

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO (EEB) DO CAULE DE *Calotropis procera* (APOCYNACEAE)

Emanuel Falcão Almeida¹; Natanael Teles Ramos de Lima²; Thays Thyara Mendes Cassiano³; Nadjaele Melo Apolinário⁴; Camila de Albuquerque Montenegro⁵; Micheline de Azevedo Lima⁶; Ivana Maria Fechine⁷.

RESUMO

O uso e a eficácia de plantas medicinais são atribuídos a observações populares que contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem apesar de não terem seus constituintes químicos muitas vezes conhecidos. Popularmente conhecida como Flor-de-Seda, *Calotropis procera* é uma espécie que se desenvolve em ambientes com baixo conteúdo de água no solo, possuindo estrutura curvada e contendo um caule seroso que reduz o ataque de insetos. Pesquisas já desenvolvidas indicam que a espécie Flor-de-seda possui forte atividade antibacteriana e que tal atividade foi associada parcialmente a proteases cisteínicas, fortalecendo a hipótese que estas enzimas participam na defesa direta da planta contra bactérias. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do Extrato Etanólico Bruto (EEB) do caule de *C. procera*, visando contribuir para a caracterização farmacológica da espécie, confirmando e/ou ampliando as informações já relatadas na literatura. A metodologia foi a clássica em fitoquímica para obtenção do extrato, através da maceração para o preparo do extrato etanólico bruto (EEB) do caule de *C. procera*. O EEB foi distribuído em placa de 96 poços para se dar a investigação da atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição seriada. Adicionou-se o inóculo das bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e incubou-se por 24 horas, para posterior determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), após adição da resazurina. Como resultados constatou-se que *C. procera* possuiu ação antimicrobiana contra as cepas de *Escherichia coli* nas concentrações de 1000 µg/mL e 500 µg/mL, apesar de não inibir o crescimento e nem provocar a morte das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A partir dos resultados apresentados conclui-se que o EEB do caule de *C. procera* causou inibição das cepas de *Escherichia coli*, contribuindo para dar continuidade às pesquisas com produtos naturais que apresentem um potencial antimicrobiano.

Palavras- chave: Flor-de-Seda. Microdiluição. Atividade Antibacteriana.

¹ Acadêmico do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba. emanuelfalcao2014@gmail.com

² Mestrando da Universidade Federal da Paraíba. teles.natanael@gmail.com

³ Egressa do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba. thavsthyaracg@hotmail.com

⁴ Mestra do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB. nadjaelemelo@gmail.com

⁵ Departamento de Farmácia. Universidade Federal de Campina Grande. camontenegro2502@gmail.com

⁶ Departamento de Farmácia. Universidade Estadual da Paraíba. ivana.fechine@gmail.com

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GROSS ETHANOLIC EXTRACT (BSE) FROM *Calotropis procera* BOT (APOCYNACEAE)

ABSTRACT

The use and efficacy of medicinal plants are attributed to the popular observations that contribute in a relevant way, for the dissemination of the therapeutic virtues of vegetables, frequently prescribed, for the medicinal effects they produce although they do not have their chemical constituents often known. Popularly known as the Silk Flower, *Calotropis procera* is a species that develops in environments with low water content in the soil, having a curved structure and containing a serous stem that reduces insect attack. The antibacterial activity of the plant, under research already developed, reports that the Silk Flower has strong antibacterial activity and that such activity was partially associated with cysteine proteases, strengthening the hypothesis that these enzymes participate in the direct defense of the plant against bacteria. The objective of this work was to evaluate the antibacterial activity of *C. procera* stem, aiming to contribute to the pharmacological characterization of the species, confirming and / or amplifying the information already reported in the literature. The methodology was the classic one in phytochemistry to obtain the extract, through the maceration for the preparation of the crude ethanolic extract (BSE) of the stem of *C. procera*. The BSE was distributed in a 96-well plate to investigate the antimicrobial activity by the serial microdilution technique. The inoculum of the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* was added and incubated for 24 hours for further determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) after addition of resazurin. The results showed that *C. procera* had antimicrobial action against *Escherichia coli* strains at concentrations of 1000 µg / mL and 500 µg / mL, although it did not inhibit the growth or cause death of the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. From the results presented, we conclude that BSE of *C. procera* stem caused inhibition of *Escherichia coli* strains, contributing to the continuity of research with natural products that have an antimicrobial potential.

Keywords: Flower-of-Silk. Microdilution. Antibacterial activity.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais para fins curativos cresceu e se desenvolveu ao longo da história da humanidade. Desde tempos remotos uma grande variedade de plantas é utilizada para o tratamento de diversas doenças (GRUPTA, 1994).

Atualmente, nota-se que é prevalente a produção de medicamentos alopáticos na indústria farmacêutica, mesmo sendo crescente a procura por terapias alternativas para cura das afecções. Mesmo com esse domínio de fármacos alopáticos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que a maior parte da população nos países em desenvolvimento faz uso da medicina tradicional, retirando muitos de seus remédios da natureza. As plantas são os principais meios que são utilizados pela medicina tradicional, com a população de modo geral utilizando um grande número de diferentes espécies (SOUZA, 2012). Além

disso, as plantas são a principal ou única matéria prima para o desenvolvimento de medicamentos.

Os produtos naturais têm contribuído fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de seus metabólitos secundários. Os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por micro-organismos, insetos e herbívoros. As propriedades antimicrobianas dessas substâncias também são reconhecidas de maneira empírica há séculos e estão sendo comprovadas cientificamente apenas recentemente. Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatado em muitos países, inclusive no Brasil, que possui flora diversificada e rica tradição na utilização de plantas medicinais como antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, entre outros (DUARTE, 2006; NEVES et al., 2007).

A presença de moléculas bioativas em plantas de interesse medicinal tem sido amplamente estudada nos últimos anos, devido à crescente popularidade dos medicamentos fitoterápicos (DINIZ et al., 2007).

Nesse contexto, análises fitoquímicas são ferramentas valiosas que permitem conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais ou avaliar a presença dos mesmos e, por isso, são bastante indicadas em situações onde não se dispõe de estudos químicos sobre uma espécie de interesse (SILVA et al., 2010).

Diante disto, estudos com extratos de espécies vegetais repercutem de maneira direta para o desenvolvimento de medicamentos, bem como, asseguar o uso de plantas medicinais pela população, com a confirmação de eficácia e segurança, além de atribuir possíveis novos usos terapêuticos, por fim, contribuir para a o registro da atividade químico-biológica de espécies vegetais.

Calotropis procera, conhecida popularmente como “ciúme”, “ciumeira” ou “algodão de seda”, é um arbusto selvagem pertencente à família Apocynaceae, originária da África, Índia e Pérsia, e se destaca por possuir hoje uma ampla distribuição geográfica, disseminando-se com muita facilidade por regiões áridas e semi-áridas por apresentar sementes aladas envoltas por uma plumagem facilitando seu transporte pelo vento, o que favorece sua ocorrência na região Nordeste do Brasil (JOLY, 1997; SOUTO et al., 2008).

Estudos farmacológicos realizados com as folhas da *C. procera* demonstraram atividades do tipo hipotensora, antipirética, analgésica, anti-inflamatória e bloqueadora neuromuscular (MOSSA et al., 1991; CARBAJAL et al., 1991; OLIVEIRA, 2004). Atividade antibacteriana contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Hafnia alvei* e *Staphylococcus aureus* (COSTA, 2002), atividade anticolinérgica muscarínica (COSTA, 2003), esquizonticida *in vitro* (SHARMA; SHARMA, 1999; 2000), antimoluscicida (BALI et al., 1985), antifúngica (TANIRA et al., 1994), inseticida (MESHRAM, 1995).

Nas últimas décadas, dentre as atividades farmacológicas, a antimicrobiana vem sendo exaustivamente estudada, devido ao agravamento da resistência a antimicrobianos

em populações bacterianas, principalmente de origem hospitalar (OLIVEIRA et al., 2006). Devido ao aumento progressivo da resistência, a busca de novos agentes antibacterianos derivados de produtos naturais de plantas poderia ser uma alternativa, por terem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (NOVAIS et al., 2003).

Nos últimos anos, muitas plantas têm sido avaliadas não somente pela atividade antibacteriana, mas também como agente modificador de resistência antibiótica (GIBBONS, 2004).

A descoberta e a introdução de agentes antimicrobianos na clínica médica são consideradas um dos maiores avanços da medicina no século 20 que revolucionou o tratamento de infecções bacterianas. No entanto, o surgimento progressivo de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos, resultado da utilização as vezes incorreta e sem muito controle, tornou-se uma preocupação de caráter global (CANTAS et al., 2013).

Tem sido reportado também o surgimento de linhagens bacterianas resistentes aos antimicrobianos; resultado inevitável e característico da evolução microbiana, ou seja, uma propriedade natural das bactérias cujos mecanismos bioquímicos de resistência são variados (SIMÕES; BENNETT; ROSA, 2009).

O contínuo desenvolvimento da resistência bacteriana, principalmente entre patógenos potencialmente perigosos, reforça a necessidade da busca de novas substâncias isoladas ou presentes em extratos oriundos de plantas que possam apresentar atividade antimicrobiana. Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do Extrato Etanólico Bruto (EEB) do caule de *C. procera*, visando contribuir para a caracterização farmacológica da espécie, confirmando e/ou ampliando as informações já relatadas na literatura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O levantamento bibliográfico foi realizado no *Scifinder Scholar* e no site científico *Science direct*, em Revistas Científicas, nos Anais de Congressos, no *Chemical Abstracts*, *Biological Abstracts*, através do NAPRALERT (Banco de dados sobre plantas do ponto de vista químico e biológico), além de pesquisas no Portal da CAPES e em outras fontes disponíveis na Internet.

A espécie vegetal foi coletada em dois municípios paraibanos: Cabedelo e Puxinanã. *Exsicatas* estando depositada no herbário Herbário Prof. Lauro Pires Xavier – UFPB, João Pessoa-PB. *Calotropis procera* com o número JPB-1468.

A extração objetivou retirar da planta as substâncias desejadas. O extrato foi obtido por maceração alcoólica, seguido de remoção do solvente em rota-evaporador, sob pressão reduzida e acondicionados sob refrigeração (MATOS, 1982).

O fracionamento preliminar do extrato bruto através de métodos convencionais, foram realizadas partições do extrato bruto com solventes de polaridade crescente a fim de

obtermos as fases: hexânica, clorofórmica e acetato de etila.

Antes de serem utilizadas nos ensaios, as culturas bacterianas de isolados clínicos ou ATCC, foram reativadas. Para isso, foram replicadas em Caldo Casoy e incubadas por 24h a 35°C ±2°C, em seguida replicou-se para Ágar Casoy inclinado e foram incubadas por mais 24h a 35°C ±2°C.

O inóculo foi preparado de acordo com a escala 0,5 de McFarland, para isso pôde-se utilizar a comparação visual com um tubo de referência. Com o auxílio de uma alça, retirou-se uma pequena alíquota da cultura bacteriana que foi obtida e passada para um tubo contendo 3 mL de salina estéril (NaCl 0,85%), homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos e fez-se a leitura em espectrofotômetro a 625 nm (0,08 a 0,1 de Absorbância ou 79,4% a 83,2% de Transmitância), usando solução salina como branco.

Para a distribuição do meio de cultura nas placas de microdiluição, utilizou-se microplacas estéreis de 96 orifícios com fundo em forma de “U”, providas de tampa, adicionando-se 100 µL de caldo MH da coluna 1 até a coluna 12.

A princípio, extrato e frações foram diluídos, em tubo estéril, de forma a obter uma concentração de 2000 µg/mL, pesou 0,02 g do extrato, então foi solubilizado em 500 µL de DMSO e foram acrescentados 9,5 mL de solução salina estéril.

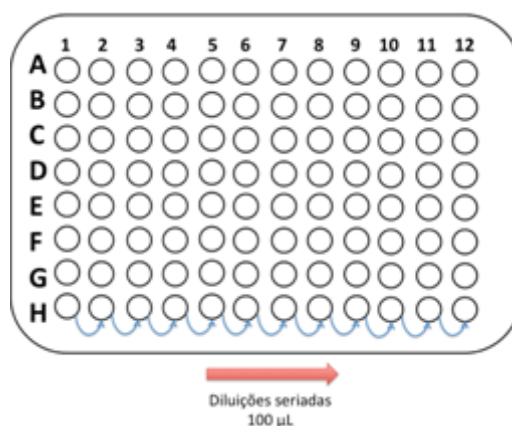
São necessários controles para contaminação, controle do reagente e do crescimento bacteriano. Para isto temos que: são reservadas as linhas G e H e a coluna 12 para os respectivos controles: Linha G: Controle da contaminação do meio de cultura e dos extratos. Recebe extrato e caldo MH. Linha H: Controle do DMSO (dimetil-sulfóxido). No primeiro orifício da linha H colocou-se 200 µL de uma solução de DMSO a 10% em caldo MH, retira-se 100 µL desse orifício e passou-se para o orifício seguinte, homogeneizou-se e seguiu-se a sua diluição seriada até o último orifício, desprezando-se 100 µL ao final. Os orifícios dessa linha receberam um inóculo. Coluna 12: Controle do crescimento microbiano. Não recebeu os extratos, mas sim meio de cultura e inóculo.

Para a inoculação foi colocado 5 µL de cada inóculo, no caso as bactérias, nos orifícios, em duplicata. Assim, o inóculo foi diluído chegando-se à concentração final desejada de 5x10⁵ UFC/mL ou 5x10⁴ UFC/orifício. Iniciou-se a inoculação a partir dos orifícios mais diluídos para os mais concentrados, ou seja, do 12 para o 1. Após colocar os inóculos, as placas foram incubadas a 35°C durante 24 horas completas. Para ocorrer o possível crescimento ou inibição das bactérias. Para poder fazer a leitura da CIM, fez-se necessário o uso de um revelador. Uma hora antes do término do período de incubação acrescentou-se, em cada orifícios, 20 µL de cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) a 0,5%. As placas foram reincubadas a 35°C por aproximadamente 30 min. A presença de uma coloração vermelha é considerada prova de crescimento microbiano.

A distribuição do extrato na placa de microdiluição foi feito da seguinte forma: foram colocados 100 µL do extrato diluídos na concentração de 2000 µg/mL na primeira coluna da placa; a linha H indicou somente o controle do DMSO. Com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram realizadas as diluições seriadas. (retiro-se 100 µL da coluna 1 e

transferiu para a coluna 2; homogeneizou, enchendo e esvaziando as ponteiras; foi retirado 100 μ L da coluna 2 e transferido para a coluna 3, homogeneizou novamente; retirou 100 μ L da coluna 3 e transferiu para a 4 e assim sucessivamente até a coluna 11 de onde foram descartados 100 mL (figura 1).

Figura 1. Esquema da metodologia da utilizada na determinação da CIM através técnica da microdiluição em placa



Fonte: Apolinário, 2016

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior leitura, realizada com a adição de 20 μ L de uma solução 0,01% (p/v) de resazurina sódica (SIGMA), um indicador colorimétrico de atividade metabólica. Foi considerada como CIM para os produtos testados a menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano quando comparado ao grupo controle, sendo verificado pela manutenção da cor azul da resazurina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A leitura visual foi feita pela mudança de cor nas cavidades. Como indicativo de viabilidade bacteriana, há a redução do corante resazurina, com mudança da coloração de azul para rosa, revelando, assim, que o extrato não teve potencial de causar danos às bactérias. Por conseguinte, a manutenção da coloração azul demonstra morte das bactérias justificada pela ação do EEB do caule de *C. procera*. A resazurina atua como substrato cromogênico de cadeia transportadora de oxigênio, desidrogenases, indicando oxirredução, sendo reduzida por falvinas ligadas a enzimas de cadeia transportadora de oxigênio durante o metabolismo celular (KOLEMAN, 2001).

Na Figura 2 observou-se que nas fileiras A, B e C houve uma inibição das cepas de *Escherichia coli* em 1000 μ g/mL e 500 μ g/mL, sendo a CIM de 500 μ g/mL.

Figura 2. Bactéria: *Escherichia coli*



Fonte: Apolinário, 2016

Para *Pseudomonas aeruginosa*, observou-se uma manutenção da coloração azul na concentração de 1000 µg/mL, como observado na Figura 3.

Figura 3. Bactéria: *Pseudomonas aeruginosa*



Fonte: Apolinário, 2016

Para *Staphylococcus aureus* foi constatado que não houve inibição em nenhuma das concentrações como podemos observar na Figura 4.

Figura 4. Bactéria: *Staphylococcus aureus*



Fonte: Apolinário, 2016

Em estudo realizado por Kareem, Akpan e Ojo (2008), verificou-se que os três extratos etanólico a 60%, aquoso e clorofórmico, obtidos a partir de folhas e látex de *C. procera* não inibiram *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus pyogenes*, pela técnica de difusão em disco. O efeito inibitório foi predominante no látex, esta atividade poderia ser associada à presença de calactina, mudarina e uma proteína chamada calotropaina que são componentes ativos de *C. procera* látex (PAROTTA, 2001).

4. CONCLUSÕES

No estudo realizado com o Extrato Etanólico Bruto do caule de *C. procera* obtido, determinou-se que as concentrações inibitórias mínimas de 500 µg/mL são eficazes para a inibição de *Escherichia coli*, enquanto que para *P. aeruginosa* e *S. aureus* na mesma concentração não houve eficácia antibacteriana.

Conclui-se que o EEB do caule de *C. procera* causa inibição das cepas de *Escherichia coli*, mas que outros estudos de atividade antibacteriana devem ser feitos para investigar o porquê da atividade antibacteriana só ocorrer na dose de 500 µg/mL, e dessa forma poder contribuir com às pesquisas com produtos naturais e ainda, poder saber dentro do (EEB), quais os metabólitos envolvidos nessa ação.

REFERÊNCIAS

BALI, H.S.; SINGH, S.; SINGH, D.P. Preliminary screening isoramnetina-3-) rubinobiosídeo (2) 33 Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.10, n.1, p.29-33, 2008. of some plants for molluscicidal activity against two snail species. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.55, n.5, p.338 40,1985.

CANTAS, L.; SHAH, S. Q.; CAVACO, L. M.; MANAIA, C. M.; WALSH, F.; POPOWSKA, M.; SØRUM, H. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. **Front Microbiol**, v.4, p.96. 2013.

CARBAJAL, D. et al. Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, p.21-4, 1991.

COSTA, E.T. **Atividade farmacológica de *Calotropis procera* R. Br. (ciúme) no sistema digestório de roedores**. Monografia (Curso de Medicina) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, SãoLuís. 41p. 2003.

COSTA, J.L. **Atividade antibacteriana e triterpeno pentacíclico em *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae)**. Monografia (Curso de Farmácia) -Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 43p. 2002.

DI STASI L.C.; **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996.

DINIZ, A.C.B.; ASTARITA, L.V.; SANTARÉM, E.R. Alteração dos metabólitos secundários em plantas de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae) submetidas à secagem e ao congelamento. **Acta bot. bras.** v. 21, n.2, p. 443-450, 2007.

DUARTE, M. C. T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil.** Multiciência, Campinas, n. 7, 2006.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**, v. 21: 263-27. 2004.

JOLY, A. B. Botânica – **Introdução à taxonomia vegetal.** 5 ed. São Paulo, Ed Nacional, 1997.

MESHARAM, P.B. Evaluation of some medicinal and natural plants extracts against Teak Skeletonizer Eutectone machaeralis walk. **The Indian Forester**, v.121, n.6, p.528- 32, 1995.

MOSSA, J.S. et al. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. **American Journal Chinese Medicine**, v.19, n.3-4, p.223-31, 1991.

NEVES, F.A.; SANTOS, D.R.; LUCENA, P.A.; SOUZA JÚNIOR, G. F.; OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, M.R.R. Teste de suscetibilidade de dermatófitos ao extrato semissintético Hexanóico de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, n.2, p.44-46, 2007.

NOVAIS, T.S.; COSTA, J.F.O.; DAVID, J.L.P.; DAVID, J.M.; QUEIROZ, L.P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A.M.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, R.R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14: 05- 08. 2003.

OLIVEIRA, A.V. **Avaliação da atividade hipotensora de extratos e frações das folhas de *Calotropis procera* R. Br.** Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 79p. 2004.

OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 16(1): 77-82. 2006.

PARROTTA, J. A. (2001): **Healing plants of peninsular India.** (AB International Wallingford, UK. P.944.

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Nat Prod Rep.**, v. 26, n. 6, p.746-757. 2009.



SHARMA, P.; SHARMA, J.D. *In vitro* schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, v.71, p.77- 9, 2000.

SILVA, Sâmia Andricia S. da et al.; Flavanones from aerial parts of *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth, Boraginaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 682-685, 2010.

SILVA, N.L.A.; MIRANDA, F.A.A.; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**. São Cristóvão, v. 6, n. 2, p. 1- 17, 2010.

TANIRA, M.O. et al. Antimicrobial and phytochemical screening of medicinal plants of the United Arab Emirates. **Journal of Ethnopharmacology**, v.41, n.3, p.201-5, 1994.

Received: 14 September 2016

Accepted: 20 October 2016

Published: 30 March 2018