

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA "IN VITRO" DE EXTRATOS VEGETAIS DE BRIÓFITAS CONTRA MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

EVALUATION OF THE "IN VITRO" ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF BRYOPHYTE PLANT EXTRACTS AGAINST CLINICALLY IMPORTANT MICROORGANISMS

DOI: 10.16891/2317-434X.v12.e3.a2024.pp4277-4286

Recebido em: 15.05.2024 | Aceito em: 15.07.2024

Francinete Sousa de Oliveira^{a*}, Wenderson Costa da Silva^a, Francisléia Falcão França Santos Siqueira^a, Antônia Fernanda Lopes da Silva^a, Márcio Leonardo de Moraes Nobre^b, Fátima Maria de Sousa Pereira^c, Hemerson Cassiano de Oliveira^d, Francisco Laurindo da Silva^a

Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Caxias – MA, Brasil^a

Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina – PI, Brasil^b

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA, São Luís – MA, Brasil^c

Universidade Estadual do Piauí – UESPI, Teresina – PI, Brasil^d

***E-mail: fransouoliveira@gmail.com**

RESUMO

Especialmente nas últimas décadas, inúmeros esforços têm sido dirigidos para conferir às plantas seu real papel e valor na terapia antimicrobiana. Neste estudo avaliou-se a atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto de *Octoblepharum albidum*, *Groutiella tomentosa*, *Marchesinia brachiata* in vitro contra cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Nas espécies botânicas estudadas, também se investigou os potenciais constituintes bioativos; identificou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), pelo método de microdiluição em caldo com placas de 96 poços, a fim de demonstrar a atividade bactericida e/ou bacteriostática dos extratos. Os resultados da análise fitoquímica de *G. tomentosa* identificaram a presença de triterpenoides pentacíclicos livres e saponinas, para *O. albidum* mostrou-se a presença de esteroides e alcaloides e para *M. brachiata* constatou-se a presença de taninos condensados e esteroides. Concluiu-se que os extratos etanólicos brutos de *G. tomentosa* e *M. brachiata* apresentaram efeito bactericida para a cepa de *K. pneumoniae* na concentração de 4.000 µg/mL, enquanto que para *O. albidum* não ocorreu atividade bactericida contra as cepas utilizadas no estudo. Considerou-se assim, os resultados encontrados, significativos para a continuidade investigativa.

Palavras-chave: Biotecnologia; Bactérias; Produtos Bioativos.

ABSTRACT

Especially in recent decades, numerous efforts have been directed towards giving plants their real role and value in antimicrobial therapy. In this study, the antibacterial activity of the crude ethanolic extract of *Octoblepharum albidum*, *Groutiella tomentosa*, *Marchesinia brachiata* in vitro against strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was evaluated. For the botanical species studied, it was also proposed to: investigate potential bioactive constituents; identify the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), using the broth microdilution method with 96-well plates and demonstrate the bactericidal and/or bacteriostatic activity of the extracts. The results of the phytochemical analysis of *G. tomentosa* identified the presence of free pentacyclic triterpenoides and saponins, for *O. albidum* it showed the presence of steroids and alkaloids and for *M. brachiata* it was found the presence of condensed tannins and steroids. It can be concluded that the crude ethanolic extracts of *G. tomentosa* and *M. brachiata* presented a bactericidal effect against the *K. pneumoniae* strain at a concentration of 4,000 µg/mL, while for *O. albidum* there was no bactericidal activity against the strains used in the study. Considering this, the results found are significant for the continuity of the investigation.

Keywords: Biotechnology; Bacteria; Bioactive Products.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antibióticos configura-se como um dos maiores desafios relacionados à saúde pública (SILVA; NOGUEIRA, 2021), pois, gera consequências clínicas e econômicas mediante a redução de cura, o que eleva os custos com tratamentos e a taxa de mortalidade (PEREIRA; ZAMBERLAM, 2020).

Desta maneira, tem-se a necessidade da busca e desenvolvimento de novos compostos com atividade antimicrobiana (SOUZA; DIAS; ALVIM, 2022; CLEMENTINO *et al.*, 2015). Assim, a utilização de extratos vegetais é uma alternativa promissora ao tratamento de doenças ocasionadas por microrganismos, especialmente, infecções bacterianas (SILVA; NOGUEIRA, 2021; FERREIRA *et al.*, 2020).

Muitas cepas bacterianas são altamente resistentes aos tratamentos disponíveis, como exemplo são citados *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (PIÑA; HINOSTROZA, 2021; LAM *et al.*, 2021). *Escherichia coli* resistente aos beta-lactâmicos e *Pseudomonas aeruginosa* que produzem β -lactamases e/ou carbapenemases de espectro estendido (ESBL) (ZOU *et al.*, 2022; GUO *et al.*, 2020).

Neste contexto, é relevante o incentivo de pesquisas que busquem a atividade antibacteriana a partir de compostos vegetais para estas e outras espécies patogênicas (ROCHA; NOBRE; FREITAS, 2023). Assim, estudos com esse tema, em sua grande maioria, concentram-se em espécies botânicas pertencentes as angiospermas e raras são as pesquisas biotecnológicas que visam identificar substâncias bioativas em briófitas (DZIWAK *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2018).

Trata-se de um potencial ainda ignorado por uma parte significativa da comunidade científica (MORALES-SÁNCHEZ *et al.*, 2022; HORN *et al.*, 2021). Mesmo dispondo de vasta biodiversidade de briófitas, ensaios que busquem avaliar a atividade biológica destas espécies botânicas raramente são desenvolvidos no país, restringem-se a regiões da Europa e Ásia (MIRANDA *et al.*, 2022; KLEGIN *et al.*, 2023).

Nestas plantas foram identificadas grandes quantidades de metabólitos secundários (alcalóides, flavonóides, terpenóides, benzenóides) com bioatividade antibacteriana, antiviral, antifúngica, citotóxica entre outras (ASAKAWA; LUDWICZUK; NAGASHIMA, 2013; HORN *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2018).

Todas essas características fazem das briófitas um

grupo de plantas com alto potencial para a descoberta de produtos naturais desejáveis e passíveis de ferramentas biotecnológicas (CIANCIULLO *et al.*, 2021). Diante desse contexto, este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto de *Octoblepharum albidum*, *Groutiella tomentosa*, *Marchesinia brachiata* in vitro contra cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e identificação do material vegetal

As espécies botânicas foram coletadas nas referidas áreas: *O. albidum*, o local de coleta foi o município de Caxias, Maranhão, Brasil, no mês de setembro de 2022 (Latitude: 4° 52' 29" Sul, Longitude: 43° 20' 49" Oeste); *G. tomentosa*, coletada em julho de 2022 e *M. brachiata*, coletada em fevereiro de 2023, ambas no município de Ubajara, Ceará, Brasil (Latitude: 3° 51' 29" Sul, Longitude: 40° 55' 39" Oeste). As plantas foram identificadas no Herbário de Criptógamas da Universidade Estadual do Piauí (HUESPI) - Campus Heróis do Jenipapo - Campo Maior, Piauí. As exsiccatas foram depositadas no Herbário Professor Aluizio Bittencourt (HABIT) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), com os respectivos números de registros 4557, 4559 e 4560. Essa pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), sob os números de cadastro AB97AFE, AF49923 e A049B15.

Obtenção dos extratos vegetais

O extrato etanólico bruto (EEB) foi obtido pelo processo de maceração estática a frio. O material vegetal foi sanitizado em hipoclorito de sódio 2,5%, lavado em água corrente e destilada e, posto para secar em temperatura ambiente. Após secagem, o material vegetal foi solubilizado (100g de cada espécie) em 1000 ml de etanol 99% (álcool etílico absoluto PA ACS, C₂H₆O/99,8%, Dinâmica®), acondicionado em potes de vidro e mantido em temperatura ambiente por um período de quinze dias ao escuro. Decorrido este período passou pelo processo de filtração em papel filtro e, a remoção do solvente para a obtenção do extrato foi realizada em estufa, sob temperatura constante à 45° (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

Diluição dos extratos

Obtido o EEB seco, foi aferida a massa de 0,16 mg de extrato, sendo então avolumado em 2 ml do diluente DMSO à 3%, assim se obteve uma concentração final de 8000 mg/ml de extrato (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015). A proporção de Dimetilsulfóxido (DMSO), utilizada foi abaixo de 5%, sendo considerado não tóxico para os microrganismos testados (KOCIS; HARKAWAY; SNYDER, 1975).

Culturas microbianas

Foram utilizadas cepas bacterianas padronizadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC), cujo as quais foram: *K. pneumoniae* ATCC 13883, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923. As cepas bacterianas foram ativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Kasvi), onde foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 h a $36 \pm 1^\circ \text{C}$ (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015). Após esse período, os microrganismos foram semeados em *Tryptic Soy Agar* (TSA, Kasvi) por 24 h a $36 \pm 1^\circ \text{C}$. (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015). As cepas bacterianas foram mantidas em repiques sucessivos em meio de cultura ágar TSA durante os ensaios in vitro.

Padronização da suspensão bacteriana

Foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em solução salina estéril a 0,85%, até atingir turvação igual a suspensão do tubo 0,5 da escala de McFaland (1×10^8 UFC/ml) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015). Na sequência, foi retirado 34 μl do inóculo padronizado e transferido para um tubo de ensaio contendo 4,966 ml do caldo BHI duplo, e assim se obteve a solução de inóculo 10^5 UFC/ml por poço (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) é definida como a concentração mais baixa dos extratos vegetais sem crescimento bacteriano visível (BONA *et al.*, 2014). A CIM foi realizada segundo a metodologia de

microdiluição em caldo, em placas de acrílico com 96 poços, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

A execução do ensaio se iniciou com a distribuição de 100 μL de BHI previamente inoculado nos poços da placa de microdiluição, em seguida, 100 μL do extrato foi adicionado aos poços da linha A, homogeneizou-se e retirou-se 100 μL de cada poço da linha A para a linha B e, assim sucessivamente, até os poços da linha G, do qual foi retirado 100 μL e descartados (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015). Assim, foram realizadas sete diluições seriadas e em triplicata, obtendo-se concentrações variando de 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015).

Realizaram-se também os seguintes controles: controle negativo (meio de cultura, DMSO e inóculo); controle positivo (meio de cultura, antibiótico ciprofloxacina e inóculo); controle de crescimento (meio de cultura com inóculo e sem antibiótico ou extrato) e controle de esterilidade (BHI sem inóculo e extratos vegetais). Após inoculadas, as placas foram incubadas e atingindo o tempo de incubação (37°C por 24h), ocorreu a leitura a olho nu das mesmas.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Foi determinada utilizando placas de Petri contendo o meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA). Realizaram-se semeaduras de todos os poços onde o extrato permaneceu límpido, para que se possa afirmar a ação do extrato (NEWTON *et al.*, 2000). Essas placas foram incubadas por aproximadamente 37°C por 24h. Para interpretação dos resultados consideraram-se os seguintes critérios: crescimento dos microrganismos no meio de cultura significou ação bacteriostática; ausência de crescimento de micro-organismos no meio de cultura significou ação bactericida (NEWTON *et al.*, 2000).

Análise fitoquímica

A prospecção fitoquímica de metabólitos secundários no extrato etanólico bruto de *O. albidum*; *G. tomentosa*; *M. brachiata*, realizou-se de acordo com reações qualitativas de precipitação e coloração em tubo de ensaio, segundo Matos (2009). A presença de taninos,

esteróides, triterpenóides, saponinas e alcaloides foi investigada. Todos os testes foram realizados em tubos de ensaio contendo 2mL de cada extrato etanólico bruto, em triplicata. Como controle, foi utilizada água destilada no lugar do extrato.

Para o teste de tanino, 150µL de cloreto férrico (FeCl₃, 5%) foram adicionados aos tubos e agitados em vórtex (Coleman) por 5s; a presença de taninos hidrolisáveis é indicada pelo aparecimento de precipitado azul e taninos condensados em precipitado verde.

Para testar esteróides e triterpenóides realizou-se a reação de Lieberman-Burchard. Em 2 mL do extrato adicionaram-se 3 mL de clorofórmio (CHCl₃, PA), 2 mL de anidrido acético (C₄H₆O₃) e 150µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), de forma cuidadosa, agitada repetidamente e observando o aparecimento de coloração; o aparecimento de cor azul seguido de verde permanente indica a presença de esteroides livres, enquanto o azul seguido de vermelho indica triterpenóides pentacíclicos livres.

Para os testes de saponina, foram adicionados 2mL de clorofórmio (CHCl₃) e 5 mL de água destilada, agitando em vórtex por 3 min; a formação de

espuma persistente indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

No teste de alcaloides, foram adicionados 3 mL de ácido clorídrico (HLC) 10% e aquecido por 10 minutos a 100±1,0°C. Logo após, o extrato foi resfriado à temperatura ambiente. Nos tubos de ensaio foram inseridas 250µL do reativo de Wagner (1,27 g de I₂ (iodo) e 2g de iodeto de potássio (KI) diluído em 5 mL de água destilada, completando-se para 100 mL). Homogeneizando-se manualmente por 1 minuto (Kloss *et al.*, 2016). Uma leve turbidez ou precipitado se forma no fundo do tubo, apresentando coloração (roxa e alaranjada, ou branco, creme e marrom) evidenciando a presença de compostos alcaloides.

RESULTADOS

Análise fitoquímica

A prospecção fitoquímica das classes de metabólitos secundários das espécies botânicas *O. albidum*, *G. tomentosa* e *M. brachiata* seguem apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Triagem fitoquímica do extrato etanólico bruto de *Octoblepharum albidum*, *Groutiella tomentosa*, *Marchesinia brachiata*.

Extrato Etanólico Bruto	Compostos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Octoblepharum albidum</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Groutiella tomentosa</i>	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Marchesinia brachiata</i>	-	+	-	-	-	-	+	-

Reação: Presente (+); Ausente (-); 1 = Taninos hidrolisáveis; 2 = Taninos condensados; 3 = Fenóis; 4 = Flavonoides; 5 = Triterpenoides pentacíclicos livres; 6 = Saponinas; 7 = Esteroides; 8 = Alcaloides.

Para a espécie *Octoblepharum albidum* o estudo fitoquímico qualitativo indicou por meio das reações características do EEB a presença de esteroides e alcaloides. Para o EEB de *Groutiella tomentosa*, constatou-se a presença de triterpenoides pentacíclicos livres e saponinas. Para a espécie botânica *Marchesinia brachiata* identificou-se a presença de taninos e esteróides.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os valores de CIM (expressas em µg/mL) dos extratos de *O. albidum*, *G. tomentosa* e *M. brachiata*, obtidos a partir de testes antibacterianos usando o método de microdiluição em caldo seguem apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores da Concentração Inibitória Mínima CIM ($\mu\text{g/mL}$), do extrato etanólico bruto das espécies *O. albidum*, *G. tomentosa*, *Marchesinia brachiata*.

Bactérias	Espécies botânicas		
	<i>O. albidum</i> CIM ($\mu\text{g/mL}$)	<i>G. tomentosa</i> CIM ($\mu\text{g/mL}$)	<i>M. brachiata</i> CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	-	4.000	4.000

Reação: Ausente (-)

Os resultados dos testes realizados com o EEB das espécies *O. albidum*, *G. tomentosa*, *M. brachiata*, contra as cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, mostraram que a *K. pneumoniae* foi a única cepa que sofreu ação bactericida aos extratos vegetais de *G. tomentosa* e *M. brachiata* na concentração de 4.000 $\mu\text{g/mL}$. A espécie botânica *O. albidum*, não proporcionou atividade bactericida ou bacteriostática nas cepas bacterianas utilizadas neste estudo.

Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O estudo evidenciou que a única cepa que sofreu efeito bactericida a ação dos extratos foi a *K. pneumoniae*, nas concentrações de 4.000 $\mu\text{g/mL}$, para o EEB das espécies botânicas *G. tomentosa* e *M. brachiata*. O EEB de *O. albidum*, não ocasionou efeito bactericida ou bacteriostático nas cepas bacterianas utilizadas neste estudo, em nenhuma das concentrações realizadas.

DISCUSSÃO

Os resultados indicaram que *K. pneumoniae*, foi a cepa que apresentou sensibilidade ao efeito dos EEB de *G. tomentosa* e *M. brachiata*, ambos na CIM de 4.000 $\mu\text{g/mL}$, com atividade bactericida. O efeito bactericida do extrato de *G. tomentosa* contra a cepa de *K. pneumoniae* pode estar relacionado com a identificação de compostos como triterpenóides pentacíclicos livres e saponinas, na triagem fitoquímica qualitativa.

Os triterpenóides pentacíclicos livres, normalmente apresentam atividade bactericida, esse efeito pode estar relacionado com a presença de um grupo oxigenado em C3, onde 95% dos triterpenos bactericidas apresentam essa funcionalidade (Kadam, 2017). Esse grupo oxigenado pode ser um hidroxilo, carbonila,

glicosídeo, éster (principalmente acetil), ou hidroxilamina (PACHECO; ALCÂNTARA; CORREA, 2012).

É defendido que, devido ao caráter hidrofóbico dos hidrocarbonetos, o principal local de ação é a membrana celular (SIKKEMA; BONT; POOLMAN, 1994). Os hidrocarbonetos acumulam-se na bicamada lipídica e o resultado desse efeito na membrana biológica é a alteração da estrutura e função da mesma, assim a atividade da enzima citocromo c oxidase é reduzida e a permeabilidade aos prótons aumenta (MACHLEIDT; ROTH; SEEMAN, 1972). O acúmulo de compostos lipofílicos na área da superfície da membrana contribui para o aumento de sua área, uma vez que ocorre aumento na cadeia de carbono (TOKUYAMA *et al.*, 2001).

Quanto a possível influência das saponinas na atividade bactericida contra a cepa de *K. pneumoniae* no extrato EEB de *G. tomentosa*, pode ser explicada pelas propriedades semelhantes a detergentes existentes neste composto (SEM *et al.*, 1998). As saponinas, são compostos naturais de um grupo diverso geralmente formadas por açúcar (glicona) e uma parte não açucarada (aglicona) ligados por uma ligação glicosídica (ZAYNAB *et al.*, 2021; JACOB; FAVRE; BENSA, 1991). A parte aglicona também é chamada de sapogeninas, que podem ser esteroides (C27) ou triterpenóides (C30) que é ligada a uma ou mais porções de glicona que podem ser hexoses e pentoses (WEI *et al.*, 2021; LEUNG *et al.*, 1997).

As saponinas perturbam a permeabilidade das células bacterianas pela ligação à membrana externa, ou seja, elas aumentam a permeabilidade da membrana celular bacteriana, o que facilita o influxo de compostos com atividade antibacteriana através da membrana da parede celular da bactéria (LI; MONJE-GALVAN, 2023; KHAN *et al.*, 2018).

O EEB de *M. brachiata*, apresentou efeito bactericida contra a cepa *K. pneumoniae* com CIM de

4.000 µg/mL e o estudo de seus constituintes fitoquímicos identificaram a presença de taninos condensados e esteroides, ambos os compostos já comprovaram atividade antibacteriana em espécies de briófitas (KADAM, 2017).

A atividade antibacteriana dos taninos já foi comprovada em bactérias gram-positivas e gram-negativas (KACZMAREK, 2020). Alguns tipos de taninos visam principalmente a membrana externa de bactérias gram-negativas (BOAKYE *et al.*, 2016). Os lipopolissacarídeos, os principais componentes da membrana externa, conferem resistência antibiótica às bactérias gram-negativas (FARHA *et al.*, 2020). As proantocianidinas são capazes de se ligar a lipopolissacarídeos e desestabilizar a integridade da membrana externa (DELEHANTY *et al.*, 2007). Assim, os taninos podem interagir com as membranas das células bacterianas para mediar efeitos antibacterianos afetando o potencial de membrana ou aumentando a sua permeabilidade, vão interferir na síntese da parede celular, tornando as bactérias mais suscetíveis à lise osmótica (DONG *et al.*, 2018; TRENTIN *et al.*, 2013).

A atividade antibacteriana atribuída aos esteroides, pode estar relacionada ao envolvimento com a ruptura de compostos lipofílicos das membranas microbianas (FABRI; COSTA, 2012).

Os extratos vegetais de *G. tomentosa* e *M. brachiata*, mostraram ser mais eficazes contra a cepa de *K. pneumoniae*, no entanto a CIM encontrada utilizando o método de microdiluição em caldo não é considerada satisfatória conforme a abordagem de alguns autores. Para Holetz *et al.* (2002), extratos vegetais que apresentam atividade antimicrobiana em concentrações acima de 500 µg/mL possuem fraca atividade, sendo de difícil aproveitamento farmacêutico no tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas, enquanto para Aligiannis *et al.* (2001) e Lambert *et al.* (2011), concentrações acima de 1000 µg/mL surtem este mesmo efeito. De outra maneira, Webster *et al.* (2008) consideraram que quaisquer concentrações menores de 1.000 µg/mL são consideradas satisfatórias.

Mesmo identificando CIM considerada elevada pela literatura, isso não exclui a possibilidade de aproveitamento do extrato pela indústria farmacêutica, visto que o estudo realizado avalia o extrato vegetal bruto de espécies botânicas, onde o possível isolamento desses compostos através de uma cromatografia de alta eficiência, pode oferecer um resultado mais efetivo e em concentrações mais baixas.

O EEB de *O. albidum*, neste estudo não apresentou atividade bactericida ou bacteriostática entre os microrganismos testados nas concentrações que variaram entre 4.000 e 62,5 µg/mL, mesmo constatando a presença de compostos com atividade antibacteriana, esteroides e alcaloides na triagem fitoquímica qualitativa. Entretanto, no trabalho de Vidal *et al.* (2012), ao utilizar cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*, com a mesma espécie botânica, este encontrou atividade antibacteriana com CIM de 512 µg/mL, para ambos os microrganismos.

Vale lembrar, que a ação dos extratos vegetais pode ser influenciada por alguns fatores. Um deles é a técnica e o solvente utilizados para a extração dos metabólitos secundários, visto que alguns solventes conseguem extrair compostos específicos em relação a outros como exemplo o álcool, que consegue realizar a extração de taninos, terpenoides, polifenóis, poliacetilenos, esteróis, alcaloides e os flavonoides presentes nas plantas, compostos já conhecidos por sua atividade antimicrobiana (KARABEGOVIĆ *et al.*, 2014; BAMPOULI *et al.*, 2014).

Fatores ambientais que envolvem a temperatura, umidade, pluviosidade, solo, dentre outros vão influenciar na produção de metabólitos secundários nas plantas, pois dependendo da necessidade, a demanda por metabólitos tende a aumentar muitas vezes, como mecanismo de defesa contra algum patógeno ou diminuir, para evitar a perda de determinados nutrientes (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2009; BECHO *et al.*, 2009).

A comprovação da atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae*, uma cepa gram-negativa, demonstrou ser um resultado significativo, já que bactérias gram-positivas são mais susceptíveis aos produtos naturais (SILVA *et al.*, 2007). Bactérias Gram-negativas apresentam particularidades estruturais que dificultam a penetração de antibióticos, como estruturas lipopolissacarídicas contendo polissacarídeos de diferentes comprimentos que contribuem amplamente para as propriedades da superfície celular, como permeabilidade de membrana e suscetibilidade a antibióticos (YOKOTA; FULLII, 2007).

Dessa forma, esse achado pode ser considerado relevante, já que a resistência de *K. pneumoniae* ao tratamento de último recurso (antibióticos carbapenêmicos) se disseminou para todas as regiões do mundo. Esta cepa tem apresentado um grande desafio para a medicina moderna (BRITO; TREVISAN, 2021). Em alguns países, os antibióticos carbapenêmicos não funcionam em mais da metade dos pacientes tratados para

infecções por *K. pneumoniae* devido à resistência (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021).

CONCLUSÃO

Os dados do presente estudo demonstraram que os extratos de *G. tomentosa* e *M. branchiata* apresentaram compostos bioativos com atividade bactericida contra *k. pneumoniae*.

Esses achados são promissores para investigações futuras focadas no isolamento dos metabólitos secundários envolvidos, com o objetivo de aumentar sua eficácia

antimicrobiana e compreender melhor seus mecanismos de ação.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pela concessão da bolsa, a Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias, Brasil, ao Instituto Federal do Maranhão (IFMA), Caxias, Brasil, e em especial aos Laboratórios de Microbiologia e Química, pelo suporte técnico na obtenção dos extratos vegetais e nos testes de suscetibilidade in vitro.

REFERÊNCIAS

ALIGIANNIS, N. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J Agric Food Chem**, v. 49, n° 9, p. 4168-79, 2001.

ASAKAWA, Y.; LUDWICZUK, A.; NAGASHIMA, F. Phytochemical and Biological Studies of Bryophytes. **Phytochemistry**, v. 91, p. 52–80, 2013.

BAMPOULI, A. *et al.* Comparison of different extraction methods of *Pistacia lentiscus* var. *chia* leaves: Yield, antioxidant activity and essential oil chemical composition. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 1, n° 3, p. 81-91, 2014.

BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; MARHA, M.O. Estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista interdisciplinas de estudos experimntais**, 2009.

BONA, E.A.M. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Pharmacology Scientific Article**, v. 81, n° 3, p. 218-225, 2014.

BOAKYE, Y.D.; AGYARE, C.; HENSEL, A. Anti-infective Properties and time-kili kinetics of *Phyllanthus muellerianus* and its major constituent, geraniin. **Medicinal Chemistry: Current Research**, v. 6, p. 95-104, 2016.

BRITO, G.B.; TREVISAN, M. O uso indevido de antibióticos e o eminente risco de resistência bacteriana. **Revista Artigos .Com**, v. 30, 2021.

CHEN, F. *et al.* Terpenoid secondary metabolites in bryophytes: chemical diversity, biosynthesis and biological functions. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 37, n° 18, 2018.

CIANCIULLO, P. *et al.* Antioxidant and Antibacter ia l Properties of Extracts and Bioactive Compounds in Bryophytes. **Applied Sciences**, v. 12, n° 1, 2021.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performace Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Pensiyvania, 2015.

CLEMENTINO, L.C. *et al.* Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga. **Evidência**, v. 15, n° 1, p. 37-56, 2015.

DELEHANTY, J.B. *et al.* Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1718–1724, 2007.

DONG, G. *et al.* Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against. *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, v. 32, p. 1313-1320, 2018.

- DZIWAK, M. *et al.* Modern Use of Bryophytes as a Source of Secondary Metabolites. **Agronomy**, v. 12, n° 6, 2022.
- FARHA, A.K. *et al.* Tannins as an alternative to antibiotics. **Food Biocience**, v. 38, 2020.
- FABRI, R.L.; COSTA, J. A. B. M. Perfil farmacognóstico e avaliação das atividades citotóxica e antibacteriana de *Bromelia antiacantha* Bertol. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 2, p. 37-48, 2012.
- FERREIRA, M.J.G. *et al.* Avaliação de plantas medicinais como potenciais aditivos antimicrobianos alimentares. **Research, Society and Development**, v. 9, n° 5, 2020.
- GUO, Y. *et al.* Prevalence and therapies antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** v. 10, 2020.
- HORN, A. *et al.* Natural product from bryophytes: from basic biology to biotechnological applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 40, n° 3, p. 191-217, 2021.
- HOLETZ, F.B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2002.
- JACOB, M.C.; FAVRE, M.; BENZA, J. Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. **Cytometry**, v. 12, n° 6, p. 550-558, 1991.
- KACZMAREK, P. Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials- A Minireview. **Materials**, v. 13, n° 14, 2020.
- KACZMAREK, P. Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials—A Minireview. **Materials**, v. 13, n° 14, 2020.
- KADAM, P.S. Phytochemical screening and antibacterial activity of bryophytes. **Int. J. of Life Sciences**, v. 5, n° 3, p. 405-408, 2017.
- KARABEGOVIĆ, I.T. *et al.* The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 142-148, 2014.
- KHAN, M. I. *et al.* Green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of gram positive and gram negative bacteria, a comprehensive study in vitro in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1-12, 2018.
- KLEGIN, C. *et al.* Briologia aplicada: estudo antibacteriano de musgos (Bryophyta) sob a ótica da cienciometria. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 22, n° 2, 2023.
- KLOSS, L. C. Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE). South American Journal of Clinical and Technological, v. 3, n° 2, p. 118-128, 2016.
- KOCSIS, J. J.; HARKAWAY, S.; SNYDER, R. Biological effects of the metabolites of Dimethyl Sulfoxide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 243, n° 1, p. 104-109, 1975.
- LAM, M.M.C. *et al.* A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. **Nature Communications**, v. 12, 2021.
- LAMBERT, M.L. *et al.* Clinical outcomes of health-care-associated infections and antimicrobial resistance in patients admitted to European intensive-care units: a cohort study. Infectious diseases. **Lancet Infect. Dis.** v. 11, n° 1, p. 30-8, 2011.
- LEUNG, Y.; OU, Y.; KWAN, C.; LOH, T. Specific interaction between tetrandrine and Quillaja saponins in promoting permeabilization of plasma membrane in human leukemic HL-60 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1325, n° 2, p. 318-328, 1997.
- LI, J.; MONJE-GALVAN, V. Effect of glycone diversity on the interaction of triterpenoid saponins and lipid bilayers. **ACS Applied Bio Materials**, 2023.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3° ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

- MACHLEIDT, H.; ROTH, S.; SEEMAN, P. The hydrophobic expansion of erythrocyte membranes by the phenol anesthetics. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 255, n° 1, p. 178-189, 1972.
- MIRANDA, T. C. *et al.* Atividade antifúngica em briófitas: um estudo cienciométrico. **Research, Society and Development**, v. 11, n° 4, 2022.
- MORALES-SÁNCHEZ, J. A. *et al.* Desiccation-rehydration measurements in bryophytes: current status and future insights. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n° 13, p. 4338-4361, 2022.
- NEWTON, S. M.; LAU, C.; WRIGHT, C. W. **A review of antimycobacterial natural products**. West Yorkshire, 2000.
- OLIVEIRA, M.; PEREIRA, K. D. S. S.; ZAMBERLAM, C. R. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de antibióticos: uma questão de saúde pública. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciência e Educação**, v. 6, n° 11, 2020.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Antimicrobial resistance**. WHO, 2021. Disponível em:< SA>. Acesso em: 01, març. 2023.
- PACHECO, A. G.; ALCÂNTARA, A. F. C.; CORRÊA, G.M. **Relationships between Chemical structure and activity os triterpenes Against Gram-positive and Gram-negative bacteria**. Disponível em: < <https://www.intechopen.com/chapters/39251>>. Acessado em 26 de março de 2023.
- PIÑA, L. M. P.; HINOSTROZA, K. A. A. Mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* en América Latina. **Revista de Investigación em Salud**, v. 4, n° 11, 2021.
- ROCHA, B. S.; NOBRE, J. C. N.; FREITAS, A. D. G. Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos da *Tradescantia zebrina* Heynh. **Revista Foco**, v. 16, n° 2, 2023.
- SOUZA, J. F.; DIAS, F. R.; ALVIM, H. G. O. Resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 5, n° 10, 2022.
- SEN, S. *et al.* Effect of Quillaja saponaria saponins and Yucca schidigera plant extract on growth of *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n° 1, p. 35–38, 1998.
- SILVA, L. O. P.; NOGUEIRA, J. M. R. Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, n° 1, p. 21-27, 2021.
- SILVA JUNIOR, I.E. *et al.* Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2009.
- SILVA, J. G. *et al.* Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognesia**, v. 17, n° 4, 2007.
- SIKKEMA, J.; BONT, A.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n° 11, p. 8022-8028, 1994.
- TOKUYAMA, R. *et al.* Structure-activity relationship (SAR) studies on oxazolidinone antibacterial agents. 2. Relationship between lipophilicity and antibacterial activity in 5-thiocarbonyl oxazolidinones. **Chen Pharm Bull**, v. 49, n° 4, p. 353- 360, 2001.
- TRENTIN, D. S. *et al.* Tannis possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **Plas One**, 8, e66257, 2013.
- VIDAL, C.A.S. *et al.* Phytochemical screening and synergistic interactions between aminoglycosides, selected antibiotics and extracts from the bryophyte *Octoblepharum albidum* hedw (calymperaceae). **Arch. Biol. Sci., Belgrade**, v. 64, n° 2, p. 465-470, 2012.
- WEI, M. P. *et al.* Antibacterial activity of *Sapindus* saponins against microorganisms related to food hygiene and the synergistic action mode of sapindoside A and B against *Micrococcus luteus* in vitro. **Food Control**, v. 130, 2021.
- WEBSTER, D. *et al.* Antifungal activity of medicinal plants extracts; preliminary screening studies. **J. Ethnopharmacol**, v. 115, n° 1, p. 140-146, 2008.

YOKOTA, S.; FUJII, N. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n° 2, 2007.

ZAYNAB, M. *et al.* Saponin toxicity as key player in plant defense against pathogens. **Toxicon**, v. 193, p, 21-27, 2021.

ZOU, X. *et al.* Systematic strategies for developing phage resistant *Escherichia coli* strains. **Nature Communications**, v. 13, n° 4491, 2022.