

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas**

DANIEL RODRIGO CAVALCANTE DE ARAÚJO

***Anadenanthera colubrina* var. *Cebil*(Griseb.) Altschul (Fabaceae:Mimosoideae):
POTENCIAL ANTIMICROBIANO E VARIAÇÕES SAZONAIS NOS TEORES DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

Recife
2015

DANIEL RODRIGO CAVALCANTE DE ARAÚJO

***Anadenanthera colubrina* var. *Cebil*(Griseb.) Altschul (Fabaceae:Mimosoideae):
POTENCIAL ANTIMICROBIANO E VARIAÇÕES NOS TEORES DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^aDr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Co-Orientador: Prof^{Dr} Leonardo Souza Cavalcanti

Recife
2015

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Araújo, Daniel Rodrigo Cavalcante de

Anadenanthera Colubrina var. *Cebil* (Griseb.) Altschul (Fabaceae: Mimosoideae): potencial antimicrobiano e variações nos teores de metabólitos secundários / Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo. ã Recife: O Autor, 2015.

60 f.: il.

Orientadores: Maria Tereza dos Santos Correia, Leonardo Souza Cavalcanti
Dissertação (mestrado) ã Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Plantas medicinais I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orient.) II. Cavalcanti, Leonardo Souza (coorient.) III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2016-341

***Anadenanthera colubrina* var. *Cebil*(Griseb.) Altschul (Fabaceae:Mimosoideae):
POTENCIAL ANTIMICROBIANO E VARIAÇÕES NOS TEORES DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduaçãoem Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como
requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Orientadora: Prof^aDr^a Maria Tereza dos Santos Correia

Co-Orientador: ProfDr Leonardo Souza Cavalcanti

Comissão examinadora:

Aprovado em 10 de fevereiro de 2015

Prof. Dra. Maria Tereza Dos Santos Correia

Prof. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Dr. Alexandre Gomes da Silva

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a todos da minha família, em especial minha mãe Janete Cavalcante, e noiva Erika Nascimento, pela confiança, apoio e credibilidade. Agradeço a Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de estudo disponibilizada.

Agradeço aos profissionais e professores do Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas (PPGCB) pelo apoio prestado. Agradeço a todos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco por me receber em sua estrutura e pelo apoio. Agradeço ao Prof. Dr. Leonardo Souza Cavalcanti pela confiança e credibilidade. Agradeço a Prof.(a) Dr.(a) Márcia Vanusa da Silva pela oportunidade e credibilidade concedida desde a graduação. Agradeço a Prof.(a) Dr.(a) Maria Tereza dos Santos Correia pela confiança e orientação.

Agradeço aos profissionais do herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pela identificação das plantas utilizadas neste trabalho. Agradeço ao botânico da rede de pesquisa Dr. Alexandre Gomes da Silva pela identificação em campo das espécies estudadas. Agradeço aos profissionais, guias, do Parque Nacional do Catimbau pela ajuda na identificação em campo e transporte das espécies estudadas.

Agradeço ao Laboratório de Farmacognosia, do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, em especial Prof(a) Dr(a) Silvana Maria Zucolotto Langassner, Prof(a). Dr(a). Raquel Brandict Giordani, Júlia Fernandes e Thaciane Soares pela orientação, disponibilidade e acesso a ciência de produtos naturais e suas tecnologias analíticas.

Agradeço ao Laboratório de Farmacognosia, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, em especial Prof. Dr. Rafael Ximenes pela disponibilidade e auxílio na execução de métodos clássicos qualitativos de identificação de compostos.

Agradeço ao Instituto Nacional do Semi-árido (INSA), por me receber através de seus profissionais, em especial Wolfgang Harand por me oferecer acesso ao conhecimento sobre produtos naturais e uso de tecnologias analíticas.

Agradeço ao Centro de Tecnologias do Nordeste (CETENE), pela disponibilidade de seus profissionais, em especial Esteban Vidal e Joana Alves, pelo apoio quanto à infraestrutura básica e acesso ao conhecimento sobre tecnologias analíticas.

Agradeço a coleção de micro-organismos, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, em especial Prof(a) Dr(a) Janete Magali de Araújo e o pesquisador convidado Dr. Luís Claudio Nascimento da Silva pelo acompanhamento, apresentação de métodos para análise antimicrobiana e treinamento em microbiologia

RESUMO

Anadenanthera colubrina (Vell) Brenan var. *cebil* (Griseb) é uma planta medicinal amplamente utilizada no Nordeste brasileiro. Este estudo teve como objetivo analisar a influência dos índices pluviométricos na atividade antimicrobiana e componentes fitoquímicos de extratos de folhas e frutos de *A. colubrina*. As amostras foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau (Buíque, Pernambuco, Brasil) em setembro de 2010 e janeiro, abril e junho de 2011, que mostrou índice de precipitação (IP) de 75 mm, 65 milímetros, 162 milímetros e 73 mm, respectivamente. Os extratos foram preparados por extração de Soxhlet com ciclo-hexano, clorofórmio, acetato de etilo e metanol. A atividade antimicrobiana foi determinada pelos valores de MIC e MBC. Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, mas extratos acetato de etila (de todos os períodos) eram mais ativos. Foram encontradas fortes correlações entre o IP e do MIC média de MLE ($r = -0,99$), Eale ($r = -0,81$), CHFE ($r = -0,81$), EAFE ($r = -0,80$); enquanto correlações moderadas e fracas foi encontrado com outros extratos. Através de uma análise HPLC foi possível revelar que as amostras coletadas de períodos secos tiveram mais diversidade química (por apresentarem mais picos). Ácido gálico e quercetina (e compostos derivados) foram identificados. Os níveis de quercetina foram reforçadas em extratos de meses secos. Os nossos resultados mostraram que a precipitação tem um efeito positivo sobre a atividade antimicrobiana das folhas e frutos de *A. colubrina* e a variação de alguns metabolitos, principalmente quercetina. Outros estudos devem ser realizados a fim de identificar os compostos ativos e para avaliar os efeitos de outros fatores ambientais.

Palavras-Chave: *Anadenanthera colubrina*. Atividade antimicrobiana. Pluviosidade

ABSTRACT

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) is a plant widely used for medicinal purposes in Brazilian Northeast. This study aimed to analyze the influence of rainfall indexes in antimicrobial activity and phytochemical constituents of extracts from leaves and fruits of *A. colubrina*. Samples were collected in Catimbau National Park (Buíque, Pernambuco, Brazil) at September 2010 and January, April and June 2011, which showed rainfall index of 75 mm, 65 mm, 162 mm and 73 mm, respectively. The extracts were prepared by Soxhlet extraction using cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The antimicrobial activity was determined by MIC and MBC values. All extracts showed antimicrobial activity, but ethyl acetate extracts (from all periods) were more active. Strong correlations were found between the RI and the average MIC of MLE (£: -0.99), EALE (£: -0.81), CHFE (£: -0.81), EAFE (£: -0.80); while moderate and weak correlations were found for other extracts. Through a HPLC analysis was possible to reveal that the samples collected from dry periods had more chemical diversity (as they presented more peaks). Gallic acid and quercetin (and derivative compounds) were identified. The levels of quercetin were enhanced in extracts from dry months. Our results showed that the rainfall has a positive effect on the antimicrobial activity of leaves and fruits of *A. colubrina* and the variation of some metabolites, mainly quercetin. Other studies should be performed in order to identify the active compounds and to evaluate the effects of other environmental factors.

Keywords: *Anadenanthera colubrina*. Antimicrobial activity. Rainfall

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIORAFICA

Figura 1	Vias do metabolismo secundário segundo Taz & Zeiger (2004).	16
Figura 2	Visão geral de <i>Anadenanthera colubrina</i> conhecida popularmente como Angico.	21
Figura 3	Estrutura dos metabólitos isolados de <i>Anadenanthera colubrina</i> segundo revisão de Weber et al. (2011) e Silva et al (2012).	24
Figura 4	(cont). Estrutura dos metabólitos isolados de <i>Anadenanthera colubrina</i> segundo revisão de Weber et al. (2011) e Silva et al (2012).	25

APÊNDICE

Figura 1.	Cromatogramas de compostos fenólicos oriundos de extratos de acetato de etila de folhas e frutos de <i>Anadenanthera colubrina</i> coletados em setembro de 2010 (A), Janeiro de 2011 (B), Abril de 2011 (C), Junho de 2011 (D). I Cromatograma de frutos detectado em 280nm; II Cromatograma de frutos detectado em 340nm; III Cromatograma de folhas detectado em 280nm; IV Cromatograma de folhas detectado em 340nm.	46
Figura S1	Cromatogramas de Quercetina (A) e Ácido Gálico (B), Quercetina + Extratos acetato de etila de folhas de <i>A. colubrina</i> (C) e Ácido Gálico + Extratos de acetato de etila de folhas de <i>A. colubrina</i> (D).	47
Figura S2	Análise de espectro UV dos picos principais. Pico 1: ácido gálico (UV 268nm); picos 10 e 11: derivados de quercetina (UV 257 353 nm) e pico 15: quercetina (UV 257 371nm)	48

ANEXO

Figura 1	Atividade Hemolítica das frações AcOEt de folhas e frutos de <i>A.colubrina</i>	57
-----------------	---	----

LISTA DE TABELAS

APÊNDICE

Tabela 1.	Atividade Antimicrobiana de extratos de Acetato de etila de folhas e frutos de <i>Anadenanthera colubrina</i> .	44
Tabela S1.	Perfil Fitoquímico de acetato de etila oriundo de folhas e frutos de <i>Anadenanthera colubrina</i>	45

ANEXO

Tabela 1.	Potencial farmacológico de <i>Anadenanthera colubrina</i> .	53
Tabela 2.	Micro-organismos oriundos do Departamento de Antibióticos (UFPEA)	54
Tabela 3.	Atividade Antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de folhas e frutos de <i>A.colubrina</i>	56
Tabela 4.	Perfil fitoquímico do extrato bruto de <i>A.colubrina</i>	56
Tabela 5.	Potencial antimicrobiano da fração AcOEt da folha de <i>A. colubrina</i>	56
Tabela 6.	Potencial antimicrobiano da fração AcOEt do fruto de <i>A. colubrina</i>	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Produtos naturais	14
3.2A importância das plantas medicinais	17
3.3A família Leguminosae.....	19
3.3.1 A espécie <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i>	20
3.3.2 Atividades biológicas e a espécie <i>Anadenanthera colubrina</i>	22
3.3.3 Metabólitos isolados e a espécie <i>Anadenanthera colubrina</i>	24
3.4 A resistência à antimicrobianos.....	26
4. REFERÊNCIAS.....	28
5. APÊNDICE.....	33
Effects of rainfall on the antimicrobial activity and secondary metabolites contents of leaves and fruits of <i>Anadenanthera colubrina</i> from Caatinga area.	
6. ANEXO.....	49
Comparative analysis of anti- <i>Staphylococcus aureus</i> action of leaves and fruits of <i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul.	

INTRODUÇÃO

O tratamento de doenças infecciosas foi revolucionado na década de 1930 com a descoberta do primeiro antibiótico. Entretanto, 80 anos mais tarde nos deparamos em um cenário crítico em que são cada vez maiores os relatos de cepas microbianas resistentes a antibióticos convencionais. Este mesmo cenário também nos mostra que o desenvolvimento de novos antimicrobianos está diminuindo. A capacidade natural dos micro-organismos de adquirir resistência está sendo acelerada principalmente pelo uso indiscriminado e pelo descarte indevido destes antibióticos (RODRIGUEZ-ROJA et al., 2013; WHO, 2012).

Estudos com moléculas de origem natural foram intensificados e compostos do metabolismo secundário de plantas com característica antimicrobiana, antifúngicas e antivirais foram elucidadas no intuito de contribuir para a descoberta de novos medicamentos (DAGLIA, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2012). Acreditava-se que estes compostos secundários eram produtos laterais do metabolismo com nenhuma função específica nas plantas, muitas vezes sendo relatada como lixo metabólico. Por estas razões estes compostos foram chamados de metabólitos secundários. No entanto à medida que o metabolismo foi sendo mais bem estudado percebeu-se que os compostos secundários possuem diversas funções, dentre elas, como um dos sistemas de defesa das plantas (CANHOTO, 2010).

A presença ou ausência de alguma classe destes compostos varia entre as espécies vegetais e seus teores entre uma mesma espécie ou espécies diferentes podem variar devido à influência de fatores como: disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, sazonalidade etc (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; KROYMAN, 2011).

A formação vegetal Caatinga se tornou atrativo para pesquisas deste porte por possuir tais fatores como suas características, as temperaturas médias anuais são umas das mais elevadas do Brasil, variando entre 26° e 28°C e precipitações baixas e irregulares limitados na maior parte de sua área a um período muito curto do ano (MELLO et al., 2012; QUEIROZ, 2009).

A Caatinga possui uma área estimada de 850.000 km² e abrange os estados do Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e Minas Gerais, a deficiência de água durante grande parte do ano e a irregularidade temporal na distribuição das chuvas são os principais fatores que determinam a existência da Caatinga (QUEIROZ, 2009).

Dessa forma, as plantas da caatinga possuem características particulares, e que podem ser utilizadas como fontes para a busca de novas moléculas ativas. Porém, devido à ação antrópica no bioma caatinga, há um risco iminente destas propriedades medicinais não serem reconhecida (LEAL et al., 2003).

Neste contexto este trabalho se propôs a determinar a atividade antimicrobiana de folhas e frutos de *Anadenanthera colubrina* var *cebile* verificar por métodos cromatográficos a variação dos teores de metabólitos secundários de diferentes períodos de coleta (estação seca e chuvosa).

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade antimicrobiana de folhas e frutos de *Anadenanthera colubrina* var *cebil* e verificar por métodos cromatográficos a variação dos teores de metabólitos secundários de diferentes períodos de coleta (estação seca e chuvosa).

2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos (semi-fracionados) por método de fracionamento Líquido-Líquido e Soxhlet para posterior análise antimicrobiana;
- Analisar a atividade antimicrobiana dos extratos por método de microdiluição seriada determinando sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM);
- Analisar por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) o perfil cromatográfico dos extratos, bem como analisar a variação dos compostos de acordo com o período de coleta;
- Analisar por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) o perfil cromatográfico dos extratos a fim de se analisar a variação dos compostos de acordo com o período de coleta;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produtos Naturais

Os produtos naturais são moléculas orgânicas geradas por reações biossintéticas, com funções e importância biológica diferentes, sendo chamados de metabólitos e originárias das mais diversas fontes de organismos vivos (EMERY et al., 2010; PERES, 2004; TAZ; ZEIGER, 2004).

Os metabólitos podem ser classificados em primários ou secundários. Os metabólitos primários são fundamentais para a sobrevivência das espécies, são especialmente importantes para o metabolismo básico fotossintético ou respiratório. Já a biossíntese dos metabólitos secundários é restrita a algumas espécies de organismos vivos e sua importância biológica não é diretamente relacionada aos mesmos processos metabólicos supracitada, mas que fazem parte, especialmente do sistema de defesa e comunicação entre as espécies. (EMERY et al., 2010; PERES, 2004; TAZ; ZEIGER, 2004).

Os metabólitos secundários são essenciais contra a herbivoria e infecções de micro-organismos patogênicos, possui um papel importante na competição entre plantas, na atração de polinizadores, no suporte estrutural e pigmentos. Produtos secundários também podem desempenhar função importante na proteção contra estresses abióticos, como por exemplo, a radiação UV-B ou o déficit hídrico (PERES, 2004; TAZ; ZEIGER, 2004).

O termo produto natural apesar de estar intrinsecamente relacionada a toda e qualquer molécula proveniente da natureza, seu uso, na área química, é comumente aplicado aos metabólitos secundários. Apesar da divisão, os metabolismos primário e secundário se correlacionam diretamente, visto que o último, utiliza moléculas orgânicas geradas pelo primeiro nas vias biossintéticas. (EMERY et al., 2010; PERES, 2004; TAZ; ZEIGER, 2004).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (EMERY et al., 2010; PERES, 2004; TAZ; ZEIGER, 2004).

Os terpenos são considerados a maior classe de metabólitos, sua diversidade estrutural é tão ampla que podem ser encontrados compostos com 10, 15, 20, 30 ou 40 átomos de carbono. São conhecidos respectivamente como mono, sesqui, di, tri e tetraterpenos com as mais diferentes formas estruturais. Muitos dos monoterpenos e sesquiterpenos, por serem compostos voláteis, compõem os óleos essenciais. Compostos esteroidais também pertencem a esta classe (Emery et al., 2010). São oriundos de duas rotas biossintéticas: A rota do ácido mevalônico e a rota do metileritritol fosfato (MEP) (TAZ; ZEIGER, 2004).

Os triterpenos (terpenos de 30 carbonos) possuem uma classe comumente chamada de saponinas devido as suas semelhanças com a espuma de sabão. Esta característica se dá por apresentarem em sua estrutura uma parte solúvel (glicose) e outra lipossolúvel (triterpeno). Nos vegetais as saponinas são extremamente importantes na defesa contra insetos (PERES, 2004).

Os compostos fenólicos são biossintetizados por meio de duas rotas diferentes: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido melônico. A rota do ácido chiquímico participa na síntese da maioria dos fenóis vegetais. Esta rota não está presente nos animais e é responsável pela

formação de aminoácidos - fenilalanina, tirosina e triptofano - essenciais na dieta humana. A classe mais abundante dos compostos fenólicos é derivada da fenilalanina (TAZ; ZEIGER, 2004). Na rota metabólica, a fenilalanina forma o ácido cinâmico, que por sua vez é responsável pela formação dos fenóis simples, lignina, flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos. Nesse processo existe uma enzima muito importante e que talvez seja a enzima mais estudada no metabolismo secundário, a fenilalanina amonialiase (PAL). (PERES, 2004; TAZ; ZEIGER, 2004).

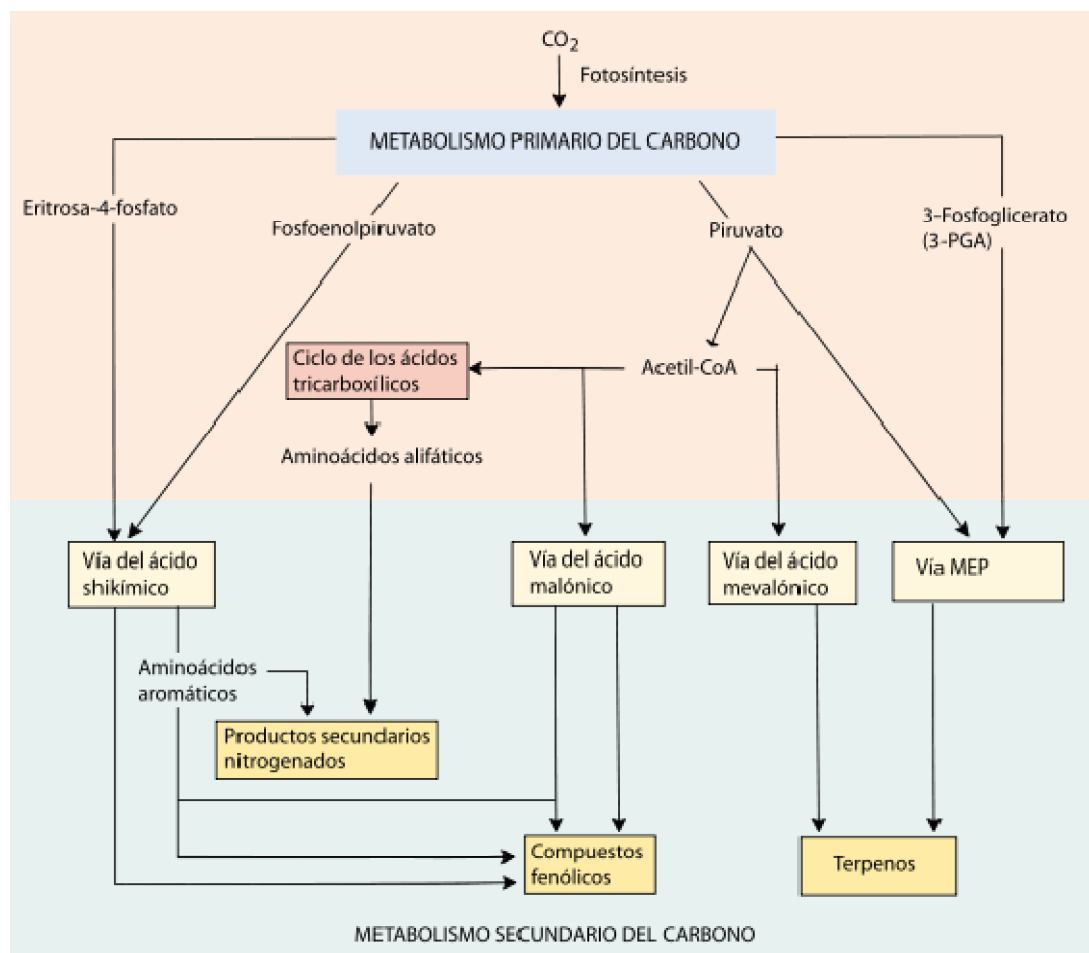
Esta enzima tem a sua atividade e quantidade aumentada de acordo com alguns fatores ambientais, por exemplo, a alta incidência de luz aumenta a sua atividade que por sua vez estimula a síntese de flavonas ou flavonóis, compostos importantíssimos que absorvem a luz em comprimentos de onda mais curtos. A invasão de fungos estimula a codificação da PAL, aumentando a sua quantidade e produzindo ainda mais compostos fenólicos essencial para a defesa do organismo (TAZ; ZEIGER, 2004).

Odores, sabores e colorações dos vegetais são muitas vezes oriundos dos compostos fenólicos como as antocianinas, um grupo mais comum de flavonóides. As cores são importantes na atração de animais que retiram o néctar ou polpa dos frutos e terminam por transportar para outras áreas as sementes e o pólen das plantas, beneficiando a dispersão das espécies. (TAZ; ZEIGER, 2004).

Fazem parte dos compostos nitrogenados os alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não-proteicos. Os alcalóides constituem um grupo relativamente extenso com mais de 15.000 metabólitos nitrogenados distribuídos em aproximadamente 20% das espécies vasculares (TAZ; ZEIGER, 2004).

Os alcalóides são sintetizados a partir de aminoácidos comuns como tirosina, lisina e triptofano e são conhecidos por sua toxicidade em grandes concentrações (PERES, 2004).

Figura 1. Principais vias do metabolismo secundário



Fonte: TAZ; ZEIGER (2004)

3.2 A importância das plantas medicinais

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. As civilizações antigas selecionaram, mesmo que empiricamente, plantas comestíveis e espécies com capacidade medicinais pouco tóxicas. Plantas medicinais são extensamente utilizadas, principalmente em regiões onde o acesso ao cuidado de saúde formal é limitado, e sua seleção e uso dependem dos sintomas, da disponibilidade de espécies na região e de aspectos culturais e educacionais (AMOROZO, 2002;MAHABIR;GULLIFORD, 1997; VEIGA-JUNIOR et al, 2005;WHO, 2013)

É cada vez mais comum o uso de plantas medicinais, algumas, apoiadas pela propaganda e pela garantia de ser de origem natural são comercializadas, muitas vezes,, entretanto, supostas propriedades farmacológicas não possuem validade científica (VEIGA-JUNIOR et al, 2005).

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, ela estima que cerca de 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas.

Visando o aumento da população mundial e a facilidade de disseminação de informação é imprescindível que as nações regulamentem o uso de plantas medicinais visando proteger a cultura popular e a segurança dos beneficiários deste tratamento.

Em muitas partes do mundo, políticos e profissionais de saúde estão enfrentando problemas de segurança, eficácia, qualidade, disponibilidade, preservação e regulamentação da medicina tradicional. Diante desta situação a OMS vem elaborando estratégias para serem adotadas por seus países membros (WHO, 2013). A estratégia da OMS 2014-2023 consiste em:

- Facilitar a integração da medicina tradicional e complementar nos sistemas de saúde, auxiliando os estados-membros no desenvolvimento de suas próprias políticas nacionais;
- Desenvolver diretrizes através do desenvolvimento e criação de normas, orientações técnicas e metodologias de pesquisa para produtos, práticas e profissionais;
- Incentivar a pesquisa estratégica na medicina tradicional e complementar para apoiar projetos de pesquisa clínica sobre a segurança e eficácia.
- Defender o uso racional da medicina tradicional e complementar, incentivando a sua utilização, com base em evidências científicas.

O Brasil por meio de decreto 5.813 de junho de 2006 estabelece a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e instituem diretrizes e linhas prioritárias voltadas à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais (MS, 2006). O decreto brasileiro dispõe de 15 diretrizes, dentre elas:

- Regular o cultivo; manejo sustentável; produção; distribuição e uso de plantas medicinais e fitoterápicos, considerando as experiências da sociedade civil nas suas diferentes formas de organização;
- Promover a formação técnico-científica e capacitação no setor de plantas medicinais e fitoterápicos;
- Fomentar pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população.

A importância das plantas medicinais não se restringe somente ao seu uso nos cuidados básicos de saúde, a OMS também reconhece as plantas medicinais e a cultura tradicional como norteadores na busca de novos compostos para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (WHO, 2012).

Como exemplo, no ano de 2001, 252 drogas foram consideradas essenciais naquele ano pela OMS, 11% delas foram oriundas de vegetais e um número significativo foram drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (RATES, 2001). Somente na última década, estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na época foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais (CALIXTO, 2001).

O Brasil é signatário da Convenção sobre diversidade Biológica (CDB), acordo estabelecido no âmbito da Organização das Nações Unidas (ONU) e integrado por 188 países cujos objetivos são a conservação da diversidade biológica, a utilização sustentável de seus componentes e a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos. Esta convenção também reconhece a cultura tradicional e uso de plantas medicinais e delega aos seus signatários o dever de garantir a esses povos e comunidades o direito de decidir sobre os usos desses saberes e de também perceber os benefícios decorrentes de seu uso (MS, 2006).

O Brasil é o principal dentre os países megadiversos do mundo, é detentor de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores com 24% da biodiversidade. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerado de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passado de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais. O Brasil tem em mãos a oportunidade para colocar em prática o modelo de desenvolvimento próprio e soberano na área de saúde e uso de plantas medicinais que prime pelo uso sustentável dos componentes da biodiversidade e respeite os princípios éticos e

compromissos internacionais assumidos, para que desta forma promova a geração de riquezas com inclusão social (MS, 2006).

3.3 A Família Leguminosae

Leguminosae é a terceira maior família de plantas com distribuição cosmopolita, possui 727 gêneros e 19.327 espécies. No Brasil são estimados 1.500 espécies e 175 gêneros (SOUZA; LOURENZI, 2008). A maioria dos autores, baseados no sistema de classificação APG II (2003), reconhece as leguminosas como uma única família, com três subfamílias (Faboideae, Caesalpinioideae e Mimosoideae). Espécies de leguminosas podem ocorrer desde florestas pluviais luxuriantes até desertos, desde áreas quentes equatoriais até próximo aos polos. Variam desde pequenas ervas até árvores em florestas tropicais úmidas (QUEIROZ, 2009).

Esta família é conhecida devido ao seu sucesso em associar-se com bactérias fixadoras de Nitrogênio, que inclui as ordens Fabales (onde as leguminosas se encontram), Rosales, Curcubitales e Fagales. Em nenhum outro grupo esta associação é tão bem desenvolvida. (QUEIROZ, 2009).

A família Leguminosae pode ser caracterizada por uma combinação de características: folhas alternas, compostas, com estípulas; flores pentâmeras, períginas ou hipóginas, diclamídeas, diplostêmones, apresentando ovário súpero, unicarpelar, unilocular, com os óvulos inseridos de forma alterna em uma placenta marginal. Existem exceções para praticamente todas estas características (QUEIROZ, 2009). Espécies arbóreas apresentam porte variável a depender das condições locais. Frequentemente uma mesma espécie pode ser encontrada como uma árvore de grande porte, com 15 a 20m de altura em áreas com estações seca mais curta e solos de maior fertilidade. Isso pode ser observado em muitas espécies, como *Anadenanthera colubrina*, *Pyterogynenitens* e *Geoffroea spinosa* (QUEIROZ, 2009).

3.3.1A espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) pertence a família Leguminosae, subfamília Mimosideae e ocorre em florestas estacionais, distribuindo-se do nordeste do Brasil na Caatinga e em florestas estacionais ao longo das bacias do Paraguai e Paraná, no sul do Brasil. Ocorrem também na Argentina, Bolívia e Equador (LEWIS et al., 2005; PRADO; GIBBS, 1993)

Anadenanthera é um pequeno gênero, de acordo com a classificação Alstchull (1964) o gênero apresenta duas espécies e são bastante semelhantes sendo diferenciadas por características crípticas são elas: *Anadenanthera colubrina* var *cebil* ou var *colubrina* e *Anadenanthera peregrina* var *peregrina* ou var *falcata*. (QUEIROZ, 2009).

A diferença entre *Anadenanthera colubrina* e *Anadenanthera peregrina* é na localização da bráctea involucral, na superfície do fruto, sendo a primeira lisa e a segunda verrucosa e na ausência da glândula apical nas anteras de *A. peregrina*. (QUEIROZ, 2009).

Anadenanthera peregrina não é uma planta muito característica da Caatinga, diferentemente da *A. colubrina* onde são reconhecidas duas variedades de ocorrência na vegetação, são elas: var *colubrina* e var *cebil*. A análise mais recente desta espécie feita por Alstchull (1964) a identifica como *Anadenanthera colubrina* var *cebil* (Griseb.) Alstchull. Outros nomes podem ser relatados e são considerados sinônimos, são elas: *Acácia cebil* Griseb; *Peptadenia macrocarpa* Benth., *Peptadenia macrocarpa* var *cebil* (Griseb.) Chodart & Haals.; *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan, Kew Bull (QUEIROZ, 2009; WEBER et al., 2011).

Anadenanthera colubrina var *cebil* é conhecida popularmente por Angico Branco, Angico, Angico de Carço, Angico de Casca, Angico Vermelho, Angico Verdadeiro, Angico Jacaré (QUEIROZ, 2009; WEBER et al., 2011).

Há relatos populares de que as cascas do angico são utilizadas para o tratamento de inflamações em geral e para tratamento de doenças respiratórias (AGRA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2008). Frutos são conhecidos por suas propriedades alucinógenas e em concentrações mais altas como veneno (AGRA et al., 2008). Folhas ou partes aéreas são usadas para tratar anemia, inflamações em geral, câncer etc (ALBUQUERQUE et al., 2008).

Figura 2. Visão geral de *Anadenanthera colubrina* conhecida como Angico.



Fonte: Vinicius Lubambo (cnip.org.br)

3.3.2 Atividades biológicas e a espécie *Anadenanthera colubrina*

A literatura aborda diversos estudos e evidencia seu amplo potencial de aplicação em diversas áreas. Silva-Filho (2007) estudou extratos aquosos e etanólicos procedente da casca do Angico Preto (*Anadenanthera sp*) e testou contra carrapatos do gênero *Boophilus*. Os dois extratos apresentaram propriedade larvicida, sendo o extrato etanólico mais promissor, apresentando 85% da mortalidade nas concentrações 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL e 1,56mg/mL. Tokarnia et al. (1999) se propuseram a estudar a intoxicação cianídrica em bovinos promovida por *A. colubrina*, eles analisaram que as folhas de *A. colubrina* são mais tóxicas quando em brotos do que maduras e que sua toxicidade é perdida lentamente quando dessecadas. Os autores sugerem que seus estudos têm valor apenas relativo na avaliação de glicosídeos cianogênicos em material vegetal. Brito et al. (2000) testaram em coelhos a toxicidade das folhas secas e armazenadas durante 4-6 meses sob as formas de saco de algodão e embalagens de vidro. A toxicidade neuromuscular em coelhos foi observada em folhas dessecadas e armazenadas, no entanto, a dose letal foi visualizada nas folhas em fase de brotação (6g/kg). Luna et al. (2004) encontraram resultados positivos nas atividades larvicida e moluscicida com o extrato da casca do angico.

Desmadechelier et al (1999) relatam atividade antioxidante para os extratos metanólicos e hidroalcoólicos da casca de *A. macrocarpa* (sinônimo para *Anadenanthera colubrina*) sendo o extrato metanólico mais ativo. Seu extrato aquoso se mostrou ativo contra o íon peroxila sugerindo que estas propriedades possui papel na atividade anti-inflamatória. Campos e colaboradores (2014) visualizaram atividade antimicrobiana no extrato metanólico do fruto de *A. colubrina*, da qual foi submetida a fracionamento com solventes de diferentes polaridades, a fração mais ativa (solúvel em hexano) foi submetida a fracionamentos posteriores por cromatografia em coluna de sílica gel que permitiram isolar seis substâncias, das quais três apresentaram atividade antifúngica *in-vitro* contra *Alternaria alternata*. Por RMN foi possível elucidar apenas duas estruturas responsáveis pela atividade, β -sitosterol e Linoleato de β -sitosterila. Da Silva et al (2013a) relataram atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico originado do fruto frente a *Staphylococcus aureus* com halos de inibição de 14.67 ± 0.57 , concentração inibitória mínima de 1,56 mg/mL e concentração bactericida mínima de 6,25 mg/mL. Estes mesmos autores relataram atividade antioxidante, protetora de DNA e de efeito sinérgico com eritromicina frente a *S. aureus* (DA SILVA et al, 2011; 2013a, 2013b). Trentin et al. (2013) visualizou inibição de formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* utilizando extratos aquosos e fração rica em taninos originados da casca de *A. colubrina*.

Anadenanthera colubrina teve seu potencial anti-inflamatório confirmado por Gutierrez-Lugo et al. (2004). Um novo flavonóide foi isolado das partes aéreas de *A. colubrina* (Anadanthoflavone) com capacidade de inibir *in vitro* a lipoxigenase de plaquetas e reticulócitos humanos e a lipoxigenase da soja. Moretão et al (2003) estudaram as propriedades

imunomoduladoras do complexo heteropolissacarídeo de *A. colubrina*, rico em arabinose e galactose, denominado ARAGAL, em macrófagos peritoniais. Os autores observaram que 82% dos macrófagos foram ativados na presença de 300 µg/mL de ARAGAL após 24 h de incubação e 91% após 48 h. Adicionalmente, 25 µg/mL de ARAGAL foram suficientes para induzir a capacidade fagocitária ao máximo. Estes mesmos autores também sugerem a possível participação do ARAGAL como mediador de resposta imunológica frente a tumores (Moretão et al., 2004) Lima et al.(2014) relataram atividade antimicrobiana para *Candidaalbicans* com concentração inibitória mínima de 0,03mg/mL tanto para o extrato hidroalcoólico quanto para a fração acetato de etila da casca de *A. colubrina*. Estes mesmos autores relataram atividade antitumoral e antibiofilme.

3.3.3 Metabólitos isolados e a espécie *Anadenanthera colubrina*

De acordo com a revisão realizada por Weber e colaboradores (2011), identificaram 1306 estudos (encontrados através das plataformas: ScienceDirect, SCIRUS, LILACS, SciELO, SCOPUS, MEDLINE e SciFinder) utilizando como palavra-chave *Anadenanthera colubrina* e suas sinônimas, apenas 6 destes trabalhos isolaram compostos (figura 4) e atribuíram a alguns deles alguma atividade biológica. 10 apenas relataram alguma atividade biológica e 18 estudos resumiram-se ao mapeamento do uso de plantas medicinais das quais *A. colubrina* está entre uma das mais relatadas. Foram, na revisão de Weber et al (2011), excluídos os trabalhos duplicados nas bases de pesquisa, bem como os artigos que tinham como o objetivo restrito ao estudo genético, paleontológico, ecológico ou botânico sem demonstrar interesse químico, medicinal ou etnofarmacológico. Outra revisão de literatura sobre o potencial biológico de *A. colubrina* realizado por Silva e colaboradores (2012) enfatiza apenas dois autores (GUTIERREZ-LUGO et al., 2004; MORETÃO et al., 2003) também citado por Weber et al. (2011), estes dois autores são responsáveis pelo maior acervo de isolamento sobre esta espécie já encontrada até o momento. Recentemente, Campos et al. (2014) isolaram e elucidaram duas estruturas, β -sitosterol e Linoleato de β -sitosterila das quais foram atribuídas potencial antimicrobiano.

Figura 3. Estrutura dos metabólitos isolados de *Anadenanthera colubrina* segundo revisão de Weber et al. (2011) e Silva et al (2012).

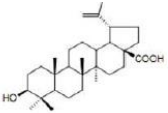
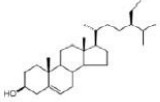
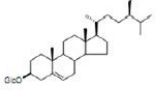
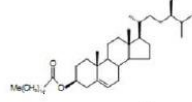
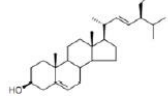
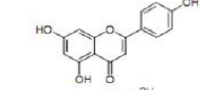
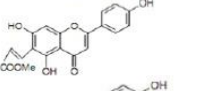
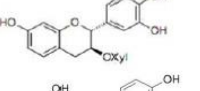
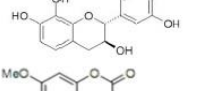
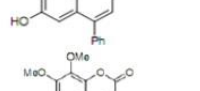
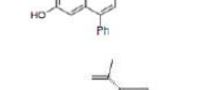
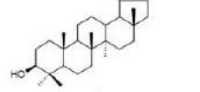
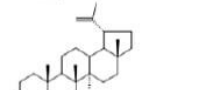
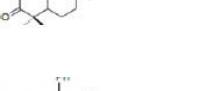
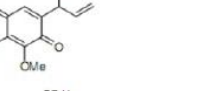
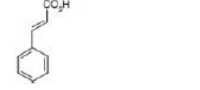
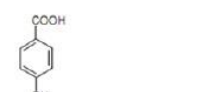
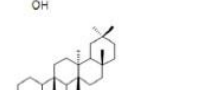
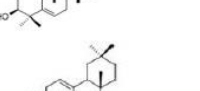
Ácido betulínico		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
β -sitosterol		Esteroides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
Daucosterol		Esteroides	Cerne	Miyauchi <i>et al.</i> , 1976
Palmitato de β -sitosteril		Esteroides	Cerne	Miyauchi <i>et al.</i> , 1976
Stigmasterol		Esteroides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004

Figura 4. (Cont). Estrutura dos metabólitos isolados de *Anadenanthera colubrina* segundo revisão de Weber et al. (2011) e Silva et al (2012).

Apigenina		Flavonoide	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
Anadantoflavona		Flavonoide	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
Anadantosideo		Flavonoide	Casca	Piacente <i>et al.</i> , 1999
Prosopina		Flavonoide	Cerne	Miyauchi <i>et al.</i> , 1976
Dalbergina		Outra substância aromática	Cerne	Miyauchi <i>et al.</i> , 1976
Kuhimannina		Outra substância aromática	Cerne	Miyauchi <i>et al.</i> , 1976
Lupeol		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
Lupeona		Terpenoides	Cerne	Miyauchi <i>et al.</i> , 1976
Dimetoxidalbergina		Outra substância aromática	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
Ácido cinâmico		Outra substância aromática	Cerne	Miyauchi <i>et al.</i> , 1976
Ácido 4-hidroxibenzoico		Outra substância aromática	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
Alnusénol		Outra substância aromática	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
β -amirina		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004
α -amirina		Terpenoides	Partes aéreas	Gutierrez-Lugo <i>et al.</i> , 2004

3.4 Resistencia aos Antimicrobianos

O processo de síntese comercial de antibióticos e sua administração terapêutica deu início após a descoberta da penicilina e das sulfamidas em 1928 e 1932 respectivamente. Ao longo do tempo estes fármacos contribuíram para o controle de infecções (LIVERMORE, 2003).

No entanto, o impacto causado pelos antibióticos na saúde vai além de seus benefícios, pois sua ação na vida microbiana ao longo dos anos determinou no surgimento de agentes patogênicos resistentes a esses e outros medicamentos (KUMMERER, 2003).

O aparecimento da resistência antimicrobiana é uma consequência da sua utilização. Enquanto que os antibióticos são necessários para curar algumas infecções, o seu uso indevido ocorre, de forma significativa sob a forma do uso abusivo e desnecessário, aumentando a pressão seletiva sobre as bactérias para que desenvolvam resistência. A ameaça da saúde pública devido ao crescimento da resistência antimicrobiana é impulsionada tanto pelo uso adequado como inadequado de medicamentos anti-infecciosos utilizados na saúde humana e animal bem como no uso de antibióticos em grandes quantidades para a produção de ração animal (WHO, 2012).

Os antibióticos atuam através da inibição de processos essenciais à multiplicação da célula bacteriana e à sua sobrevivência. Podem ser classificados em diferentes grupos em função da sua estrutura alvo na célula bacteriana, diferenciando-se em inibidores da membrana citoplasmática, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, inibidores de síntese proteica e inibidores da síntese da parede celular (MURRAY et al., 2005).

Os antibióticos β -Lactâmicos destacam-se dos demais pela sua relevância na terapia clínica por não serem tóxicos ao homem; esta propriedade está associada ao seu mecanismo de ação. Os β -Lactâmicos agem em uma estrutura que existe unicamente nas bactérias, o peptidoglicano (DIAS, 2009). Fazem parte o grupo β -Lactâmicos a classe penicilina e suas subclasses (exemplo: penicilina, amoxicilina, ampicilina, piperacilina, ticarcilina, metilicilina, oxacilina), a classe Cefemes e suas subclasses (exemplos: cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, cefoxitina etc), a classe dos monobactâmicos e dos penemes (DIAS, 2009).

Os β -Lactâmicos agem nas PBPs (proteínas de ligação de penicilina), proteínas que mantêm a estrutura de peptidoglicanos, impedindo sua síntese, desencadeiam a lise da célula bacteriana (MURRAY et al., 2005).

Os organismos procariontes podem apresentar um de três fenótipos: resistência intrínseca, resistência adquirida ou susceptibilidade. A resistência intrínseca é a resistência natural exibida por todos os exemplares de determinada espécie. Como exemplo, os organismos do gênero *Enterobacter* são naturalmente resistentes à cefoxitina, fenótipo que surge devido à produção de uma β -lactamase AmpC cromossômica (CAVALHO et al., 2008; HONORE et al., 1998). A resistência adquirida aos antibióticos pode resultar da mutação de genes reguladores ou estruturais, da aquisição de

genes de resistência veiculados por elementos genéticos móveis (tais como plasmídeos) ou da combinação de ambos mecanismos. A resistência adquirida não estará presente em todos os indivíduos de uma mesma espécie, existirá apenas nos indivíduos de uma linhagem bacteriana que derive de um organismo susceptível (HARBOTTLE et al., 2006).

A resistência aos antibióticos β -lactâmicos pode resultar de modificações do alvo do antibiótico (PBPs), impermeabilidade da membrana citoplasmática, existência de proteínas de efluxo ou ainda inativação enzimática do antibiótico (NIKAIDO, 2009).

A Organização Mundial de Saúde publicou em 2001 sua estratégia global para combater a resistência antimicrobiana e no dia mundial da saúde de 2011 convidou os países a aderirem a um pacote de políticas, dentre eles destacam-se: regulamentação e promoção do uso racional de medicamentos na pecuária e garantia de cuidados adequados ao paciente; aprimoramento da prevenção e do controle de infecções (WHO, 2012).

A estratégia global da OMS de 2001 para a contenção da resistência destaca a capacitação, apoio à escolha de tratamentos baseados nos melhores serviços de diagnóstico e formas de tratamento encorajando restrições à prescrição, instituindo auditorias e feedback nas prescrições e implementando regulamentos para a qualidade, promoção e a distribuição de medicamentos. A OMS reconhece que para colocar essas medidas em prática é frequentemente problemática, a redução do uso desnecessário de antibióticos é importante, no entanto também é necessário que se assegure o uso de medicamentos essenciais para aqueles que necessitam (WHO, 2012).

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.18 p.472-508, 2008.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MEDEIROS, P.M.; ALMEIDA, J.M.; LINSNETO, E.M.F.; MELO, J.G.; SANTOS, J.P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology** v.114 p.325-354, 2007.
- AMOROZO, M. C. M... Use and diversity of medicinal plants in Santo Antonio do Leverger, MT, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 16, n. 2, p.189-203, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos/ Ministério da Saúde, Secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos, departamento de assistência farmacêutica. 85-334-1092-1, 2006
- BRITO, M.F.; FRANÇA, T.N.; OLIVEIRA, K.D et al. Estudos experimentais em coelhos com plantas cianogênicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.20 (2) p.65-70, 2000
- CALIXTO, J. B. et al. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**. v. 2, p. 261-279, 2001.
- CAMPOS, V.A.; PERINA, F.J.; ALVES E.; SARTORELLI, J.; MOURA, A.M.; OLIVEIRA, D.F. *Anadenanthera colubrina* (vell) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. **Pest Management Science**. 70: 1815-1822, 2014
- CAVALHO, J.D.; CHARDON H.; CHIDIAC, C. et al. Recommendations 2008. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Paris. France. 2008.
- DA SILVA, L.C.N.; MIRANDA, R.C.M.; GOMES, B.; MACEDO, A.J.; ARAÚJO, J.M.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; SILVA, M.V.; DOS SANTOS CORREIA, M.T. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpamoniiformis* fruit extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Journal Of Medicinal Plants Research** .7:2358-2364, 2013b.

DA SILVA, L.C.N.; SANDES, J.M.; PAIVA, M.M.; ARAÚJO, J.M.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruit evaluated by electron microscopy. **Natural Products Research**. 27:1492-1496, 2013^a

DA SILVA, L.C.N.; SILVA-JUNIOR, C.A.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S.). Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpamoniliformis*. **Food and Chemical Toxicology**. 49: 2222-2228, 2011.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**. 23:174-181, 2012.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R.L.; COUSSIO, J. et al Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the Caatinga region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** v.67(1) p.69-77, 1999.

DIAS, D.J.A et al. Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogênicas de Gram-negativo. **TESE**. Universidade Nova de Lisboa, 2009.

EMERY, F.S.; SANTOS, G.B.; BIANCHI, R.C. A química na natureza. 7ed. São Paulo: Design LTDA, 2010

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.

GUTIERREZ-LUGO, M.T.; DESCHAMPS, J.D.; HOLMAN, T.R.; SUEREZ, E.; TIMMEMANN, B.N. Lipxygenase inhibition by an adanthoflavone, a new flavonoid from the aerial part of *Anadenanthera colubrina*. **Planta Medica**. 70:263-265, 2004.

HARBOTTLE, H.; THAKUR, S.; ZHAO, S.; WHITE, D.G. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology** 17:111-124, 2006.

HONORE, N.; NICOLAS, M.H.; COLE, S.T. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. **EMBO Journal** 5:3709-3714, 1986

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. **Current Opinion in Plant Biology**.14:246-251, 2011.

KUMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 52:5-7, 2003

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife: Ed. Universitária da UFPE. 822p, 2003

LEWIS, G.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. **Legumes of the World**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 592p.

LIMA, R.F.; ALVES, E.P.; ROSALEN, P.L. et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenanthera colubrina* (vell.) Brenan. **Hindawi Publishing Corporation: Evidence Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2014 7p, 2014

LIVERMORE, D. M. Antibiotic resistance in staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 16, suppl. 1, p. S3-S10, 2000.

LUNA, J.S.; DOS SANTOS, A.F.; DE LIMA, M.R.F. et al. A study of the larvacidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** v97(2) p.199-206, 2004.

MAHABIR, D.; GULLIFORD, M. G.. Use of medicinal plants for diabetes in Trinidad and Tobago. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v.1 n.3, p. 174-9, 1997.

MELLO, C.M.A.; SILVA, I.R.; PONTES, J.S.; GOTO, B.T.; SILVA, G.A.; MAIA, L.C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in an area of Caatinga, PE, Brazil. **Acta Botanica Brasílica**. 26:938-943, 2012.

MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde v.4 223-227, 2009.

MORETÃO, M.P.; BUCHI, D.F; GORIN, P.A.J.; JACOMINI, M.; OLIVEIRA, M.B.M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angicobranco) on peritoneal macrophage functions. **Immunology Letters**. 89:175-185, 2003.

MORETÃO, M.P.; ZAMPRONIO, A.R.; GORIN, P.A.J.; JACOMINI, M.; OLIVEIRA M.B.M..Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angicobranco). **Immunology Letters**. 93:189-197, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010.**Journal of Natural Products** . 75:311-335,2012.

NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Anual Review of Biochemistry** 78:8-28, 2009.

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. Piracicaba ã São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP p. 01 ã 26,2004.

QUEIROZ LP . Legumes of the Caatinga.Royal Botanic Garden Edinburgh,2009.443p.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*. V.39, 603-613, 2001

RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; RODRÍGUEZ-BELTRÁN, J.; COUCE, A.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**. 303:293-297,2013.

SILVA, M.I.G.; MELO, C.T.V.; VASCONCELOS, L.F.; CARVALHO, A.M.R.; SOUSA, F.C.F. Bioactivity and Potential therapeutic benefits of some medicinal plants from caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 22:193-207, 2012.

SOUZA, V.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para identificação das famílias e fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2.ed. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TOKAMIA, C.H.; PEIXOTO, P.V.; BRITO, M.F. et al. Estudos experimentais com plantas cianogênicas em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v 19(2) p 84-90, 1999.

TRETIN, D.S.; SILVA, D.B.; AMARAL, M.W.; ZIMMER, K.R.; SILVA, M.V.; LOPES, N.P.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J.). Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. **PlosOne** 8:66257, 2013.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**. 28:519-528, 2005

WEBER, C.R.; SOARES, C.M.L.; LOPES, A.B.D.; SILVA, T.S.; NASCIMENTO, M.S.; XIMENES, E.C.P.A. *Anadenanthera colubrina*: um estudo do potencial terapêutico. Artigo de revisão. **Revista brasileira de farmácia**. 92(4): 235-244, 2011.

WHO. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. World Health Organization. 978 92 4 350609 8, 2013.

WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action, World Health Organization. 978 92 4 150318 ,2012.

APÊNDICE

Effects of rainfall on the antimicrobial activity and secondary metabolites contents of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* from Caatinga area.

Artigo a ser publicado na revista *Pharmacognosy Journal*

Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo

Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Luís Claudio Nascimento da Silva

Programa de Mestrado em Biologia Parasitária, Universidade CEUMA, Maranhão, Brasil.

Wolfgang Harand

Laboratório de Fitoquímica, Instituto Nacional do Semi-Árido (INSA), Paraíba, Brasil.

Júlia Morais Fernandes

Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Brasil.

Thaciane da Cunha Soares

Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Brasil.

Silvana Maria Zucolotto Langassner

Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Brasil.

Rafael Matos Ximenes

Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Alexandre Gomes da Silva

Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Márcia Vanusa da Silva

Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Maria Tereza dos Santos Correia

Corresponding Author

Laboratório de Bioquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. Avenida Professor Moraes Rêgo, s/n. Cidade Universitária, Recife-PE. 50670-420. Fone: 558121268540 Fax: 558121268576

ABSTRACT

Background: *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) is a plant widely used for medicinal purposes in Brazilian Northeast. **Objective:** This study aimed to analyze the influence of rainfall indexes in antimicrobial activity and phytochemical constituents of extracts from leaves and fruits of *A. colubrina*. **Material and Methods:** Samples were collected in Catimbau National Park (Buíque, Pernambuco, Brazil) at September 2010 and January, April and June 2011, which showed rainfall index of 75 mm, 65 mm, 162 mm and 73 mm, respectively. The extracts were prepared by Soxhlet extraction using cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. The antimicrobial activity was determined by MIC and MBC values. **Results:** All extracts showed antimicrobial activity, but ethyl acetate extracts (from all periods) were more active. Strong correlations were found between the RI and the average MIC of MLE (£: -0.99), EALE (£: -0.81), CHFE (£: -0.81), EAFE (£: -0.80); while moderate and weak correlations were found for other extracts. Through a HPLC analysis was possible to reveal that the samples collected from dry periods had more chemical diversity (as they presented more peaks). Gallic acid and quercetin (and derivative compounds) were identified. The levels of quercetin were enhanced in extracts from dry months. **Conclusion:** Our results showed that the rainfall has a positive effect on the antimicrobial activity of leaves and fruits of *A. colubrina* and the variation of some metabolites, mainly quercetin. Other studies should be performed in order to identify the active compounds and to evaluate the effects of other environmental factors.

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) has been drawing attention to the increasing problem of microbial resistance to conventional antibiotics for more than a decade, and has encouraged research on medicinal plants, especially those from under-exploited biomes, such as the Caatinga, a unique biome from Northeast of Brazil.[1] The people of northeastern Brazil use hundreds of plant species for medical purposes, such as the control of microbial infections [2] [3]. For some of those, scientific evidence for this therapeutic potential could be found [4-7]. In recent years, the ethnomedicinal knowledge has stimulated several studies about the pharmaceutical potential of natural products of northeastern Brazil. [8] This is justified by the fact that the intrinsic features of this biome (drought, high solar radiation rates and other environmental stresses) influence the synthesis of secondary metabolites of Caatinga plants, [9] making them attractive targets for bioprospecting programs. [10]

In traditional medicine, *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *cebil* (Griseb) Alstchull (1964), popularly known as Angico (synonyms: *Acacia cebil* Griseb. Goett. Abh (1874), *Peptadenia macrocarpa* Benth. J. Bot (Hooker) 1842, *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan, Kew Bull. 10:182. 1955), [11] is frequently used by inhabitants of the Caatinga biome to treat anemia, cancer and inflammatory diseases. [2] [3] Previous studies demonstrated the

antimicrobial potential of leaves and fruits of this plant, especially against *Staphylococcus aureus*. [4-6] [12] In this context, the present study aims to analyze the effects of rainfall on the antimicrobial activity and secondary metabolites contents of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina*. For this reason, samples of the months September, January, April and June were compared.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and extract preparation

Leaves and fruits of a single individual of *A. colubrina* were collected at Catimbau National Park (Buíque, Pernambuco, Brazil) at September 2010 and January, April and June 2011. The rainfall index for this months were 75 mm, 65 mm, 162 mm and 73 mm, respectively (as provided by Agronomic Institute of Pernambuco; IPA/PE). The voucher specimen (IPA 84.039) is deposited at IPA/PE. The plant material was dried at 45°C and after 3 days milled to a fine powder in a Macsalab Mill (Model 200 LAB, Eriez®, Bramley), and stored at room temperature in closed containers in the dark until used.

Samples (100g) from each tissue were subjected to Soxhlet extraction using an eluotropic series of solvents in the following order: cyclohexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. All samples were subjected to saturation at reflux for 24 hours. After this time, the extracts were filtered (Whatman filter paper No 1). Solvent was completely removed from all extracts from leaves (L) or fruits (F) (cyclohexane: ChLE and ChFE; chloroform: CLE and CFE; ethyl acetate: EALE and EAFE; methanol: MLE and MFE) on a rotating evaporator at 45° under reduced pressure and stored for later antimicrobial and phytochemical analyses.

Antimicrobial assays

Microorganisms

The microorganisms used in this work were provided by Culture Collection UFPEDA (Department of Antibiotics, UFPE), consisting of: *Staphylococcus aureus* (three strains; UFPEDA 02, 733 and 709), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 86), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) and *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416).

Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method. [12] Twofold serial dilutions of each extract (initial concentration: 50 mg/mL) were prepared in Müller-Hinton broth (MHB) and 10^{-8} L of bacterial suspension (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) were added. The samples were incubated for 24 h at 37°C. Resazurin solution (0.01%) was used as an indicator by color change visualization: any color changes from purple to pink were recorded as bacterial growth. The lowest concentration at which no color change occurred was taken as the MIC. Afterwards, cultures were seeded in MHA and incubated for 24 h at 37°C to determine the minimum bactericidal concentration (MBC), which corresponds to the minimum concentration of the sample that eliminated the bacteria.

Phytochemical Analysis

Thin layer chromatography (TLC) analysis

The qualitative phytochemical analysis was performed by Thin layer chromatography (TLC) using aluminum-precoated plates of silica gel 60 F254 (Merck®) and adequate visualization techniques (Dragendorff, NEU-PEG, KOH-Ethanol, Liebermann-Burchard, vanillin-sulfuric acid and others reagents, according to the respective method). [13]

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis

Investigations of phenolic content were performed by a High-performance liquid chromatography system (HPLC; ProStar, Varian) which is comprised by a quaternary pump, diode array detector, auto-sampler. The reagents used were acetonitrile HPLC grade (Panreac®) and acetic acid (Vetec®). Water was purified through a milli-Q (Merck®) system. Phenolic compounds were analysed on a Phenomenex C18 column (250 x 4.6 mm, 5 µm), applying mobile phase gradient of acidified water (0.3% acetic acid) (solvent A) and acetonitrile (B) as follows: Linear gradient from 10 to 20% (B) from 0 to 10 min; and linear gradient from 20 to 28% (B) from 10 to 60 min. The flow rate was kept constant at 0.8 mL/min and detection was in the range of 190 to 450 nm. Phenolic compounds were identified by comparison of their retention times and their absorption spectra of ultraviolet light (UV). Gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, rutin and quercetin were used as standard compounds (all purchased from Sigma-Aldrich).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed by One-way analysis of variance (ANOVA). All analyses were carried out using software GraphPrism, version 4. The correlation indices were calculated using the Pearson coefficient (r). Only for correlation between Rainfall Index and MIC values a negative r -value is considered as direct correlation.

RESULTS

Effect of rainfall on the antimicrobial activity of Anadenanthera colubrina

All extracts from *A. colubrina* showed antimicrobial activity, being more active against gram-positive organisms (Table 1). Most tested bacteria were more sensitive to ethyl acetate extracts (from all periods). Taking into account the results for Gram-positive bacteria (all *S. aureus* strains and *B. subtilis*), ethyl acetate extracts from leaves showed the lowest average MIC values (1.06 mg/mL), this value was significantly lower than those observed for other extracts ($p < 0.05$). In the same way, among fruits extracts, the lowest average of MIC values were found to ethyl acetate extracts (17.50 mg/mL), however no significant differences were observed between the results. For this reason, the ethyl acetate extracts were selected for chemical analysis.

Regarding the effect of the collection period on antimicrobial activity, the lowest MIC values were observed in the months with the highest rainfall index (RI) for extract from both tissues (Table 1). Strong correlations were found between the RI and the average MIC of MLE (r : -0.99), EALE (r : -0.81), CHFE (r : -0.81), EAFE (r : -0.80); moderate correlation was observed for CLE (r : -0.62); while weak correlations were found for CFE (r : -0.48), MFE (r : -0.42), and CHLE (r : -0.27).

Effect of rainfall on phytochemical composition of Anadenanthera colubrina

It was observed by TLC analysis that the ethyl acetate extracts from both tissues exhibited flavonoids, cinnamic derivatives, terpenes, cyanogenic glycosides and proanthocyanidins. Whereas TLC assays did not show qualitative differences between the extracts obtained from leaves or fruits (Table S1), we were able to detect 15 phenolic compounds with different retention time (Rt) and UV spectra in HPLC chromatograms. The concentration of these compounds varied with tissue and rainfall index.

The extracts from fruits showed more compounds than those from leaves: peaks 2 and 5 were found at all fruits samples, EAFE1 had the highest chemical phenolic diversity as 13 peaks were detected against 10 peaks for EAFE2, EAFE3 and EAFE4. Some compounds showed differential qualitative: peaks 3 and 4 were only detected on EAFE1, and peak 6 had maximum detection on September (EAFE1); while peaks 8, 12 and 15 apparently were more found in April and January (Figure 1).

Regarding the qualitative results for leaf extracts, EALE2 showed the highest number of peaks (8). Only two peaks were specific for EALE2 (12 and 13) and peak 14 was only absent for EALE1; the others were present in all extracts. However, quantitative differences for some compounds contents could be observed, for example, peak 1 was larger in January, and peak 15 in September and January (Figure 1).

The identity of gallic acid (peak 1) and quercetin (peak 15) were confirmed by co-injection of an internal standard for each compound (Figure S1). Some compounds (peak 10 and 11) are presumably are quercetin derivatives due to the close similarity in the UV absorption spectra (Figure S2). Gallic acid, quercetin (and its derivatives) had already been detected in the extracts from *A. colubrina*. [6] [21] Antimicrobial activity of plants is commonly attributed to these compounds. [14-16]

DISCUSSION

This work analyzed the effects of rainfall on the antimicrobial action and phytochemical constituents of extracts from leaves and fruits of *A. colubrina*. This plant has been subject of several studies about its pharmaceutical potential. [4-7] [12] [17] In our previous studies the antimicrobial action of extracts and fractions from leaves and fruits of *A. colubrina* was reported against Gram-positive bacteria, and no activity was observed against Gram negative bacteria. [4-6] [12] In the present work we employed a different extraction method, by which we obtained extracts with activity against tested Gram negative bacteria. Anyway, the best activity was found against *S. aureus* and *B. subtilis*, and ethyl acetate extracts had the best activity. It is also important to highlight that some variation on antimicrobial activity of products derived from *A. colubrina* has been found according with area of cultivation. For example, extracts derived of samples from Cerrado biome did not show antagonist activity, [18] while others from Caatinga area were able to inhibit microbial grow. [19]

Since the production of secondary metabolites is influenced by environmental conditions (such as temperature, soil composition, solar irradiation, water availability), we attempted to evaluate the influence of rainfall on the antimicrobial action and chemical composition of extracts from both leaves and fruits. First we analyzed the variation on antimicrobial activity of those extracts. We correlated the RI for each month where the collection was performed with the MIC average obtained. Strong correlations were found for most of extracts. There is no consensus on the effect of rainfall index in the biological activity of plants, both positive and negative correlations are reported. [20] [21] Our results corroborate with several reports which showed a positive effects of rainfall and the biological activity of plant extracts. [20] [21]

The influence of rainfall on the phytochemical composition of *A. colubrina* extracts was first analyzed by TLC based assay. In general, we observed the same composition reported in our previous work. [12] It was not noted qualitative differences between the extracts prepared in each

period. Thus, we attempted to perform a HPLC analysis which revealed some quantitative differences: the samples collected from dry periods had more diversity (as they presented more peaks). Some compounds were identified: gallic acid (peak 1), quercetin (peak 15) and two quercetin derivatives (peaks 10 and 11). In addition, quercetin levels increased in those extracts from dry months. Enhanced levels of quercetin have been reported to other plants during dry seasons. [22] This result could be explained by the well-known photoprotective effect of quercetin. [23]

CONCLUSION

Our results showed that the rainfall has a positive effect on the antimicrobial activity of leaves and fruits of *A. colubrina* and the variation of some metabolites, mainly quercetin. Other studies should be performed in order to identify the active compounds and to evaluate the effects of other environmental factors (such as soil conditions, solar radiation, relative humidity and temperature). These analyses may direct for the best collection time for obtain antimicrobial products derived from *A. colubrina* which can be applied for biomedical purposes.

REFERENCES

1. World Health Organization. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action, World Health Organization. 2012; 2: 14-21.
2. Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida JM, Linsneto EMF, Melo JG, Santos JP, Santos JP. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. J. Ethnopharmacol. 2007; 114:325-354.
3. Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. Rev. Bras. Farmacogn. 2008;18: 472-508.
4. Da Silva LCN, Silva-Junior CA, Souza RM, Macedo AJ, Silva MV, Correia MTS. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibiaferrea* and *Pityrocarpamoniliformis*. FoodChem. Toxicol. 2011; 49: 2222-2228.
5. Da Silva LCN, Sandes JM, Paiva MM, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Correia MTS. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. Nat. Prod. Res. 2013;27:1492-1496.
6. Da Silva LCN, Miranda RCM, Gomes B, Macedo AJ, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Correia MTS. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibiaferrea* and *Pityrocarpamoniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. J. Med. Plants Res. 2013;7:2358-2364.
7. Tretin DS, Silva DB, Amaral MW, Zimmer KR, Silva MV, Lopes NP, Giordani RB, Macedo, A. Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. PlosOne. 2013; 8:66257.
8. Saraiva ME, De Alencar Ulisses, AVR, Ribeiro DA, De Oliveira LGS, De Macêdo DG, De Sousa FDFS, De Almeida Souza MM. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. J. Ethnopharmacol. 2015;171:141-153
9. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. Quim. Nova. 2007;30(2):374-381.

10. Albuquerque UP, De Medeiros PM, Ramos MA, Júnior WSF, Nascimento ALB, Avilez WMT, De Melo J G. Are ethnopharmacological surveys useful for the discovery and development of drugs from medicinal plants? Rev. Bras. Farmacogn. . 2014; 24(2): 110-115.

11. Queiroz, LP. Legumes of the Caatinga. Feira de Santana: Royal Botanic Garden Edinburgh. 2009.p. 440-443.

12. Araújo DRC, Da Silva LCN, Da Silva AG, Macedo AJ, Correia MTS, Da Silva MV. Comparative analysis of anti-Staphylococcus aureus action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *Cebil* (Griseb.) Altschull. Afr. J. Microbiol. Res. 2014; 8: 2690-2696.

13. Wagner, H, Bladt S, Zgainsky EM. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer. 1984. p. 320.

14. Kim DH, Je JY. Antimicrobial activity of gallic acid-grafted-chitosan against fish pathogens. Int. J. Carbohydr. Chem. 2015; 34(3):163-171.

15. Sarjit A, Wang Y, Dykes GA. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. Food microbial. 2015;46: 227-233.

16. Fu R, Zhang Y, Guo Y, Chen F. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of Chinese tallow tree leaves. Ind. Crop. Prod. 2015; 76: 374-377.

17. Campos VAC, Perina FJ, Alves E, Sartorelli J, Moura AM, Oliveira DF. *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan produces steroidal substances that are active against *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and that may bind to oxysterol-binding proteins. Pest. Manag. Sci. 2014;70:1815-1822.

18. Gonçalves AL, Alves Filho A, Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq. Inst. Biol. 2005;72(3): 353-358.

- 19.Costa EMMB, Barbosa AS, Florentino VGB, Silva JDF, Trovão DMBM, Medeiros ACD. In vitro antimicrobial activity of plants extracts of semi-arid region of Paraíba, PB,Brazil. J. Dental Science 2013; 28(4):100-104.
- 20.Hussain AI, Anwar F, Sherazi, STH, Przybylski R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of Basil (*Ocimumbasilicum*) essential oils depends on seasonal variations. FoodChem. 2008;108(3): 986-995.
- 21.Araújo TAS, Castro VTNA, Solon LGS, Da Silva GA, Almeida MG, Costa JGM, Amorim ELC, Albuquerque UP. Does rainfall affect the antioxidant capacity and production of phenolic compounds of an important medicinal species? Ind. Crop. Prod. 2015;76:550-556.
- 22.Miao Ma, Cheng-Lin Hong, Shu-Qing An, Bo Li. Seasonal, spatial and interspecific variation in quercetin in *Apocynumvenetum* and *Poacynumhendersonii*, Chinese traditional herbal teas. J. Agric. FoodChem. 2003;51(8): 2390-2393.
- 23.Nishiwaka DO, Peres DD, Oliveira CA, Silva VLR, Kaneko TM, Velasco MVR, Baby AR. Stability and efficacy of sunscreens containing inorganic filters and quercetin. Biomed Biopharm. Res. 2013;1(10): 91-100.

Table 1. Antimicrobial activity of ethyl acetate extracts from leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina*.

Tissues	Strain	September		January		April		June	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Leaves	<i>S. aureus</i> 02	0.390	6.25	0.781	12.5	0.195	0.781	0.390	1.562
	<i>S. aureus</i> 733	0.781	3.125	0.781	25	0.390	0.781	6.25	12.5
	<i>S. aureus</i> 709	1.562	50	1.562	>50	0.781	3.125	0.390	12.5
	<i>E. coli</i>	6.25	6.25	6.25	50	0.390	>50	6.25	25
	<i>P. aeruginosa</i>	3.125	6.25	6.25	50	12.5	12.5	0.781	6.25
	<i>B. subtilis</i>	0.781	1.5625	0.781	50	0.390	0.390	0.781	>50
	<i>K. pneumoniae</i>	25	>50	25	>50	1.562	6.25	25	>50
Fruits	<i>S. aureus</i> 02	0.390	3.125	0.390	12.5	0.097	0.390	0.781	>50
	<i>S. aureus</i> 733	0.781	3.125	1.562	6.25	0.390	0.781	1.562	3.125
	<i>S. aureus</i> 709	0.193	6.25	1.562	6.25	0.195	0.781	0.019	0.039
	<i>E. coli</i>	6.25	6.25	6.25	6.25	0.195	>50	6.25	6.25
	<i>P. aeruginosa</i>	1.562	1.5625	1.562	3.125	6.25	12.5	6.25	6.25
	<i>B. subtilis</i>	0.781	3.125	0.781	50	0.195	0.390	0.390	6.25
	<i>K. pneumoniae</i>	25	>50	25	>50	0.781	>50	6.25	6.25

Results are expressed in mg/mL

Table S1. Phytochemical profile of ethyl acetates from leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina*.

Class of secondary metabolite	<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>Cebil</i>							
	Leaves				Fruits			
	Sep/10	Jan/11	Ab/11	Jun/11	Sep/10	Jan/11	Ab/11	Jun/11
Flavonoids	++	++	++	++	++	++	++	++
CinnamicAcidDerivatives	traces	traces	traces	traces	++	++	++	++
Triterpenes and Steroids	+	+	+	+	+	traces	traces	traces
Mono and Sesquiterpenes	-	-	-	-	-	-	-	-
Alkaloids	-	-	-	-	-	-	-	-
Proanthocyanidins	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++

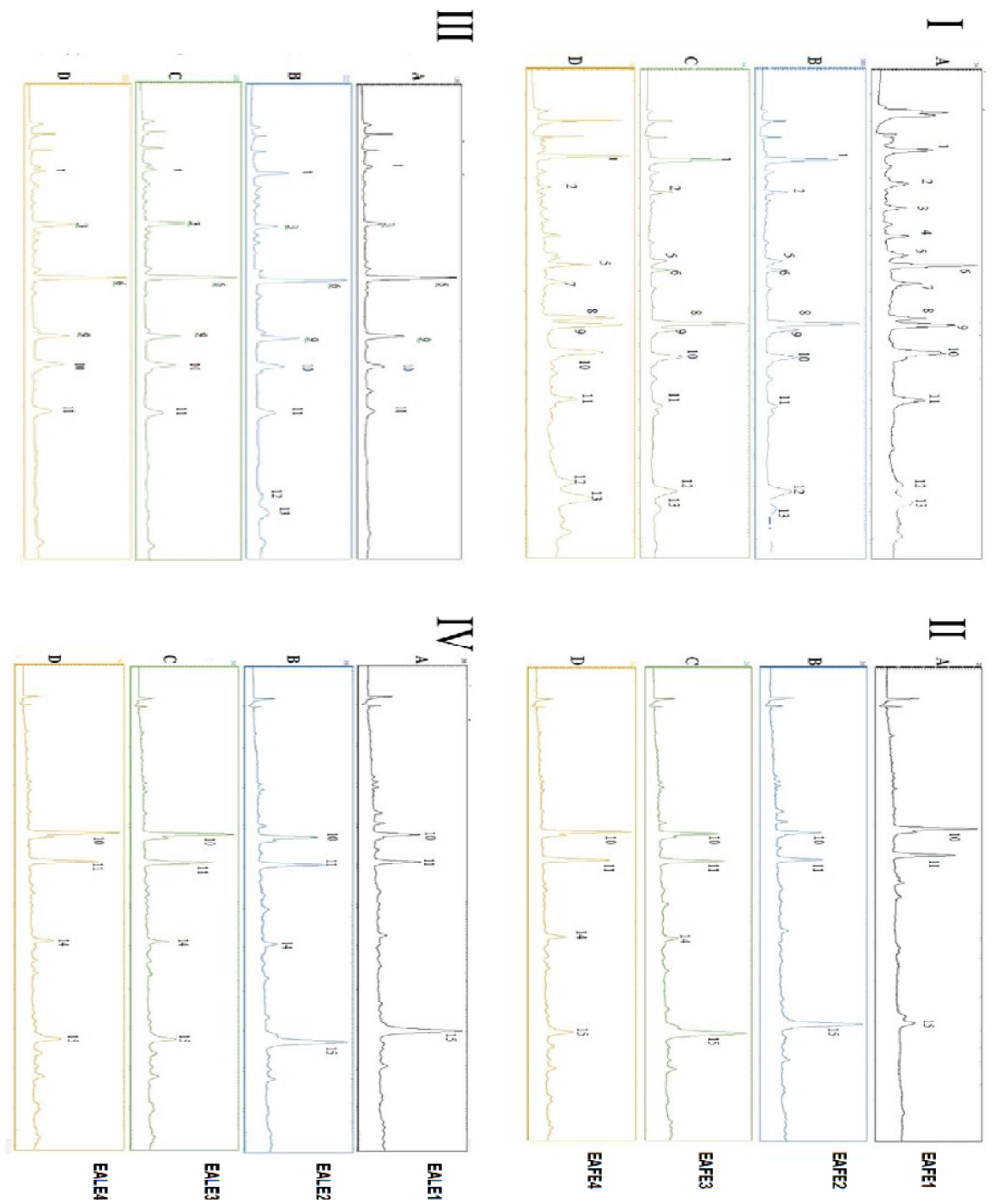


Figure 1: HPLC-UV chromatograms of phenolic compounds from ethyl acetate extracts of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* collected at September 2010 (A), January 2011 (B), April 2011 (C), June 2011 (D). I: Chromatogram from fruits detected at 280 nm; II: Chromatogram from fruits detected at 340 nm; III: Chromatogram from leaves detected at 280 nm; IV: Chromatogram from leaves detected at 340 nm.

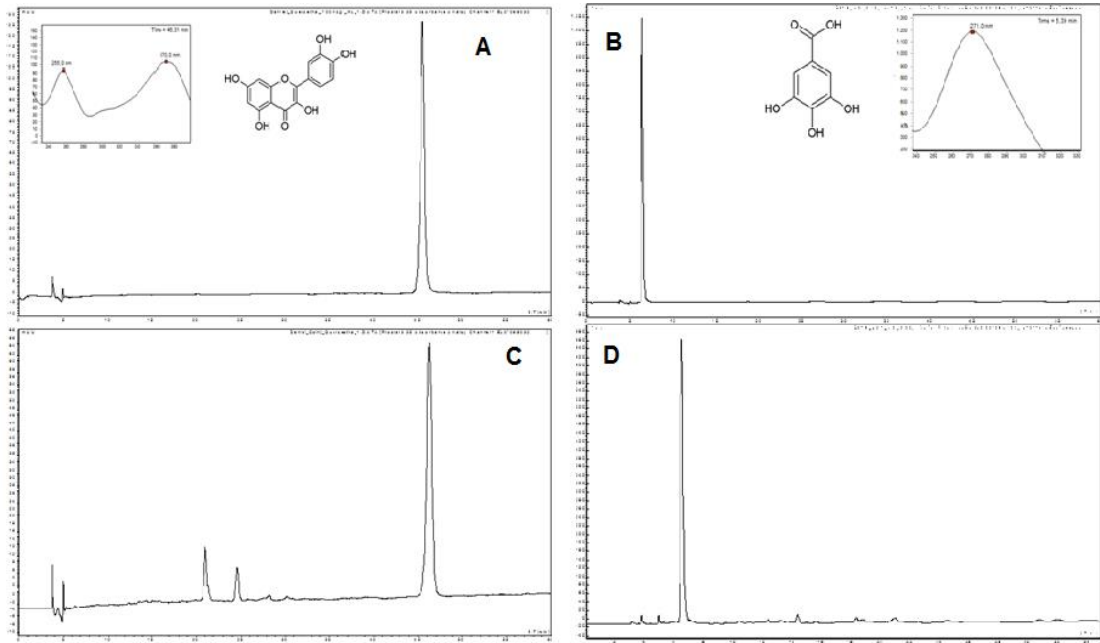


Figure S1: HPLC-UV chromatograms of quercetin (A), gallic acid (B), quercetin + ethyl acetate extracts of *A. colubrina* leaves (C) and gallic acid + ethyl acetate extracts of *A. colubrina* leaves (D). Detection at 340 nm.

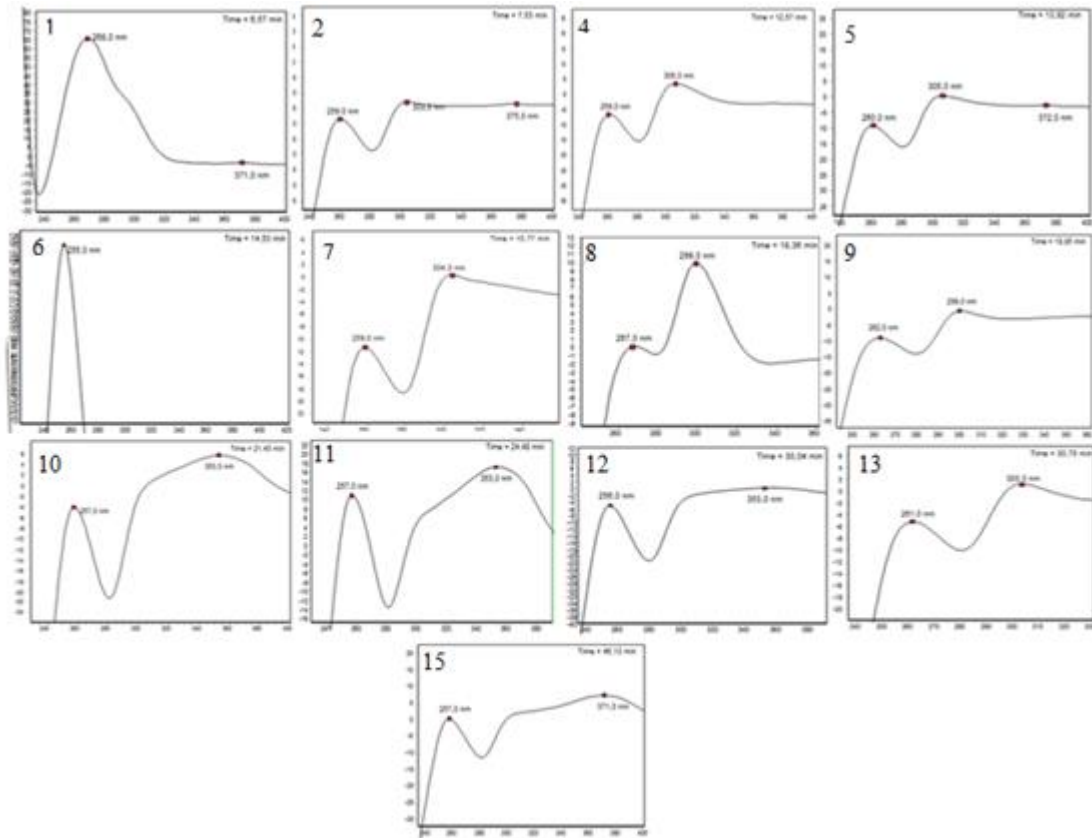


Figure S2: UV spectra analysis of the main peaks. Peak 1: gallic acid (UV 268nm); peaks 10 e 11: quercetin derivatives (UV 257 353nm) and peak 15: quercetin (UV 257 371nm)

ANEXO

Comparative analysis of anti-*Staphylococcus aureus* action of leaves and fruits of
Anadenanthera colubrina var. *cebil*(Griseb.) Altschul

Artigo publicado na Revista óAfricanJournalofMicrobiologyResearchô, volume 8, issue 28,
páginas 2690- 2696, Julho 2014

Full Length Research Paper

Comparative analysis of anti-*Staphylococcus aureus* action of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul

Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo¹, Luis Claudio Nascimento da Silva^{1*}, Alexandre Gomes da Silva¹, Janete Magali de Araújo², Alexandre José Macêdo³, Maria Tereza dos Santos Correia¹ and Márcia Vanusa da Silva¹

¹Departamento de Bioquímica, Laboratório de Produtos Naturais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Departamento de Antibióticos, Laboratório de Genética de Microorganismos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Received 14 May, 2014; Accepted 13 June, 2014

This study evaluated the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and phytochemical constituents of leaves and fruits of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*. the hemolytic action of active fractions was also checked. After a liquid-liquid partition of hydroalcoholic extracts, the following fractions were obtained: cyclohexane (CFL), ethyl acetate (EAFL), n-butanol (NBFL) and aqueous fractions (AFL) from leaves; and cyclohexane (CFF), ethyl acetate (EAFF), n-butanol (NBFF) and aqueous fractions from fruits (AFF). The antimicrobial action of these samples was evaluated by microdilution assay against seven clinical isolates of *S. aureus* and the standard strain. Finally, the hemolytic activity of active fractions was checked. Phytochemical analysis detected the presence of triterpene, carbohydrate (leaves); flavonoids and tannin (fruit and leaves). All samples showed ant-*S. aureus* action and the most active fractions were EAL and EAF. The MIC ranged from 0.78125 to 6.25 mg/mL (EAFL) and 0.390625 to 1.5625 mg/mL (EAFL). Both fractions showed low toxicity since the HC50 values were greater than MIC50 values: the ratio MIC50/HC50 for EAFL was 3.68 and 11.61 for EAFF. Our work showed that *A. colubrina* is a potential source of anti-*S. aureus* molecules, their isolation and characterization are target of new research of our group.

Key words: *Anadenanthera colubrina*, caatinga, antimicrobial activity, hemolytic activity.

INTRODUÇÃO

The discovery of antibiotics in the 1930s revolutionized medicine in many respects, completely change the scenario of treatment of being developed at the pace necessary to stay ahead of the natural ability of bacteria to evolve and defend themselves against antibiotics (WHO, 2012; Rodríguez-Roja et al., 2013). In the face of this problem, the search for bioactive molecules of natural origin has intensified, and molecular structures of secondary metabolism compounds have been elucidated, such as the class of flavonoids, tannins and other polyphenols with antibacterial, antifungal and antiviral properties (Cushnie et al., 2005; Newman and Cragg, 2012; Daglia, 2012). Various studies have shown that the synthesis of these metabolites is mediated by factors such as seasonality, availability of water, ultraviolet radiation, temperature, altitude, etc (Kroymann, 2011). The Caatinga biome is seen as an attractive source of bioactive molecules, as it presents extreme variations in these factors and it has a unique plant formation. This biome is located in northeastern Brazil, extending from 2°54'S to 17°21'S and its size is estimated at 800,000 km². As compared to other Brazilian ecosystems, the Caatinga has many extreme characteristics among climatic patterns: the highest solar radiation, low cloud cover, the highest annual average temperature, the lowest rates of relative humidity, higher potential evapotranspiration and, above all, precipitation limited to a very short period of the year (Mello et al., 2012).

One of the species found in this biome is *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae ñ Mimosoideae) which

occurs mainly in seasonal forests, distributed in northeastern Brazil (Maranhão to Minas Gerais) in Caatinga as well as in southern Brazil in seasonal forests within the basins of the Paraguay and Paraná Rivers. It also occurs in the northeastern and northwestern Argentina, southeastern and southwestern Bolivia and the southern region of Ecuador (Soldati and Albuquerque, 2010).

The most recent analysis of this species was made by Alstchull (1964), in which *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Alstchul was described. Other names have been reported, such as: *Acacia cebil* Griseb., Goett. Abh. 19:136.1874; *Peptadeniamacrocarpa* Benth., J. Bot. (Hooker) 4:341.1842; *P. macrocarpa* var. *cebil* (Griseb.) Chodat & Haasl., Bull. Herb. Boiss. ser. 2, 4:560. 1904; *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan, Kew Bull. 10:182.1955 (Queiroz, 2009). *A. colubrina* var. *cebil* is popularly known as *angico*, *angico-preto*, *angico-verdadeiro*, *angico-jacaré*, *angico-de-caroço* and *angico-vermelho* (Queiroz, 2009). Bark of *A. colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Alstchull is used for the treatment of bronchitis; the fruits can be used as hallucinogens; while the leaves have shown no evidence of medicinal use (Agra et al., 2008).

Previous studies of crude extracts of *angico* have been restricted to the bark due to its wide popular use (Table 1) (Palmeira et al., 2010; Pessoa et al., 2012). Our group was the first to find evidence for the antimicrobial and antioxidant activity of crude extracts of the fruit of *A. colubrina* (Da Silva et al., 2011, 2013a, b; Silva et al., 2012). Our group was also the first to analyze the inhibition of bacterial biofilms with leaves, fruit and bark of *A. colubrina*,

finding the most significant activity from the bark (Trentin et al., 2013). In this context, the present study aims to analyze the phytochemical profile of the crude extract of leaves and fruits of *A. colubrina* var. *cebil*, as well as elucidate the antimicrobial potential of fractions from both extracts and the hemolytic effects of active fractions.

MATERIALS AND METHODS

Plant collection and plant storage

Leaves and fruits of *A. colubrina* var. *cebil* were collected in Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Brazil, northeastern Brazil, in September 2010. Botanical identification was made by the staff of the Herbarium of Instituto de Pesquisa Agronômica de Pernambuco (IPA), Brazil, and voucher specimens were deposited in the herbarium (IPA 84.039). Leaves and fruits were dried at room temperature. The dried plants were milled to a fine powder in a Macsalab Mill (Model 200 LAB, Eriez®, Bramley), and stored at room temperature in closed containers in the dark until used.

Preparation of the crude hydroalcoholic extract

Leaves and fruits of *A. colubrina* var. *cebil* were dried at room temperature for 7 days, ground into a fine powder and used for extraction. The powder (20 g) from each tissue (fruit or leaves) was mixed with 50 mL ethanol : water (7:3) and submitted to agitation for 15 h. Then the extracts were filtered and the powder residue was mixed again with 50 mL ethanol-water and the entire extraction process was repeated. The supernatants collected were mixed in a round bottom flask and concentrated at

45°C (Silva et al., 2011). The residue was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and kept at -20°C until use.

Phytochemical analysis

The phytochemical tests to detect the presence of tannins, flavonoids, anthocyanins, saponins, coumarins, quinones, anthraquinones, reducing compounds and alkaloids in each tissue (fruit or leaves) were performed according to the method described by Kokate (1994) and Harborne (1998).

Fractionation of the hydroalcoholic extract

The hydroalcoholic extract was dissolved in water, producing a solution that was submitted to successive liquid-liquid partitions with cyclohexane, ethyl acetate and n-butanol. The solutions produced were dried in anhydrous Na₂SO₄ and submitted to filtration under reduced pressure. Thereafter, the solvents were evaporated under reduced pressure in a rotary evaporator oven at 60°C, producing hexane, ethyl acetate and n-butanol phases (Oliveira et al., 2012). The residues obtained were kept at -20°C for future use.

Microbial strains

The antimicrobial activity of *A. colubrina* var. *cebil* leaves and fruit extracts and fractions was tested against the following

Table 1. Pharmacological potential of *Anadenanthera colubrina*.

Tissue	Traditional uses	Scientific account	Related compounds
Leaves or aerial parts	Anemia, lung inflammation, inflammations in general, cancer, blood thinner and other (Albuquerque et al, 2007).	Inhibitory activity on human platelet 12 – lipoxygenase, human reticulocyte 15-lipoxygenase and soybean lipoxygenase-1 (Gutierrez-Lugo et al., 2004). Larvicidal activity of seeds aqueous extract (Farias et al., 2010).	Anadanthoflavone and other eleven know compounds. Anadanthoflavone was found to be active against 12-lipoxygenase (Gutierrez-Lugo et al., 2004). Farias et al.(2010) did not isolate compounds.
Fruits	As narcotic and poison (Agra et al, 2008).	Hydroalcoholic extract from fruits: Antioxidant activity and DNA protection capacities, inhibitory and synergetic effects with erythromycin against <i>S. aureus</i> (Da Silva et al, 2011, 2013a, 2013b).	Quercetin and Rutin were detected in hydroalcoholic extract from fruits.
Bark	Treatment of coughs, whooping coughs and bronchitis (Agra et al, 2008), lung inflammation, inflammations in general, cancer, blood thinner and other (Albuquerque et al, 2007).	Gum exudates: immunomodulatory and antitumor activities (Moretão et al, 2003, 2004). Healing activity of alcoholic extract (Pessoa et al., 2012). Inhibition of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm for aqueous extract and tannin fraction (Trentin et al., 2013) Anti-inflammatory and antinociceptive activities of aqueous extract (Santos et al., 2013).	ARAGAL, A complex acidic heteropolysaccharide, containing mainly galactose and arabinose residues. Probable compounds: quercetin glycosides (Pessoa et al., 2012) Proanthocyanidins (or condensed tannins) were identified from <i>A. colubrina</i> fraction (Trentin et al., 2013) Santos et al. (2013) did not isolate compounds.

Determination of antimicrobial activities

Disc diffusion method

Briefly, a sample $100 \mu\text{L}$ of microbial suspension (1.5×10^8 CFU/mL) were spread in Petri plates containing MHA, and sterile paper discs (containing $2000 \mu\text{g}$ of extracts) were added. After 18 h of incubation, the diameter of the zone of growth inhibition was examined. Dimethyl sulfoxide was used as the negative control (Bauer et al., 1966).

Minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC)

MIC was determined by the microdilution method (CLSI, 2011). A two-fold, serial dilution of the extract/fractions was prepared in Mueller-Hinton Broth (MHB) and $100 \mu\text{L}$ (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) of bacteria suspension was added. The sample initial concentration was 50 mg/mL. The samples were incubated for 24 h at 37°C . Resazurin solution (0.01%) was used as an indicator by color change visualization: any color changes from purple to pink were recorded as bacterial growth. The lowest concentration at which no color change occurred was taken as the MIC. The MIC₅₀ was defined as the MIC value capable of inhibiting 50% of the isolates. Afterwards, cultures were seeded in MHA medium and incubated for 24 h at 37°C to determine the MBC which corresponds to the minimum concentration of extract/fractions that eliminated the bacteria.

Table 2. Microorganisms provided by the Departamento de Antibióticos (UFPEA).

UFPEA	Origin	Microorganism
100	ATCC	<i>Micrococcus luteus</i>
224	ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>
396	ATCC 29665	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
86	ATCC 6633	<i>Bacillus subtilis</i>
02	ATCC 6538	<i>Staphylococcus aureus</i>
630	Nasal discharge	<i>Staphylococcus aureus</i>
663	Catheter Tip	<i>Staphylococcus aureus</i>
697	Secretion of chest drain	<i>Staphylococcus aureus</i>
679	Wound secretion	<i>Staphylococcus aureus</i>
709	Catheter Tip	<i>Staphylococcus aureus</i>
730	Nasal discharge	<i>Staphylococcus aureus</i>
733	Bone fragment	<i>Staphylococcus aureus</i>

microorganisms: *S. aureus* (UFPEA02), and some recently isolated strains of *S. aureus* (UFPEA 733, UFPEA 730, UFPEA 709, UFPEA 679, UFPEA 697, UFPEA 663 and UFPEA 630) (Table 2). All strains were provided by the Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPEA) and maintained in Mueller-Hinton agar (MHA) and stored at 4°C .

In vitro hemolytic assay

Blood (5 to 10 mL) was obtained from healthy non-smoking volunteers by venipuncture, after the obtaining a written informed consent. Human erythrocytes from citrated blood were immediately isolated by centrifugation at 1500 rpm for 10 min at 4°C . After removal of plasma and buffy coat, the erythrocytes were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and then resuspended using the same buffer and a 1% erythrocyte suspension was prepared. The hemolytic activity was tested under *in vitro* conditions. Each tube received 1.1 mL of erythrocyte suspension and 0.4 mL of extract of various concentrations (50 to $500 \mu\text{g/mL}$). The negative control was only solvent and the positive control received 0.4 mL of *Quillajasp.* saponin (0.0025%). After incubation of 60 min at room temperature, cells were centrifuged and the supernatant was used to measure the absorbance of the

Liberated hemoglobin at 540 nm. The average value was calculated from triplicate assays. The hemolytic activity was expressed in relation to saponin activity, and calculated by the following formula (Oliveira et al., 2012): Hemolytic activity (%) = $(As - Ab) \times 100 / (Ac - Ab)$; where Ab is the absorbance of the control (blank, without extract), As is the absorbance in the presence of the extract and Ac is the absorbance of the saponin solution.

Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate and results are expressed as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analysis was performed by Student's t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. The correlation indices were calculated using the Pearson coefficient (r). The concentration needed for 50% of hemolysis (HC50) was estimated using linear regression analysis.

RESULTS

This study provided a comparative analysis of the antimicrobial activity of leaves and fruits of *A. colubrina* against *S. aureus*. Our previous works have demonstrated that crude hydroalcoholic of both tissue are active against Gram-positive bacteria, such as *S. aureus* (Table 3). To identify the groups of molecules that likely participate in this inhibition, phytochemical tests were performed and the presence of tannins, flavonoids, proanthocyanidins, triterpenes and sugars were verified in the crude leaf extract of *A. colubrina* var. *cebil*. In the crude extract of the fruit, it was possible to

verify the presence of tannins and flavonoids (Table 4). The following steps for a better elucidation of this activity involved semi-fractionation of crude extracts by the cold liquid-liquid method. The MIC values for the fractions derived from the leaf ranged from 25 to 0.781 mg/mL and the MBC ranged from 3.125 to >25 mg/mL against different strains of *S. aureus* (Table 5). Of the strains tested, 62.5% were sensitive to the cyclohexane fraction (CFL) at a concentration of 1.562 mg/mL, 87.5% were sensitive to the ethyl acetate fraction (EAFL) at concentration of $\hat{O}$ 1.562 mg/mL, 57.1% were sensitive to a concentration of 0.781 mg/mL. The values of MBC were considered high in comparison with the MIC found and ranged

DISCUSSION

The choice of working with clinical strains of *S. aureus* was based on academic and medical concern. *S. aureus* is a commensal bacterium that colonizes both animal and human, which uses various strategies for persistence in the host, for example antibiotic resistance, release of virulence factors and switching to a small-colony variant phenotype (Du Toit, 2014; Powers and Wardenburg, 2014). Taken together, all these features result in the incidence of this pathogen among hospital-acquired infections (Davis et al., 2013) and make crucial the search of new anti-*S. aureus* compounds. In this study, we demonstrated for the first time, the anti-*S. aureus* activity of fractions obtained from hydroalcoholic extracts of *A. colubrina* leaves and fruits, the hemolytic action of active fractions and phytochemical analyses

Table 3. Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from *A. colubrina* leaves¹ and fruits².

Microorganism(UFPEDA)	Inhibition (mm)		MIC (mg/mL)		MBC (mg/mL)	
	HEL ¹	HEFr ²	HEL ¹	HEFr ²	HEL ¹	HEFr ²
(100) <i>Micrococcus luteus</i>	N/A ^b	17.67±0.57 ^b	N/A ^b	0.7812 ^b	N/A ^b	3.125 ^b
(224) <i>Escherichia coli</i>	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b
(396) <i>Klebsiella pneumoniae</i>	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b	N/A ^b
(86) <i>Bacillus subtilis</i>	17.33 ±1.15 ^b	13 ±1.73 ^b	6.25 ^b	1.5626 ^b	12.5 ^b	6.25 ^b
(02) <i>Staphylococcus aureus</i>	14.67 ± 0.57 ^b	14.67 ± 0.57 ^{b a}	0.7812 ^a	1.5626 ^{b a}	12.5 ^b	6.25 ^{b a}

N/A: No activity; ^a values found for Da Silva et al. (2013a) and ^b Silva et al. (2012).Table 4 .Phytochemical analysis of *Anadenanthera colubrina* var. *cebil*

Tissue	Compounds						
	Steroids	Saponins	Alkaloids	Flavonoids	Tannins	Sugar	Terpenoids
Leaves	+	-	-	+	+	+	+
Fruits	+	-	-	+	+	-	+

Table 5. Antimicrobial activity of *A. colubrina* leaf fractions.

Microorganism	Cyclohexane fraction (CFL)		Ethyl acetate fraction (EAFL)		n-Butanol fraction (NBFL)		Aqueous fraction (AFL)	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
UFPEDA02	3.125	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5	25	>25
UFPEDA630	6.25	12.5	0.78125	>25	N/A	N/A	12.5	12.5
UFPEDA663	1.5625	>25	0.78125	12.5	12.5	>25	25	>25
UFPEDA679	1.5625	>25	1.5625	12.5	25	>25	25	>25
UFPEDA697	1.5625	>25	1.5625	12.5	12.5	>25	25	>25
UFPEDA709	1.5625	3.125	0.78125	3.125	12.5	12.5	25	25
UFPEDA730	6.25	12.5	1.5625	25	N/A	N/A	N/A	N/A
UFPEDA733	1.5625	12.5	0.78125	12.5	12.5	12.5	25	25

Table 6. Antimicrobial activity of *A. colubrina* fruit fractions.

Microorganism	Cyclohexane Fraction (CFF)		Ethyl acetate fraction (EAFF)		n-Butanol fraction (NBFF)		Aqueous fraction (AFF)	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
UFPEDA02	12.5	12.5	1.5625	6.25	12.5	12.5	25	>25
UFPEDA630	25	>25	0.78125	1.5625	12.5	>25	12.5	>25
UFPEDA663	25	>25	0.78125	3.125	>25	>25	25	>25
UFPEDA679	25	>25	0.390625	12.5	12.5	>25	25	>25
UFPEDA697	25	>25	0.390625	6.25	12.5	>25	12.5	>25
UFPEDA709	12.5	>25	0.390625	12.5	3.125	>25	12.5	>25
UFPEDA730	>25	>25	0.390625	1.5625	3.125	6.25	25	25
UFPEDA733	25	>25	0.390625	6.25	12.5	25	25	>25

of these tissues. The inhibitory activity of hydroalcoholic extracts from *A. colubrina* leaves and fruits against *S. aureus* have been shown in various researches (Silva et al., 2012), including the synergism with erythromycin of hydroalcoholic extract from fruits (Da Silva et al., 2013b) and the involvement of cell wall damage in its action, which could cause the loss of viability and cell death (Da Silva et al., 2013a).

Firstly, the comparative investigation of phytochemical compounds presented in each tissue revealed that while leaves were formed by tannins, flavonoids, proanthocyanidins, triterpenes and sugars, in the fruits only tannins and flavonoids were detected. These results showed that all the tested fractions had antimicrobial activity at least for one strain, suggesting that all solvents are able to solubilize at least one kind of active compounds. However, the best results were found for ethyl acetate fractions of both tissues. This best potential

of ethyl acetate fractions could be explained by its capacity to solubilize molecules with antimicrobial properties such as tannins, leucoanthocyanidins and some groups of flavonoids. In fact, tannins and flavonoids have been indicated as active molecules in *A. colubrina* (Gutierrez-Lugo et al., 2004; Trentin et al., 2013). In addition, a close relationship were found between tannin levels of *A. colubrina* and seasonal climate changes in the caatinga (Monteiro et al., 2006), as well its ethnopharmacology uses as anti-inflammatory and healing agent (Sousa Araújo et al., 2008). Looking at the most active fractions of EAFL and EAFF in Tables 3 and 4 (smallest MIC value), we

can say that they have a tendency towards bacteriostatic behavior ($MBC/MIC > 4$), using the MBC/MIC ratio (Pankey and Sabath 2004). These fractions showed a strong correlation ($r=0.84$) in their MIC values, however, ELFF had the lowest MIC values (2-4 times) for most strains (75%).

Finally, the cellular toxicity of the most active fractions was evaluated using human erythrocytes as a test system. This assay is based on hemoglobin release caused by cell membrane damage and can also reveal some information on the involvement of the cytotoxicity mechanism (Hassan et al., 2010; Kalaivani et al., 2011). Both fractions showed low toxicity since the HC_{50} values were greater than MIC_{50} values: the ratio MIC_{50}/HC_{50} for EAFL was 3.68 and 11.61 for EAFF. These results also confirmed that EAFF have the best potential as a source of antimicrobial agents.

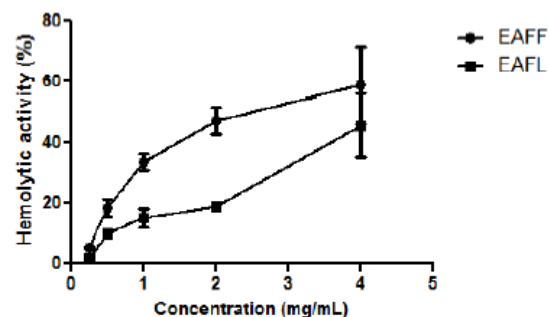


Figure 1. Hemolytic activity of ethyl acetate fractions from *A. colubrina* leaves (EAFL) and fruits (EAFF).

Conclusion

In conclusion, these data demonstrated that leaves and fruits of *A. colubrina* var. *cebilare* potential sources of molecules against *S. aureus*. For both tissues, the best results were found for ethyl acetate fraction, being EAFF the most active due

its high action and low hemotoxicity. The purification and structural characterization of active compounds of this plant is the next step of our research.

Conflict of Interests

The author(s) have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM (2008). Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 18:472-508.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS, Monteiro JM, LinsNeto EMF, Melo JG, Santos JP (2007) Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *J. Ethnopharmacol.* 114:325-354.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. CLSI.M100-S21.
- Cushnie TPT, Lamb AJ (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26:343-356.
- Da Silva LCN, Miranda RCM, Gomes B, Macedo AJ, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Dos Santos Correia MT (2013b). Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibiaferrea* and *Pityrocarpamoniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Plants Res.* 7:2358-2364.
- Da Silva LCN, Sandes JM, Paiva MM, Araújo JM, Figueiredo RCBQ, Silva MV, Correia MTS (2013a). Anti-*Staphylococcus aureus* action of three *Caatinga* fruits evaluated by electron microscopy. *Nat. Prod. Res.* 27:1492-1496.
- Da Silva LCN, Silva-Júnior CA, Souza RM, Macedo AJ, Silva MV, Correia MTS (2011). Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibiaferrea* and *Pityrocarpamoniliformis*. *Food Chem. Toxicol.* 49: 2222-2228.
- Daglia M (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:174-181.
- Davis MF, Peterson AE, Julian KG, Greene WH, Price LB, Nelson K., Whitener CJ, Silbergeld EK (2013). Household Risk Factors for Colonization with Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. *PloS one* 8: e54733.
- Du Toit A (2014). Bacterial pathogenesis: *Staphylococcus* slips through the net. *Nat. Rev. Microbiol.* 12:6-7.
- Farias DF, Cavaleiro MG, Viana MP, Queiroz VA, Rocha-Bezerra LCB, Vasconcelos IM, Morais SM, Carvalho AFU (2010). Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 82:585-594.
- Gutierrez-Lugo M T, Deschamps JD, Holman TR., Suarez E, Timmermann BN (2004). Lipxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med.* 70:263-265.

- Harborne JB (1998). *Phytochemical Methods*, London: Chapman & Hall. 60-66.
- Hassan SM, Haq AU, Byrd JA, Berhow MA, Cartwright AL, Bailey CA (2010). Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chem.* 119: 600-605.
- Kalaivani T, Rajasekaran C, Suthindhiran K, Mathew L (2011). Free radical scavenging, cytotoxic and hemolytic activities from leaves of *Acacia nilotica*(L.) Wild.ex. Delile subsp. *Indica*(Benth.) Brenan. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 274:741.
- Kokate CK (1994). *Practical Pharmacognosy*. New Delhi: VallabhPrakashan 107-113.
- Kroymann J (2011). Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14:246-251.
- Mello CMA, Silva IR, Pontes JS, Goto BT, Silva GA, Maia LC (2012). Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in an area of Caatinga, PE, Brazil. *Acta Bot. Bras.* 26:938-943.
- Monteiro JM, Albuquerque UP, LinsNeto EM, Araújo EL, Albuquerque MM, Amorim EL (2006). The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva*(Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16:338-344.
- Moretão MP, Buchi DF, Gorin PAJ, Iacomini M, Oliveira MBM (2003). Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angicobranco) on peritoneal macrophage functions. *Immunol. Lett.* 89:175-185.
- Moretão MP, Zampronio AR, Gorin PAJ, Iacomini M, Oliveira MBM (2004). Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angicobranco). *Immunol. Lett.* 93:189-197.
- Newman DJ, Cragg GM (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75:311-335.
- Oliveira YLC, Nascimento da Silva LC, Silva AG, Macedo AJ, Araújo JM, Correia MTS, Silva MVD (2012). Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Buchenaviatetraphylla*(Aubl.) RA Howard (Combretaceae: Combretoidae). *Sci. World J.* 1-6.
- Palmeira JD, Ferreira SB, Souza JHD, Almeida JMD, Figueiredo MC, Pequeno AS, Arruda TA, Antunes RMP, Catão RMR (2010). Evaluation of the antimicrobial activity in vitro and determination of minimum the inhibitory concentration (MIC) of hidroalcoholic extracts of angico in strains *Staphylococcus aureus*. *Rev. Bras. Anal. Clin* 42:33-37.
- Pankey GA, Sabath LD (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 38:864-870.
- Pessoa WS, Estevão LRM, Simões RS, Barros MEG, Mendonça FS, Baratella-

- Evêncio L, Evêncio-Neto J (2012). Effects of angico extract (*Anadenanthera colubrina* var. *cebil*) in cutaneous wound healing in rats. *Acta Cir Bras.* 27:665-670.
- Powers ME, Wardenburg JB (2014). Igniting the Fire: *Staphylococcus aureus* Virulence Factors in the Pathogenesis of Sepsis. *Plos Pathog.* 10:e1003871.
- Queiroz LP (2009). Legumes of the Caatinga. Royal Botanic Garden Edinburgh. 443 pp.
- Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. *Int. J. Med. Microbiol.* 303:293-297.
- Santos JS, Marinho RR, Ekundi-Valetim E, Rodrigues L, Yamamoto MH, Texeira SA, Muscara MN, Costa SK (2013). Beneficial effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan extract on the inflammatory and nociceptive responses in rodent models. *J. Ethnopharmacol.* 148:218-222.
- Silva AG, Silva LCN, Macedo CBF; Araujo DRC, Silva JFV, Arruda IR, Araújo JM, Baumvol IJR, Macedo AJ, Correia MTS, Silva MV (2012). Antimicrobial activity of medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil. *Curr.Top. Phytochem.* 11:81-94.
- Soldati GT, de Albuquerque UP (2010). Impact assessment of the harvest of a medicinal plant (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan) by a rural semi-arid community (Pernambuco), northeastern Brazil. *Int. J. Biodivers. Sci. Ecosyst. Serv. Manage.* 63:106-118.
- Sousa Araújo TA, Alencar NL, de Amorim ELC, de Albuquerque UP (2008). A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 120:72-80.
- Trentin DS, Silva DB, Amaral MW, Zimmer KR, Silva MV, Lopes NP, Giordani RB, Macedo AJ (2013). Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *Plos One* 8:66257.
- World Health Organization (WHO) (2012). The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. 978 92 4 150