

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA de extratos de FOLHAS DE *Acanthospermum australe* (LOERFL.) KUNTZE

André Fazolo Bonella¹, Vinicius Dornellas Natalli¹, Luciana de Matos Camizão², Flávio Araújo Vieira³, Valdenir José Belinelo⁴

1. Bolsistas de Iniciação Científica do CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES (andre.bonella@hotmail.com)
2. Especialista, Professora da Faculdade Pitágoras de Linhares, Linhares, ES.
3. Especialista, Professor da Faculdade do Sul da Bahia, Teixeira de Freitas, BA
4. Doutor, Professor do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Departamento de Ciências da Saúde, CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES

Data de recebimento: 07/10/2011 - Data de aprovação: 14/11/2011

RESUMO

A *Acanthospermum australe* (Loerfl.) Kuntze é uma planta considerada pelos agricultores como daninha, e que cresce em meio de pastos e terrenos baldios. É utilizada na medicina tradicional como depurativa, diurética, antiarrítmica e outros. Neste estudo foi realizada uma triagem farmacognóstica do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. australe*, obtido por turboextração. Também foi realizada uma avaliação da atividade antimicrobiana utilizando quatro espécies de bactérias (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Bacillus cereus* ATCC 11778) por meio do método de microdiluição em placa de 96 poços. Observou-se a presença de classes de compostos químicos, que contribuíram para o efeito antimicrobiano em baixas concentrações, como observado nos testes. Para determinar a concentração bactericida mínima foi repicado o material dos poços sem crescimento bacteriano, para placas contendo meio Agar Müller-Hinton e verificado o crescimento bacteriano. Observou-se uma concentração inibitória mínima similar a apontada no teste anterior de microdiluição.

PALAVRAS-CHAVE: *Acanthospermum australe*, atividade antibacteriana, teste de microdiluição.

Phytochemical study and antibacterial activity of extracts from leaves of *Acanthospermum australe* (LOERFL.) KUNTZE

ABSTRACT

The *Acanthospermum australe* (Loerfl.) Kuntze is considered a weed by farmers, grows in the middle of pastures and wastelands. It is used by traditional medicine as purifying, diuretic, antiarrhythmic, and others. In this study was took place pharmacognostic screened of hydroalcoholic extract of leaves of *A. australe*,

performed by turbo extraction. And also, was realized an evaluation of antimicrobial activity, using four species of bacteria (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Bacillus cereus* ATCC 11778) by micro-dilution method in 96-well plate. Was observed the presence of classes of chemical compounds that contributes to the antimicrobial effect at low concentrations, as observed in the assays. To find the minimum bactericidal concentration, an aliquot of those wells in which no bacterial growth was observed, were transferred to plates containing Mueller-Hinton Agar medium, and then checked the bacterial growth. Was observed a minimum inhibitory concentration similar to those observed through micro-dilution assay.

KEYWORDS: *Acanthospermum australe*, antibacterial activity, micro-dilution test.

INTRODUÇÃO

A diversidade de espécies de plantas presentes no Brasil continua representando um caminho para a descoberta de novos fármacos destinados ao tratamento de patologias que ainda hoje necessitam de inovações. A Organização Mundial de Saúde (OMS) vem apoiando a utilização de plantas medicinais por se tratar de uma prática tradicional em muitos povos e que traz benefícios para a saúde (SALVAGNINI et al., 2008).

Segundo SINGH (1973) e LORENZI & MATOS (2002), a *Acanthospermum australe* (Loerfl.) Kuntze é uma espécie que pertence a família Asteraceae, de caráter herbáceo, e que é conhecida no Brasil como: carrapichinho, carrapicho rasteiro, mata pasto, maroto, entre outros nomes populares. Essas denominações variam de acordo com a região. É uma espécie considerada pelos agricultores como sendo uma planta daninha, pois cresce no meio dos pastos e terrenos baldios.

A. australe já é utilizada para fins medicinais, na forma de chás por infusão ou decocção, como depurativo, diurético, vermífuga, antimalárica e antiarrítmica, (VIVOT & CRUANES, 2008; RODRIGUES & CARVALHO, 2001). Através de um estudo realizado no Município de Alto Paraíso, Goiás, foi demonstrado que esta planta é uma das sete espécies mais citadas para o tratamento de enfermidades, indicadas por médicos naturalistas (SOUZA & FELFILI, 2006).

De acordo com MARTINS et al. (2006), esta planta apresenta potencial para se tornar um medicamento fitoterápico, devido a sua grande utilização pela cultura popular para a cura de algumas enfermidades.

A utilização de extratos vegetais tem sido um bom caminho para se pesquisar novas alternativas contra microrganismos indesejáveis, visto que, alguns destes já se encontram resistentes aos fármacos sintéticos de última geração lançados no mercado. Pesquisadores já vêm demonstrando a eficácia de extratos vegetais contra microrganismos patogênicos e formas alternativas confiáveis para a utilização desses produtos (OLIVEIRA et al., 2007; PACHECO et al., 2011; BELINELO et al., 2001; GONÇALVES et al., 2011).

Compostos secundários das plantas, tais como fenóis e taninos têm sido apontados como sendo os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana observada em substâncias de origem natural. Estes compostos contribuem para os mecanismos de defesa que a planta desenvolve para se proteger de predadores e parasitas na natureza (NASCIMENTO et al., 2000). Partindo desse fato, é possível

utilizar tais compostos na medicina, criando novos medicamentos, de maior eficácia e baixa toxicidade, e de custo de obtenção mais acessível.

Neste trabalho teve-se como objetivo identificar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da folha de *A. australe* frente a bactérias patogênicas ao ser humano.

METODOLOGIA

Material vegetal: Folhas de *A. australe* foram coletadas no município de Pedro Canário, ES. As mesmas foram lavadas, submetidas à secagem em estufa a 40 ± 5 °C, por um período de 72 horas e posteriormente, moídas e armazenadas em recipiente de vidro hermeticamente fechado (SIMÕES et al., 2007).

Obtenção do extrato: Folhas moídas e secas (50 g) foram colocadas em turbo-extrator (liquidificador industrial) juntamente com 500 mL de etanol a 80 °GL. Foram realizados dois intervalos de 5 minutos durante a extração a fim de evitar o aquecimento da amostra em temperatura superior a 40 °C. A solução resultante foi filtrada numa sequência de filtros (uma malha fina, e dois papéis de filtro) inseridos em um funil de Buchner acoplado ao kitassato, e sob pressão reduzida (SIMÕES et al., 2007).

O filtrado foi colocado em evaporador rotativo para concentração, com a temperatura do banho-maria mantida em 38 ± 1 °C. Em seguida, o extrato foi resfriado a -10 °C por 12 horas, e submetido à liofilização durante 72 horas (SIMÕES et al., 2007).

Triagem fitoquímica: Foi realizada de acordo com metodologia descrita por BARBOSA (2004) para seguintes classes químicas: saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis e taninos, flavonóides, alcalóides, glicosídeos cardíacos, esteróides, triterpenóides e carotenóides.

Ensaio antibacteriano - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM): Os testes foram realizados por microdiluição em caldo Müeller-Hinton, de acordo com metodologia já padronizada (NCCLS, 2003). Foram utilizadas quatro cepas de bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778), que foram mantidas em caldo Mueller-Hinton por 24 horas em temperatura de 35 ± 2 °C antes do início dos testes. O inóculo foi diluído em solução salina a fim de se obter uma suspensão contendo $1,0 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ UFC/mL, comparando, pela turbidez, com tubo de 0,5 na escala de McFarland.

O extrato vegetal foi preparado para a utilização nos testes antimicrobianos, em duas diluições sequenciais. Primeiramente pesou-se $2,0 \times 10^4$ µg do extrato e adicionou 1,0 mL de solução de NaCl 0,9%. Em seguida 100,0 µL desta solução foi transferida para um tubo Ependorff e então adicionado 900,0 µL de solução de NaCl 0,9% obtendo uma concentração de $2.000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Foi utilizada microplaca de 96 poços, dividindo-se os poços em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H), para cada bactéria. Em cada poço foram adicionados 100 µL de caldo Müeller-Hinton estéril.

Conforme Quadro 01, as linhas de "A" a "E" até as colunas 1 a 9 foram utilizadas para os testes com o extrato em análise, perfazendo-se assim um teste em

quintuplicata. Nos poços da coluna 1 foram colocados 100,0 µL do extrato vegetal a 2.000 µg mL⁻¹, para se obter uma concentração de 1.000 µg mL⁻¹ em cada poço. De cada um destes poços foram pipetados 100,0 µL e transferidos para o poço seguinte (coluna 2), resultando em uma diluição na qual a concentração foi reduzida a metade.

O mesmo procedimento foi repetido até os poços da coluna 9, no qual foi obtida a menor concentração do extrato, 3,9 µg mL⁻¹. Em seguida foram adicionados 10,0 µL da suspensão bacteriana previamente preparada em cada poço. Cada microplaca foi utilizada para se testar uma única espécie de bactéria. As microplacas então foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas em temperatura de 35 ± 2 °C.

Quadro 1. Esquema do método de microdiluição em microplaca para cultura microbiana

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1000,0 µg/mL	500,0 µg/mL	250,0 µg/mL	125,0 µg/mL	62,5 µg/mL	31,25 µg/mL	15,6 µg/mL	7,8 µg/mL	3,9 µg/mL	CB	CM	CE
A	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
B	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
C	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
D	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
E	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	EMB	MB	M	ME
F	CP	CP	CP	CP	CP							
G	CP	CP	CP	CP	CP							
H												

EMB = Extrato + Meio + Bactéria; CB = Controle da Bactéria; MB = Meio + Bactéria; CM = Controle do Meio; M = Meio; CE = Controle do Extrato; ME = Meio + Extrato; CP = Controle Positivo

Controle dos ensaios antibacterianos: As colunas 10 a 12 da microplaca, foram utilizadas para garantir a ausência de interferentes que alteram os resultados dos testes. Nos poços da coluna 10 foram inseridos o meio de cultura e 10,0 µL da suspensão bacteriana, o que constituiu o controle do microrganismo. Os poços da coluna 11 foram utilizados como controle do meio de cultura nos quais foi adicionado apenas o caldo Müeller-Hinton estéril. Nos poços da coluna 12 foram adicionados o meio de cultura e 100,0 µL da solução do extrato vegetal a 1.000 µg mL⁻¹ para verificar a ocorrência de alguma contaminação através do material vegetal. Os poços das linhas de F e G foram utilizados como controle positivo, utilizando os antibióticos ceftriaxona (30 µg mL⁻¹) e vancomicina (30 µg mL⁻¹), considerados como convencionais.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM): Após o teste de microdiluição, foram coletados 10,0 µL dos todos os poços que apresentaram inibição bacteriana e transferida para uma placa de Petri contendo agar Müller-Hinton, seguindo-se de incubação por 24 horas em estufa bacteriológica, à temperatura de 35 ± 2 °C. De acordo com o crescimento bacteriano foi estabelecida a CBM.

Todo o experimento microbiológico foi realizado em cabine de proteção biológica, previamente esterilizada por luz ultravioleta por 15 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obtenção do extrato e triagem farmacognóstica: Após todo o processo de extração obteve-se um rendimento do extrato hidroalcoólico de 4,1% (m/m) em relação à planta fresca. Este rendimento é satisfatório, visto que foi realizada uma extração bruta, ou seja, não específica para um determinado composto.

Quanto à triagem farmacognóstica foi detectada a presença de alcalóides, flavonóides, glicosídeos, fenóis, taninos e esteróides. Em estudo realizado por AMUSAN et al. (2007) também demonstraram a presença de compostos fenólicos em material desta planta, coletada em Suazilândia, África. A população deste país utiliza a *A. australe* para fins medicinais, o que reforça o seu potencial para produção de um medicamento fitoterápico. Os compostos secundários, como fenóis e taninos já foram apontados por alguns pesquisadores como sendo os responsáveis pela atividade antimicrobiana de extratos vegetais (SOUZA et al., 2007; SIMÕES et al., 2007).

Ensaio antibacterianos: Observou-se a inibição do crescimento bacteriano a partir da menor concentração do extrato vegetal, $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$, para as cepas de *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *B. cereus*. Para a cepa de *E. coli* a concentração inibitória mínima foi a de $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Não foi observada a presença de contaminação do meio de crescimento e do extrato vegetal, o que foi confirmado pelo resultado negativo do controle (coluna 11 e 12 respectivamente da microplaca). O controle da bactéria (coluna 10) apresentou resultado positivo o que mostrou a viabilidade dos testes realizados. E os controles com ceftriaxona ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$) e vancomicina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), (linhas F e G) se mostraram eficazes nas concentrações utilizadas.

Após a semeadura e incubação para determinação da concentração inibitória mínima, para os poços em que não se observou crescimento bacteriano, as replicações para placas com agar Mueller-Hinton não foi observado crescimento de nenhuma das bactérias utilizadas no experimento, demonstrando que a CIM foi similar à CBM para todas as cepas testadas.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados o extrato hidroalcoólico das folhas de *Acanthospermum australe* (Loerfl.) Kuntze possui características que podem viabilizar sua utilização como medicamento fitoterápico, em função da atividade antibacteriana, observada mesmo em baixas concentrações ($3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) e ao bom rendimento na extração (4,1% m/m).

AGRADECIMENTOS

À FAPES, CNPq, BNB, CAPES, UFES (PRPPG e PROEx) e a ONG Centro Comunitário Franco Rossetti, Pedro Canário, ES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMUSAN, O. O. G.; SUKATI, N. A.; DLAMINI, P. S.; SIBANDZE, F. G.. Some swazi phytomedicines and their constituents. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 267-272, 2007.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. **Revista Científica da UFPA**, v. 4, p. 1-19, 2004.

BELINELO, V. J.; TEIXEIRA, A. L.; FERREIRA-ALVES, D. L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, G. T.; STEFANI, G. M.. Síntese de amidas derivadas do ácido 6alfa,7beta-dihidroxivouacapan-17beta-óico isolado dos frutos de *Pterodon polygalaeflorus* Benth (Leguminosae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 37-44, 2001.

GONÇALVES, D. M.; ARAÚJO, J. H. B.; FRANCISCO, M. S.; COELHO, M. A.; FRANCO, J. M. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 197-202, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002, 208p.

MARTINS, L. R. R.; MOURÃO, K. S. M.; ALBIERO, A. L. M. et al. Estudo morfoanatômico preliminar do caule e da folha de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze (Asteraceae-Heliantheae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 42-52, 2006.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard. 8. ed. Wayne: NCCLS, 2003.

OLIVEIRA, G. F.; FURTADO, N. A. J. C.; FILHO, A. A. S. et al. Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 381-384, 2007.

PACHECO, T. F.; CAMPOS, M. S. T.; SANTANA, A. S. O. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extrato aquoso de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae). **Enciclopedia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-10, 2011.

RODRIGUES V. E. G.; CARVALHO D. A.. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciencia Agrotecnologia**, v. 25, p. 102-123, 2001.

SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 241-244, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: UFSC, 2007.

SINGH, V. A new distributional record for *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze. **Current Science**, v. 42, p. 68-69, 1973.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J. M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

SOUZA, T. M.; MOREIRA, R. R. D.; PIETRO, R. C. L. R. et al. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71-75, 2007.

VIVOT, E. P.; CRUANES, M. J.. Actividades antimicrobiana y antiviral de extractos vegetales de algunas especies de la flora de Entre Ríos. **Ciencia, docencia y tecnologia**, n. 37, p. 177-189, 2008.