

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA FASE CLOROFÓRMICA (FC) DAS FOLHAS DE *Varronia globosa* (BORAGINACEAE)

Dayana Miguel Silva¹; Márcia Muniz Oliveira²; Nadjaele Melo Apolinário³; Camila de Albuquerque Montenegro⁴; Ivana Maria Fechine⁵.

RESUMO

No Brasil, temos uma das maiores floras do mundo, apesar do grande assolamento que se enfrenta nos dias atuais, consegue-se obter vários tipos de plantas, que possuem inúmeras substâncias. *Varronia globosa* é uma espécie que se desenvolve em diversas áreas tropicais e subtropicais, incluindo o Nordeste brasileiro, bem como no agreste paraibano, onde é popularmente conhecida como Maria-preta. É utilizada na forma de decocto ou infuso para cólicas menstruais e indigestão. O presente trabalho tem como objetivo testar a atividade antibacteriana da fase clorofórmica (FC) das folhas de *V. globosa* em espécies de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A metodologia utilizada foi a usual em fitoquímica, primeiramente secou-se a planta em estufa para obtenção do pó, e utilizou-se a técnica de maceração em solução etanólica, que foi rotavaporada para obtenção do extrato etanólico bruto (EEB). O extrato bruto foi submetido à partição com solventes de polaridades diferentes para obtenção da fase clorofórmica (FC). Para os testes microbiológicos foram utilizados microplacas e em cada orifício foi colocado o inóculo mais a solução com a fase clorofórmica do extrato. Os resultados obtidos demonstraram que na leitura de Concentração Inibitória Mínima (CIM), a fase clorofórmica teve atividade sobre *Escherichia coli*, pois foi possível observar um halo de inibição nos poços com 1000 µg e 500 µg, o oposto ocorreu para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, pois não houve a presença do halo na leitura para nenhuma dose. Assim conclui-se que através dos testes antibacterianos pôde-se comprovar que a fase clorofórmica de *V. globosa* mostrou atividade biológica. No entanto apenas as maiores concentrações de 1000µg/mL e 500µg/mL mostrou-se eficaz para a inibição das cepas *Escherichia coli*, o que não foi observado para *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Dessa forma a fase clorofórmica das folhas de *V. globosa*, causa inibição das cepas de *Escherichia coli*, tornando relevante a continuidade das pesquisas com esta espécie.

Palavras-chave: Maria Preta. Maceração. Atividade Antibacteriana.

¹ Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba. dayanamiguel15@gmail.com

² Acadêmica do Curso de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba. marciamuniz.oli@gmail.com

³ Mestra. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB. nadjaelemelo@gmail.com

⁴ Departamento de Farmácia. Universidade Federal de Campina Grande. camontenegro2502@gmail.com

⁵ Departamento de Farmácia. Universidade Estadual da Paraíba. ivana.fechine@gmail.com

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE CHLOROFORMIC PHASE (FC) OF THE LEAVES OF *Varronia globosa* (BORAGINACEAE)

ABSTRACT

In Brazil, we have one of the largest floras in the world, despite the great desolation that faces today, we can get various types of plants, which have numerous substances. *Varronia globosa* is a species that develops in several tropical and subtropical areas, including the Northeast of Brazil, as well as in the agreste of Paraíba, where it is popularly known as Mary-Black. It is used in the form of decoction or infusion for menstrual cramps and indigestion. The present work aims to test the antibacterial activity of the chloroform phase (FC) of the leaves of *V. globosa* in species of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The methodology used was the usual one in phytochemistry, first the plant was dried in an oven to obtain the powder, and the maceration technique was used in ethanol solution, which was rotoevaporated to obtain the crude ethanolic extract (BSE). The crude extract was partitioned with solvents of different polarities to obtain chloroform (FC) phase. For the microbiological tests microplates were used and in each orifice the inoculum plus the solution with the chloroform phase of the extract was placed. The results showed that in the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) reading, the chloroform phase had activity on *Escherichia coli*, since it was possible to observe an inhibition halo in the wells with 1000µg and 500µg, the opposite occurred for *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, since there was no presence of the halo in the reading at any dose. Thus, it was concluded that antibacterial tests showed that the chloroform phase of *V. globosa* showed biological activity. However, only the highest concentrations of 1000µg / mL and 500µg / mL proved to be effective for the inhibition of *Escherichia coli* strains, which was not observed for *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Thus the chloroform phase of the leaves of *V. globosa* causes inhibition of *Escherichia coli* strains, making relevant the continuity of the research with this species.

Keywords: Mary Black. Maceration. Antibacterial activity.

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas no intuito medicinal é bem vasto, visto que se pode utilizar desta, de várias formas, desde um infuso, ou o ato de mascar, até na medicina das crenças que usa-se para “benzer” os maus das pessoa. Ainda hoje em muitos lugares, há a venda de plantas sem nenhum trato farmacêutico à venda em feiras livres, não podendo assim evitar problemas com toxicidade ou até mesmo interações com uso concomitante de medicamentos industrializados (MACIEL, 2002).

No Brasil, temos uma das maiores floras do mundo, apesar do grande assolamento que se enfrenta nos dias atuais, consegue-se obter vários tipos de plantas, que possuem inúmeras substâncias como flavonoides, taninos, óleos essenciais, entre outros. Neste contexto, a flora não só Brasileira, mas de todo o mundo é uma fonte quase que inesgotável de material para pesquisa (CORADIN, 2011).

A química de produtos naturais sempre foi uma das áreas que lideraram o

desenvolvimento de medicamentos no Brasil, e tem alcançado importantes avanços com a implantação de tecnologias para elucidação estrutural como: Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia de Massa, Infravermelho, entre outros (FERREIRA et al., 2010). Houve um aumento do uso de produtos naturais, decorrente de informações de estudos desenvolvidos por institutos universitários salientando o uso quase sempre eficaz de plantas e seus derivados, como infusões, decoctos, pois seus metabólitos regulam a produção de várias proteínas e citocinas produzidas fisiologicamente pelos seres humanos. Considerando esse crescimento, nasce assim a necessidade da população acadêmica para a pesquisa dessas plantas e pelos seus efeitos, tornando o uso de plantas para uso terapêutico mais seguro e mais bem utilizado pela população (SOUZA, 2005).

A família *Boraginaceae* possui várias espécies, no Brasil ocorrem nove gêneros e cerca de 130 espécies, sendo *Varronia* e *Tournefortia* os gêneros que mais ocorrem. *V. globosa* é uma de suas espécies, e com certeza um bem natural que ainda precisa de pesquisas de seus fitocomponentes por aquelas pessoas que são ou estão se tornando capacitadas para ajudar a catalogar as moléculas e, conseqüentemente, as ações farmacológicas desta planta. Tendo em vista que temos que nos certificar do que usamos para nossa saúde, é indispensável estudos e testes para elucidar questões não esclarecidas bem como descobrir novas substâncias, que é o que se procura fazer neste estudo (VIERA, 2013).

A Caatinga ocupa uma área de 734.478 km², e é o único bioma exclusivamente brasileiro, onde pode-se encontrar uma gama de oportunidade de estudos com plantas por possuir vasta flora (MIRANDA et al., 2007). Dentre estas se encontra a *V. globosa*, que é uma planta que possui características botânicas identificadas. Possui arbusto ramificado, com folhas simples, alternas, inteiras, pecíolo cilíndrico, piloso, lâmina elíptica a oval-elíptica, discolor e pubescente em ambas as faces, base e ápice agudos, margem serreada. Possui inflorescências terminais em capítulos globosos; pedúnculo cilíndrico, pubescente; cálice subcampanulado, foliáceo, levemente zigomorfo, pubescente; sépalas soldadas; corola glabra, campanulada, pentâmera; 5-estames, epipétalos, filete cilíndrico; anteras dorsifixas, bitecas, rimosas; ovário súpero, glabro, ovoide, bicarpelar, bilocular; disco proeminente na base; estilete terminal, delgado, bifurcado, dois estigmas bifidos. Fruto drupáceo, arredondado (ABRANTES, 2004).

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).

Na literatura pode-se observar que esta espécie possui atividades com, por exemplo, cicatrizante, anti-inflamatório, diurético e no tratamento de infecções urinárias, entre outras. A decoção e/ou infusão popularmente utilizada, possui efeitos contra cólicas menstruais e indigestão (AGRA, 2004). Em alguns estudos foram encontrados algumas substâncias químicas em alguns óleos de *V. globosa*, tais como os compostos biciclogermacreno (22,7 % -13,1 %) e β - cariofileno (11,9 % -11,6 %) (MENEZES et al.,

2004).

Estudos farmacológicos feitos com uma tintura a 50% no Departamento de *Military Medical Research* e no Hospital Militar Central Dr. Luis Díaz Soto mostraram efeitos hemostáticos e hipoglicemiantes, como também sua ação antibacteriana (MARTÍN et al, 2011).

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 da fase clorofórmica das folhas de *V. globosa*, visando contribuir para a caracterização farmacológica da espécie, confirmando e/ou ampliando as informações já relatadas na literatura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para iniciar o trabalho foi realizada uma revisão de literatura 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, com a finalidade de detectar outras pesquisas sobre a espécie em estudo.

A planta *V. globosa*, cujo nome popular é “Maria Preta”, pertence à família Boraginaceae, e foi coletada na zona rural no município de Puxinanã – PB (S 07°08’998’ min / W 035° 58’638’), no dia 31.05.2013. O material vegetal foi processado no município de Campina Grande-PB, no Laboratório de Fitoquímica na Universidade Estadual da Paraíba.

O material botânico coletado foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar, com temperatura de 40°C, por aproximadamente duas semanas. Após a secagem completa das folhas da espécie estudada, o material botânico foi triturado em moinho de facas até obtenção de um pó fino. Foi realizada a maceração em etanol do pó obtido. Utilizando um rota-evaporador à 50°C, foi feito a evaporação do solvente da solução extrativa para obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB).

Através do processo de partição do EEB com solventes de polaridades diferentes, foi obtida a fase clorofórmica de *V. globosa*, a qual foi pesada e acondicionada em recipiente sob refrigeração para posterior ensaio biológico. Com a fase clorofórmica de *V. globosa*, realizou-se os testes antibacterianos com inóculos das cepas de *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Antes de serem utilizadas nos ensaios, as culturas bacterianas de isolados clínicos ou ATCC, foram reativadas. Para isso, tornou-se necessário repicá-las em Caldo Casoy e incubá-las por 24h a 35°C ±2°C; e após a incubação repicá-las para Ágar Casoy inclinado e incubá-las por mais 24h a 35°C ±2°C.

Para a distribuição do meio de cultura foram utilizadas microplacas estéreis de 96 orifícios com fundo em forma de “U”, providas de tampa, colocando 100 µL de caldo *Mueller-Hinton* da coluna 1 até a coluna 12 para posterior dispersão dos inóculos da fase CHCl₃.

Para o preparo da diluição dos extratos, a princípio a fase CHCl₃ foi diluída em tubo estéril, de forma a obter uma concentração de 2000 µg/mL, pesou 0,02 g do material em análise, então foi solubilizado em 500 µL de DMSO e foi acrescentado 9,5 mL de solução salina estéril.

Para a distribuição dos extratos nas placas de diluição, colocou-se 100 µL da fase CHCl₃ diluída na concentração de 2000 µg/mL na primeira coluna da placa; a linha H, serviu somente o controle do DMSO; com o auxílio de uma pipeta multicanal, realizou-se as diluições seriadas. Foi retirado 100 µL da coluna 1 e transferido para a coluna 2; homogeneizou, enchendo e esvaziando as ponteiros; retirou-se 100 µL da coluna 2 e transferiu para a coluna 3, homogeneizou novamente; retirou 100 µL da coluna 3 e transferiu para a 4 e assim sucessivamente até a coluna 11 de onde foram descartados 100 µL.

O inóculo foi preparado de acordo com a escala 0,5 de McFarland, para isso pode-se utilizar a comparação visual com um tubo de referência ou o espectrofotômetro. Com o auxílio de uma alça, retirou-se uma pequena alíquota da cultura bacteriana, obtida e passou para um tubo contendo 3 mL de salina estéril (NaCl 0,85%), homogeneizou-se em vórtex por 15 segundos e a leitura foi executada 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.

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

O preparo da diluição com a fase clorofórmica das folhas de *V. globosa* foi realizado com a diluição, em tubo estéril, de forma a obter uma concentração de 2000 µg/mL, pesou-se 0,02 g da fase CHCl₃, que foi solubilizado em 500 µL de DMSO e foi acrescentado 9,5 mL de solução salina estéril.

São necessários controles para contaminação, controle do reagente e do crescimento bacteriano. Para isto foram reservadas as linhas G e H e a coluna 12 para os testes respectivos controles: Linha G: Controle da contaminação do meio de cultura e dos extratos. Recebeu 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, retirou-se 100 µL desse orifício e passa-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 deverão receber um inóculo. Coluna 12: Controle do crescimento microbiano. Não recebeu os extratos, mas recebeu 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 5×10^5 UFC/mL ou 5×10^4 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.

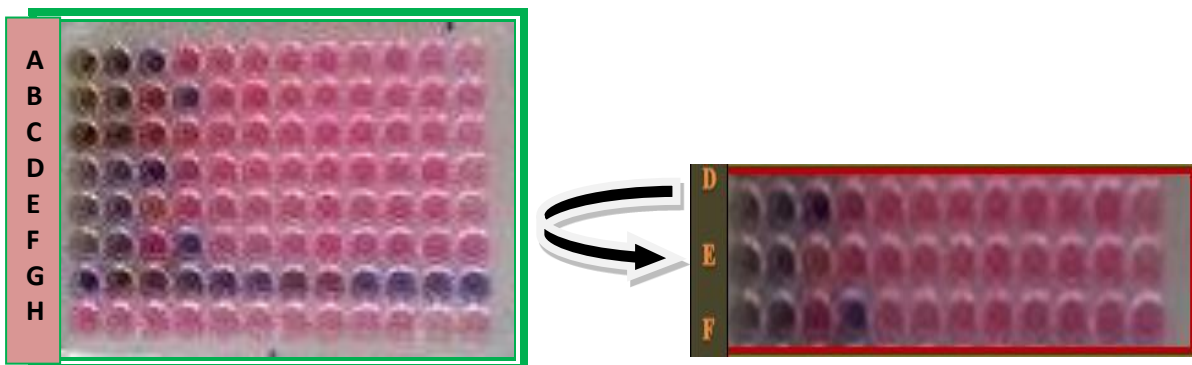
Para poder fazer a leitura da CIM, fez-se necessário o uso de um revelador. Uma hora antes do término do período de incubação acrescentou-se, em cada orifício, $20 \mu\text{L}$ de cloreto de trifeniltetrazolium (TTC) a 0,5%. As placas foram reincubadas a 35°C por aproximadamente 30 min. A presença de uma coloração vermelha é considerada prova de crescimento microbiano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da leitura de Contração Mínima Inibitória (CIM), pode-se perceber que em concentrações mais altas ($1000 \mu\text{g/mL}$ e $500 \mu\text{g/mL}$), a fase clorofórmica de *Varronia globosa* mostrou atividade antibacteriana frente a *E. coli* com a percepção de halos no fundo dos orifícios onde foram inoculadas as amostras da bactéria junto com a preparação do material vegetal. As concentrações que foram inoculadas em toda a placa variam de $1000 \mu\text{g/mL}$ e $0,98 \mu\text{g/mL}$, a cada poço a concentração cai metade. Os testes microbiológicos não se mostraram eficazes para *P. aeruginosa* e *S. aureus*, em nenhuma concentração, de acordo com a leitura dos pesquisadores presentes, portanto, não houve inibição do crescimento bacteriano, mostrando assim que não houve atividade em nenhuma concentração.

Na figura 1 observa-se que nas fileiras D, E e F houve inibição das cepas de *Escherichia coli* em $1000 \mu\text{g/mL}$ e $500 \mu\text{g/mL}$, sendo a CIM de $500 \mu\text{g/mL}$.

Figura 1. *Escherichia coli*



Fonte: Apolinário, 2016.

Para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foi constatado que não houve inibição, pela técnica de microdiluição em placa, como exposto nas figuras 2 e 3.

Figura 2. *Pseudomonas aeruginosa*



Figura 3. *Staphylococcus aureus*



Fonte: Apolinário, 2016

4. CONCLUSÕES

Através dos testes antimicrobianos pôde-se perceber que a fase clorofórmica (FC) de *Varronia globosa* mostrou atividade antibacteriana. No entanto, apenas as maiores concentrações (1000µg/mL e 500µg/mL) da fase clorofórmica (FC) de *V. globosa* mostraram-se eficazes para a inibição das cepas *Escherichia coli* enquanto que para *P. aeruginosa* e *S. aureus* nas mesmas concentrações não houve eficácia antibacteriana. Isto mostra que nesta planta há algumas substâncias que é capaz de inibir o crescimento e/ou proliferação da *E. coli*, nessas concentrações, mostrando a necessidade de continuação de mais protocolos de pesquisas de atividade antibacteriana para esclarecer e enriquecer os achados que determinaram essa atividade, visto que o protocolo utilizado pode ser repetido e modificado.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, H. F. L.; AGRA, M. F. Estudo etnomedicinal das Boraginaceae na caatinga paraibana, Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, 85(1): 7-12, 2004.
- 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.

CORADIN, Lidio; SIMINSKI, A.; REIS, A. Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial. **Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, 2011.

DANTAS, C. A. G. **Investigação fitoquímica e avaliação do potencial tóxico e anti-inflamatório de Varronia globosa Jacq.** (BORAGINACEAE), 2015.

DE MIRANDA F.; ÂNGELA MARIA, M. M.; JOSÉ IRANILDO, P. Q. Boraginaceae A. Juss. do arquipélago de Fernando de Noronha, Pernambuco, Brasil. **Iheringia. Série Botânica**, v. 63, n. 2, p. 257-262, 2008

FERNANDES, T.M. **Plantas medicinais memória da ciência no Brasil**. 20^o Edição, 2004.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quim. Nova**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 9, p.1829-1829, 2010.

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

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MATOS, F.J.A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, 2^o Edição, 1997.

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, 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.

PARNHAM, M.J., **Drugs in inflammation**. Birkhauser Verlag, Basel, 1991.

ROQUE, A. de A.; ROCHA, R. de M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

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.



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

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**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

Received: 16 September 2016

Accepted: 17 October 2016

Published: 30 March 2018