

AValiação ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DA *CNIDOSCOLUS QUERCIFOLIUS* POHL

Antônio Carlos Santos Rocha Júnior (1); Cayque de Souza Farias (2); Genil Dantas Oliveira (3); Geovana Ferreira Guedes Silvestre (4) Zilka Nanes Lima (5)

- 1- *Graduando em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, antoniojunior.eng@gmail.com;*
- 2- *Graduando em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, cayque.farias@hotmail.com;*
- 3- *Graduando em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, genildantasoliveira@gmail.com*
- 4- *Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba, geovana_guedes@hotmail.com;*
- 5- *Professora Orientadora, Universidade Estadual da Paraíba, zilkananeslima@gmail.com*

Resumo: A caatinga é uma região que apresenta uma infinidade de espécies de plantas em sua flora, a maioria delas ainda não estudada o suficiente para embasar cientificamente o uso de determinadas espécies na medicina popular. *Cnidoscopus quercifolius* pohl, também conhecida como “faveleira” é uma Euphorbiaceae empregada no tratamento de doenças infecciosas e ferimentos. Apesar desta espécie fazer parte da medicina popular, existem poucos estudos científicos que comprovam a sua utilização para o tratamento de doenças, sendo assim, neste trabalho foi realizado o método de perfuração em ágar Mueller Hinton (MH) para verificar o potencial antibacteriano do extrato acetato de etila da faveleira, utilizando como controles positivos e negativos a amicacina, um antibiótico conhecido clinicamente e o Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10%, respectivamente. As cepas testadas foram: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, todas cepas ATCC (American Type Culture Collection). Os testes foram realizados em triplicata, fazendo uso de 12 placas de Petri, contendo 57,2 mL de Ágar MH, onde foram perfurados 7 poços com auxílio de ponteira estéril e acrescentados, além dos controles citados, diferentes concentrações do extrato à partir de 100 mg/mL (100,50, 25, 12.5 e 6.25%), e posteriormente incubadas por 24 horas a 36°C. Ao final do trabalho, foi visto que o extrato acetato de etila da faveleira não apresentou atividade frente às bactérias testadas.

Palavras-chave: faveleira, plantas medicinais, perfuração em ágar.

INTRODUÇÃO

A caatinga é um bioma com grande diversidade que, sendo exclusivamente Brasileiro, apresenta um patrimônio biológico que, em muitos casos, não pode ser encontrado em nenhum outro lugar do planeta, apresentando uma variedade de plantas medicinais tradicionalmente utilizadas em tratamentos caseiros como , por exemplo, a espécie *Cnidoscopus quercifolius* pohl, popularmente conhecida como faveleira ou favela, uma planta pertencente à família Euphorbiaceae, decídua, heliófila, pioneira e endêmica, que ocorre abundantemente em diversos Estados do Brasil, com destaque na Paraíba, Pernambuco, Bahia, Piauí, Rio Grande do Norte, Ceará, Sergipe e Alagoas (MORAIS, 2016)

O Brasil tem um enorme potencial para a divulgação de novas substâncias bioativas, destacando-se no mundo por uma flora muito diversificada e complexa, apesar do fato de que

a eficácia da maioria das substâncias não foram identificadas quimicamente nem testadas farmacologicamente (MENDES, 2012).

Desta Maneira, A demanda atual por medicina complementar e alternativa pode ser em parte devido ao conhecimento inadequado da medicina tradicional ou ao alto custo e aos efeitos colaterais dos medicamentos fabricados. Nas últimas décadas, o uso de fitoterápicos tem sido amplamente adotado e aceito pelo público. Os medicamentos à base de plantas foram incluídos nos cuidados de saúde e na prática médica tradicional nos países desenvolvidos, principalmente no Reino Unido e na Europa (EKOR, 2014; BRAUN et al, 2010; CALAPAI, 2008).

Pesquisas têm apontado uma considerável utilização de *Cnidocolus quercifolius* pohl na medicina popular, empregada no tratamento de doenças agudas e crônicas, além de ferimentos. Estudos realizados em comunidades no semiárido paraibano relatam uma variedade de propriedades que os usuários atribuem à espécie. Dentre elas são citadas a ação cicatrizante, analgésica, anti-inflamatória, antibiótica e diurética (NÓBREGA, 2001; MORAIS et al, 2016).

Além dos achados etnofarmacológicos, *C. quercifolius* já foi testada frente à microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, mostrando resultados positivos para o extrato hidroalcoólico da planta (LACERDA, 2011). Testes em roedores comprovaram a atividade antinociceptiva, isto é, o potencial analgésico do extrato. Moraes et al, (2016) constatou a presença de metabólitos secundários importantes para o desempenho de atividade antioxidante, como os flavonoides.

Para a avaliação de extratos de plantas medicinais tem se recorrido a técnicas in vitro que possibilitem fácil realização e que tragam resultados consistentes. Para a triagem de extratos ou novos compostos obtidos de plantas tem se realizado os testes com bactérias. Uma das técnicas mais comumente utilizadas para este fim é a difusão de substâncias em ágar, técnica rotineira em muitos laboratórios, tanto clínico como de pesquisas (MAIA-ARAÚJO et al, 2011). Este método pode ser realizado através do teste de difusão em disco e da técnica de perfuração em ágar (OSTROSKY et al, 2008).

O teste de perfuração em ágar é um método físico, no qual um microrganismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e ao término da pesquisa se relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo desafiado com a concentração da substância ensaiada.

A aplicação do método de difusão depende de microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida. De acordo com a dimensão do halo os microrganismos podem ser classificados como: sensíveis, quando o diâmetro da zona de inibição é maior ou não mais do que 3 mm menos que o controle positivo; moderadamente sensíveis, halo maior que 2 mm, mas menor que o controle positivo de mais de 3 mm; e resistentes, diâmetro igual ou menor que 2 mm. Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução dos extratos.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo testado (OSTROSKY et al, 2008). O presente trabalho é avaliar a atividade antibacteriana do extrato de acetato de etila da *Cnidioscolus quercifolius* pohl através da técnica de perfuração em ágar.

METODOLOGIA

Coleta, secagem e obtenção do pó do material vegetal

A coleta das folhas de *Cnidioscolus quercifolius* pohl (faveleira) foi feita no município de Campina Grande em uma área vegetal pertencente a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) no dia 01 de novembro de 2017. As folhas coletadas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar. Posteriormente o material foi submetido à trituração em um moinho de facas para a obtenção do pó da droga vegetal.

Extração em acetato de etila e roto evaporação do solvente

Foi feito maceração com o solvente acetato de etila, separando o líquido extrativo a cada 72 horas, totalizando oito extrações. Todo o líquido foi armazenado em frasco âmbar e sob refrigeração. Em seguida, o procedimento de concentração do solvente foi realizado em um evaporador rotativo utilizando uma temperatura de aproximadamente 50°C. O extrato obtido foi acondicionado sob refrigeração para evitar proliferação de microrganismos.

Preparo do extrato para as análises

Pesou-se 1,0000 grama do extrato, e a este foi adicionado 10 ml de solução de dimetilsulfóxido - DMSO (VETEC®) a 10 % v/v,

obtendo uma solução do extrato na concentração de 100 mg/ml. Foi utilizado ainda 40 µL de tween 80 a fim de facilitar a dissolução do extrato acetato de etila da faveleira no DMSO.

A seguir foram separados cinco tubos de vidro estéreis para serem realizadas as diluições da solução do extrato. No primeiro tubo (nomeado por 100%) foi adicionado 1 ml do extrato a 100 mg/ml; aos tubos 2 a 5 foram adicionados 1 ml de DMSO 10%. No tubo 2 (50%) foi adicionado 1 ml da solução do extrato a 100 mg/ml e homogeneizado, obtendo-se uma solução de 50 mg/ml do extrato. Deste foi retirado 1 ml e adicionado ao tubo 3 (25%), obtendo-se uma solução de 25 mg/ml. O mesmo procedimento foi repetido nos tubos 4 e 5 (12,5 e 6,25%), obtendo-se soluções do extrato de 12,5 e 6,25 mg/ml, respectivamente.

As diferentes concentrações obtidas foram utilizadas na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato pela técnica da perfuração em ágar Mueller Hinton (MH).

Preparo do inóculo

Tomou-se de uma a três colônias do microrganismos teste e as suspendeu em solução de cloreto de sódio 0,85% (solução salina) até alcançar turvação semelhante à apresentada pelo tubo 0,5 da Escala de McFarland. As suspensões foram ajustadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 625 nm, cuja suspensão deveria atingir uma variação de absorbância de 0,080 – 0,100 % (CLSI M7- A6).

Micro-organismos utilizados

Foram utilizadas cepas de referência ATCC (American Type Culture Collection), de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), oriundas do LARMICC (Laboratório Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), todas foram previamente repicadas em Ágar BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas em estufa por 24 horas a 36°C.

Antibiótico Utilizado

Para realização do teste de controle positivo foi utilizado como antibiótico a Amicacina na concentração de 500 µg/mL.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana pelo Método da Perfuração em Ágar

Para a realização das análises, Foram realizados testes em triplicata para cada bactéria testada, para se

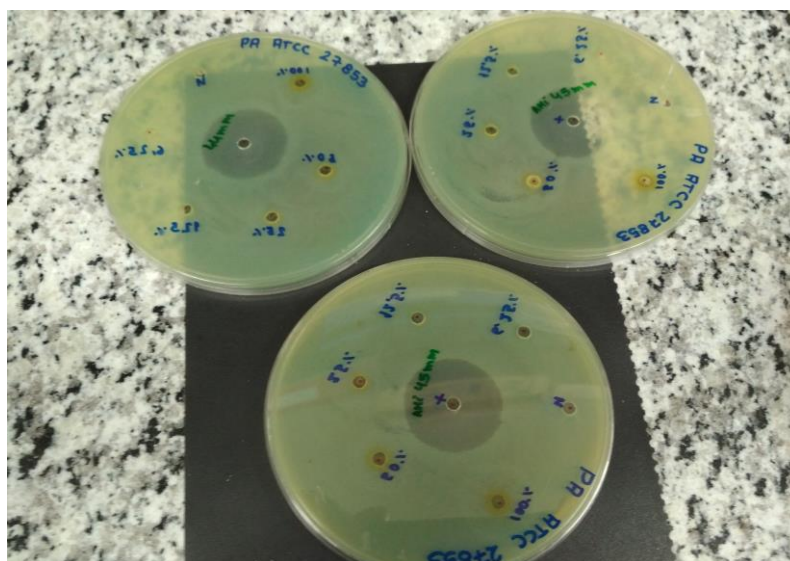
augmentar a confiabilidade do método, perfazendo um total de 12 placas de Petri, onde foram adicionadas 1 mL dos respectivos inóculos bacterianos (Foram separadas placas para cada bactéria testada), e um total de 57,2 mL de Ágar MH previamente preparados e mantidos à temperatura aproximada de 50°. Após a solidificação do meio, poços foram perfurados (um total de sete poços por placa), com auxílio de ponteiros estéreis. Em seguida eram adicionadas 40 µl de cada diluição em cada poço (nomeados por 100, 50, 25, 12,5 e 6,25%). Simultaneamente eram realizados os controles positivos e negativos nos demais poços perfurados, onde foram adicionados 40 µl de cada.

Após a completa absorção do extrato e controle positivo e negativo pelas placas, estas foram inoculados em estufa bacteriológica por 24 horas a 36°C antes da leitura das placas.

Análise dos Resultados

Os halos formados foram medidos em milímetros, com auxílio de um paquímetro. A seguir, a figura 01 apresenta o teste realizado para a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*:

Figura 01: Teste Perfuração em Ágar para *Pseudomonas aeruginosa*



RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de perfuração de poços em Ágar Muller Hinton (MH) testou o extrato acetato de etila da *Cnidoscopus quercifolius* pohl frente às bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positivos, frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas

saudáveis, mas que pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (acnes, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, sepse e outras), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), uma bactéria Gram-positiva comensal (flora normal) do sistema digestivo humano e de outros mamíferos. Amplamente encontrada no ambiente, que pode causar infecção urinária, meningite e bacteriemia, especialmente em ambientes hospitalares. *Escherichia coli* (ATCC 25922), uma bactéria bacilar gram-negativa que se encontra normalmente no trato gastrointestinal inferior dos organismos de sangue quente (endotérmicos), sendo a transmissão oral-fecal a principal via utilizada pelas cepas patogênicas que causam doenças, e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), uma bactéria gram-negativa, baciliforme (característica morfotintorial) e aeróbia, um patógeno oportunista, bastante conhecido como causador de infecções hospitalares.

Não foi encontrada atividade antibacteriana para o extrato testado preparado a partir de 100 mg/mL, e depois utilizado nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% frente às diferentes bactérias. Sendo assim, os únicos poços perfurados nas placas, onde foi possível se observar a formação de halos de inibição, foram aqueles em que foi inoculado o antibiótico controle, conhecido clinicamente, a amicacina, na concentração de 500 µg/mL. Na Tabela abaixo é possível se observar a média dos halos de inibição obtidos por a amicacina para as bactérias testadas:

Tabela 01: Média dos Halos de Inibição Obtidos por a Amicacina Frente às Bactérias Testadas

Bactéria Testada:	Halo de Inibição (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	30,3
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	31,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	44,7

A partir da tabela acima e segundo o CLSI é possível se observar que todas as bactérias se mostraram sensíveis ao antibiótico utilizado como controle positivo (a amicacina), o melhor resultado foi perante à *Pseudomonas aeruginosa*, sendo de 44,7 mm.

Já o controle negativo (DMSO a 10%), bem como o extrato utilizado nas concentrações supracitadas, não vieram a apresentar

halo de inibição visível, sendo portanto, estas bactérias classificadas como resistentes perante a eles. Sendo este mesmo resultado encontrado por ALMEIDA no ano de 2013, para a mesma planta coletada no mesmo local, que utilizou a técnica de microdiluição e encontrou valores de Concentração Inibitória Mínima de acima de 2 µg/mL. Sendo assim, apesar da vasta utilização da planta pela tradição regional para diversas finalidades terapêuticas, o extrato em questão utilizado não se mostrou efetivo frente às cepas padrões utilizadas.

CONCLUSÃO

Apesar da vasta utilização terapêutica da *Cnidocolus quercifolius* Pohl, entre outros fins para o tratamento de doenças agudas e crônicas, além de ferimentos, o extrato acetato de etila não mostrou capacidade de inibir o crescimento bacteriano de bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e gram-negativas: *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, não vindo a apresentar halo de inibição para os volumes e concentrações utilizados na técnica de perfuração de poços em ágar Mueller Hinton (MH).

Por ser utilizada na medicina popular, possivelmente a faveleira não apresenta na extração acetato de etila compostos químicos responsáveis por essa atividade, visto que o processo de extração acontece devido ao princípio de afinidade entre os metabólitos secundários do material vegetal e o solvente, sendo necessária a realização de testes com extratos advindos de demais solventes orgânicos, como o extrato hidroalcolico, bem como o extrato etanólico bruto e suas fases particionadas: hexânico, diclorometano e butanólica, por exemplo.

Sendo assim, mais estudos fazem-se necessários no intuito de elucidar a atividade do extrato acetato de etila da *Cnidocolus quercifolius* pohl perante a outras bactérias ou no sentido de se buscar conhecer o perfil de outras atividades farmacológica, bem como um estudo da composição química e os seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, SUZICLEY GONCALVES AGRA. **Estudo do Potencial Antimicrobiano e Antiproliferativo do Extrato da Planta *Cnidocolus quercifolius* pohl (Favela)**. 2013. 27 f

BRAUN LA, TIRALONGO E, WILKINSON JM, SPITZER O, BAILEY M, POOLE S, et al. Perceptions, use and attitudes of pharmacy customers

on complementary medicines and pharmacy practice. **BMC Complement Altern Med** 2010; 10: 1–7

CALAPAI G. European legislation on herbal medicines: a look into the future. **Drug Saf** 2008; 31: 428–431.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI document. M100-S25. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015

EKOR M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Front Pharmacol** 2014; 4: 1–10

LACERDA, S.R.L. **Estudo microbiológico da ação de extratos vegetais hidroalcoólicos sobre microorganismos bucais**. 2011. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Área de Concentração em Odontologia). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.

MAIA-ARAÚJO, Y.L.F. et al. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 7, n.4, 2011.

MENDES SSM, ANDRADE JA, XAVIER MA, JUNIOR JAS, PANTALEÃO SM, ESTEVAM CS, et al. **Genotoxicity test of *Maytenus rigida* and *Aristolochia birostris* in the radicular meristem of the onion, *Allium cepa***. *Rev Bras Farmacogn* 2012; 22: 76–81

MORAIS, N.R.L.; OLIVEIRA NETO, F.B.; MELO, A.R.; BERTINI, L.M.; SILVA, F.F.M.; ALVES, L.A. **Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Cnidioscolus phyllacanthus* (müll. Arg.) Pax & k.hoffm. Oriundo de apodi – RN**. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.18, n.1, p.180-185, 2016.

NÓBREGA, S. B. P. **A faveleira (*Cnidioscolus quercifolius*) como fonte alternativa na alimentação humana e animal no Semi-Árido**

Paraibano. 2001. 145 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, 18(2): 301-307, 2008.