et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Tabebuia roseo-alba* (Ridl.) Sand (Ipê branco). **Revista Enfermagem Atual in Derme**, v. 68, n. 6, p.08-11, 2014.
- SILVA, T.M., et al. Molluscicidal activities of six species of Bignoniaceae from north-eastern Brazil, as measured against *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.101, p.359-365, 2007.
- SOLER-RIVAS, C.; et al. Easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of food stuffs. **Phytochemical Analysis**, v.11, p.1-9, 2000.
- SOARES, A.O. **Estudo fitoquímico das flores e casca do caule de um espécime de *tabebuia caraiba* (bignoniaceae) coletado na região do cerrado em mato grosso do sul**. 2006. 113p. Dissertação (Mestrado em Química, Área de Concentração em Química Orgânica). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- UFMS, Campo Grande- MS.
- SOUZA, C.D; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região do Alto do Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n. 1, p.135-142, 2006.
- SUO, M.; et al. Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*. **Fitoterapia**, v.83, p.1484–1488, 2012.
- SUO, M.; et al. Bioactive Phenylpropanoid Glycosides from *Tabebuia avellanedae*. **Molecules**, v.18, p.7336-7345, 2013.
- VASCONCELOS, C.M.; et al. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v.6, n.7, p.2673-681, 2014.