

Avaliação da atividade antimicrobiana e bioensaio toxicológico frente às larvas de *Artemia salina* Leach. do extrato seco da catuaba (*Trichilia catigua* ADR. JUSS.)

SILVA, A.C.¹; MACIEL, J.M.S.¹; LOPES, R.L.F.¹; MELO, A.F.M.¹; COIMBRA, C.G.O.¹

¹Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico (ASCES), Av. Portugal, 590, Caruaru – PE, Brasil. CEP: 55016-400. Email: robertalais-1993@hotmail.com

RESUMO: É frequente o debate sobre resistência microbiana. Com o intuito de encontrar novas alternativas terapêuticas para a resolução deste problema, o presente estudo objetivou determinar a atividade antimicrobiana do extrato seco da *Trichilia catigua* ADR. Juss. e avaliar sua toxicidade (CL₅₀). Conhecida popularmente como catuaba, é uma árvore que ocorre amplamente no Brasil, caracterizada pela população por seus efeitos afrodisíacos e tonificantes. O extrato deste vegetal foi obtido por maceração etanólica sendo sua atividade antimicrobiana avaliada pelo emprego da técnica de poços para determinação da concentração inibitória mínima e avaliação do poder inibitório. Observou-se que o mesmo não apresentou os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana frente às cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* e *Candida albicans*. Sobre a avaliação da toxicidade (CL₅₀), utilizou-se o bioensaio com *Artemia salina* Leach, obtendo-se uma concentração letal média de 3,13 mg/mL, o que caracteriza a catuaba como atóxica.

Palavras-chave: Plantas medicinais, toxicidade, antimicrobianos.

ABSTRACT: Evaluation of antimicrobial activity and toxicological bioassay front to the larvae of *Artemia salina* Leach. the dried extract of catuaba (*Trichilia catigua* ADR. Juss.) Often the debate on antimicrobial resistance. In order to find new therapeutic alternatives for this problem, this study aimed to determine the antimicrobial activity of dry extract *Trichilia catigua* ADR. JUSS. and evaluate their toxicity (CL₅₀). Popularly known as catuaba, is a tree that occurs widely in Brazil, characterized by the population for its aphrodisiac and toning effects. The extract of this plant was obtained by ethanol maceration and its antimicrobial activity evaluated by wells technique of employment for the determination of minimum inhibitory concentration and evaluation of the inhibitory power. It was observed that did not present the same compounds responsible for microbial inhibition front of the strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* and *Candida albicans*. About evaluation of toxicity (CL₅₀) was used bioassay with *Artemia salina* Leach, obtaining a median lethal concentration 3,13 mg/mL, which characterizes catuaba as non-toxic.

Key words: Medicinal plants, toxicity, antimicrobial.

INTRODUÇÃO

As bactérias são parte integral e inseparável da vida na terra. Elas são encontradas em qualquer lugar, revestem a pele, as mucosas e cobrem o trato intestinal dos homens e dos animais. Elas estão intrinsecamente ligadas às vidas de organismos e aos amplos ambientes em que habitam. Porque as bactérias têm um curto tempo de geração – minutos ou horas – elas podem responder rapidamente as mudanças do ambiente. Assim, quando os antibióticos são introduzidos no ambiente, as bactérias respondem tornando-se resistentes àquelas drogas (SANTOS, 2004).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2010), a resistência bacteriana a medicamentos deveria ser vista há muito tempo como um problema de saúde pública, principalmente no âmbito hospitalar, já que é uma prática não muito recente.

A atividade biológica de plantas medicinais tem sido objeto de intensa investigação científica, pois estas produzem uma grande variedade de compostos, produto do metabolismo secundário, que conferem propriedades antimicrobianas (ALVES *et al.*, 2000; ADAM *et al.* 1998; DUARTE *et al.*, 2005).

Os medicamentos à base de plantas (MBP), orais e tópicos, tornaram-se algumas das terapias alternativas mais utilizadas. Grande parte inclui substâncias vegetais usadas há vários séculos, na medicina popular (PINTO, 2013).

A *Trichilia catigua* ADR. JUSS. (Família *Meliaceae*), popularmente conhecida como catuaba, é uma árvore de três a oito metros de altura, ramificada, possui copa densa quase até o solo e ocorre amplamente no Brasil, de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul. Suas propriedades medicinais foram relatadas pelos indígenas e comunidades locais como digestiva, tônica e purgativa (VELASCO *et al.*, 2008).

A catuaba é conhecida pela população por seus efeitos afrodisíacos e tonificantes. Além de ser relatadas indicações farmacológicas para tratamento do sono agitado, instabilidade emocional, atividades antiviral e antibiótica, dificuldade de raciocínio e concentração, moléstias do estômago e auxiliar no tratamento de neurastenia (MANABE *et al.*, 1992). Os constituintes químicos da catuaba são: catuabina, óleos essenciais, taninos, saponinas, esteróides, matéria resinosa e flavonóides (MING & CORREA JR, 2002).

Apesar das plantas possuírem muitos usos terapêuticos, a população desconhece seus efeitos tóxicos. Sobre este aspecto, é necessário que se realize testes que avaliem os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das

substâncias (FORBES & FORBES, 1994). Para tanto, muitos ensaios podem ser utilizados, como o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, que foi desenvolvido para detectar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER *et al.*, 1982).

Artemia salina é um microcrustáceo da ordem Anostraca, utilizado como bioindicador de toxicidade. Esta espécie é utilizada em testes de citotoxicidade devido à sua capacidade de formar cistos dormentes, fornecendo desse modo material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manterem culturas contínuas de organismo-teste. É uma espécie de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico (CALOW, 1993).

De grande oferta na região, porém ainda pouco estudada, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato seco da catuaba (*Trichilia catigua* Adr. Juss.) frente à microrganismos patogênicos e determinar sua toxicidade utilizando o bioensaio com *Artemia salina*.

MATERIAL E MÉTODO

Material vegetal

O extrato seco da casca da *Trichilia catigua* Adr. Juss. foi obtido mediante compra de distribuidora farmacêutica registrada pela ANVISA, acompanhado de laudo técnico.

Para permitir uma melhor manipulação do extrato nos testes, o extrato seco da *Trichilia catigua* Adr. Juss. que foi obtido mediante compra de distribuidora farmacêutica ainda foi pesado e colocado em maceração com uma solução extrativa etanólica durante sete dias. Depois foi filtrado, onde se obteve o extrato bruto fluido. Este teve a solução extrativa rotaevaporada à temperatura de 50°C. Após a evaporação de 95% da solução, o

extrato foi colocado em um dessecador a vácuo, até a secura total, sendo realizada pesagem do extrato bruto seco final. Os valores obtidos na pesagem foram utilizados para cálculo do rendimento de matéria seca da *Trichilia catigua* Adr. Juss , que foi de 2,34% do extrato bruto.

Análise Microbiológica

Cepas utilizadas

Para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto seco obtido da *Trichilia catigua* Adr. Juss. foram utilizados os microrganismos de isolados clínicos e linhagens padrão ATCC. As cepas utilizadas foram *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Shigella spp.* (obtida de isolado clínico), *Streptococcus spp.* (obtida de isolado clínico), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Salmonella* (obtida de isolado clínico) e *Cândida albicans* (ATCC 10231).

Os microrganismos foram repicados em ágar Müeller Hinton e incubados a 37°C por 24 horas antes do teste. Para o preparo do inóculo, as culturas de cada microrganismo foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2mL de salina estéril até obtenção de turbidez equivalente a escala 0,5 de McFarland.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação foi realizada pela técnica de poços, conforme metodologia de Kruger (2006). Os microrganismos citados foram inoculados através de semeio por esgotamento.

Em cada placa semeada foram confeccionados quatro poços de 6 mm de diâmetro, para a inserção de 50µL do extrato em diferentes concentrações, a partir de diluições em

50%, 25%, 12,50% e 6,25% com relação à amostra inicial do extrato bruto. O procedimento foi realizado em duplicata (USP, 2012).

Após essa etapa, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, com posterior mensuração dos halos em milímetros (mm) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo esta entendida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano (KONEMAN, 2008).

Poder Inibitório

O Poder Inibitório identifica se houve ou não a formação de halos inibitórios ao redor dos discos que contém o extrato da catuaba, os quais foram impregnados no meio Ágar Muller-Hinton contendo a bactéria semeada. Posteriormente, foi verificado o diâmetro dos halos que se formaram ao redor dos discos contendo o extrato e avaliado se as concentrações presentes nos mesmos, caracterizou a bactéria como sensível, intermediária ou resistente para determinadas concentrações (TORTORA, 2012).

Avaliação da CL₅₀

A determinação da CL₅₀ seguiu o descrito por Meyer (1982). Os ovos de *A. salina* Leach foram incubados em solução marinha em um recipiente de plástico, o qual é mantido sob iluminação artificial (lâmpada de 40 W), temperatura controlada e constante de 28°C, por um período de 48 horas. Após este procedimento, obtém-se o estágio de metanúplio, modelo padrão para testes de toxicidade devido a sua maior sensibilidade.

Foram utilizados 50 mg do extrato bruto, nos quais foram adicionados 1 mL de Tween 80 a 5% para ajudar a solubilização do mesmo. As soluções foram homogeneizadas e o volume completado para 5mL com água salinizada a pH = 8,0.

Destas soluções foram retiradas alíquotas de 500 µL, 375 µL, 250 µL, 125 µL, 50 µL e 25 µL que foram transferidas para tubos de ensaio que já continham 5mL de água do mar, obtendo-se concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL para cada extrato. O teste foi feito em triplicata. As amostras foram submetidas à iluminação artificial e temperatura controlada e constante de 28°C, durante 24 horas. Após esse período, foi realizada a contagem do número de larvas vivas e mortas e os dados tabulados utilizando o programa Microcal Origin 4.1.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Segundo Piaz *et al.* (2012), a catuaba (*Trichilia catigua* Adr. Juss.) é rica em diversos compostos, dentre eles, os limonóides, um tipo de terpenóide típico da sua família *Meliaceae*. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, tais como antiinflamatória, citotóxica, antialimentar e antimicrobiana. Manabe *et al.* (1992) também relataram em seu trabalho a atividade antibiótica da catuaba.

Sobre a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato seco da casca da catuaba, verificou-se que nenhuma das diluições (50%, 25%, 12,50% e 6,25%) inibiu o crescimento das cepas testadas, caracterizando-se pela ausência de halo ao redor dos poços, no caso do teste de concentração inibitória mínima, e ausência na formação de halo ao redor dos discos com o extrato impregnado, no caso do teste de poder inibitório. Uma possível explicação para não inibição pode estar no fato de que os constituintes antimicrobianos não estejam presentes na casca do vegetal.

Quanto à determinação da toxicidade, a contagem de *A. salina* Leach vivas e mortas foi tabulada no Programa Microcal Origin 4.1, obtendo-se os valores das variáveis A (concentração do extrato) e B (número de indivíduos vivos), a partir dos quais se

calculou a CL₅₀, e disponibilização do gráfico Concentração Letal Média (CL₅₀) da catuaba com os eixos % de vivos X Concentração (µg/mL).

O bioensaio com este microcrustáceo avalia a concentração letal média (CL₅₀), ou seja, a concentração necessária para causar a morte de 50% de uma amostra em estudo. O ensaio com *A. salina* apresenta reduzido e específico grau de tolerância a um determinado fator ambiental, de modo que apresenta uma resposta nítida em face de pequenas variações na qualidade do ambiente.

Observando o gráfico da figura1 e CL₅₀ com valor de 3,13 mg/mL, a *Trichilia catigua* Adr. Juss foi considerada atóxica segundo MEYER *et al.*, (1982), visto que nas concentrações mais elevadas do extrato (1000 e 750 µg/mL), a porcentagem de larvas de artemia salina vivas foi significativa.

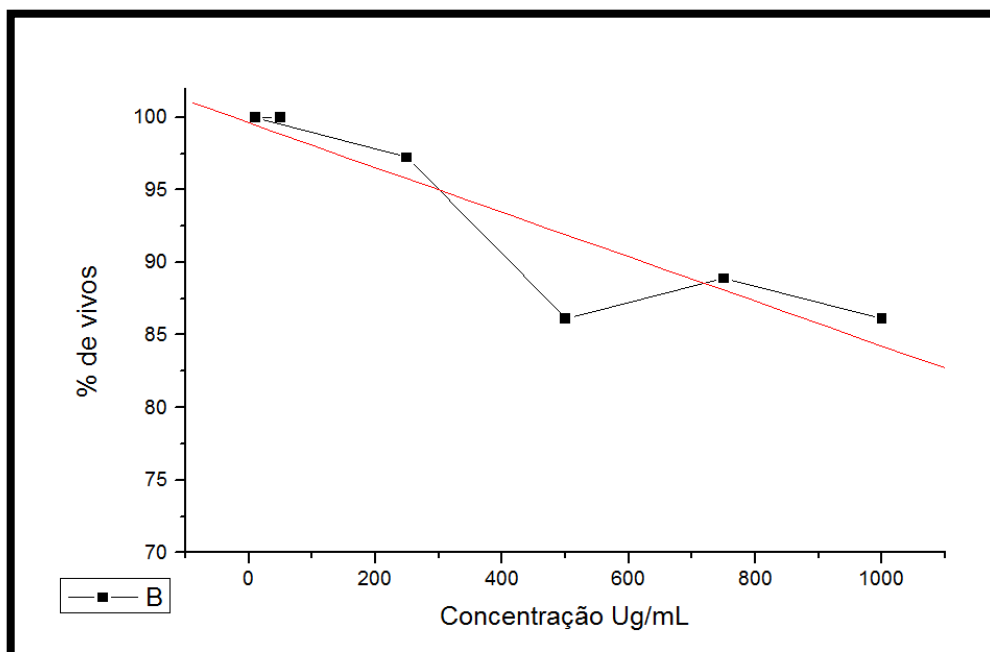


Figura. 1. Gráfico - Concentração Letal Média (CL₅₀) da *Trichilia catigua* ADR. JUSS

Estes resultados demonstram que o extrato bruto seco da casca da espécie *Trichilia catigua* Adr. Juss não apresenta potencial de aproveitamento como agente antimicrobiano e ausência de toxicidade nas condições testadas, significando, este último, maior conforto, segurança e melhor qualidade de vida para seus usuários.

CONCLUSÃO

O extrato seco da casca da *Trichilia catigua* Adr. Juss (catuaba) não apresentou atividade antimicrobiana. Além disso, apresentou CL₅₀ de 3,13 mg/mL, resultado que classifica a catuaba como atóxica frente ao teste com larvas de artemia salina. Para tanto, são necessários novos testes que possam avaliar outras possíveis atividades deste vegetal.

REFERÊNCIAS

ADAM, K. et al. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **J. Agric. Food Chem.** Tessalônica, v. 46 n.5, p. 1739-1745, Abril, 1998.

ALVES, T.M. de A. et al. **Biological screening of Brazilian medicinal plants.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, May/Jun. 2000.

CALOW, P. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. **Handbook in cytotoxicology.** Oxford: Blackwell Scientific Publication, v. 1, p. 1-5, 1993.

DUARTE, M.C.T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** v. 97 n. 2, Fev. 2005.

FORBES, V.E.; FORBES, T.L. Ecotoxicology in theory and practice. **Londres: Chapman and Hall**, 247 p., 1994.

KONEMAN, E.W. et al. **Koneman Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6ª. Edição. Editora Guanabara Koogan, 2008.

KRUGER, M.F. **Controle de Listeria monocytogenes em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de São Paulo, 2006.

MANABE, H. et al. Effects of Catuaba extracts on microbial and HIV infection. **In Vivo**. v. 6, n. 2, Mar/Apr, 1992.

MEYER, B.N. et al. Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **J. of Medic. Plant Research**. v. 45, p. 31-34. 1982.

MING, L.C.; CORREA JÚNIOR, C. Geographic distribution and associated environments characterization of trichilia catigua A. Juss - Meliaceae in Santa Catarina State – Brazil. **Acta Horticulturae**, v. 569, p. 91-94, 2002.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **OMS adverte sobre doenças resistentes a medicamentos**. Disponível em: <http://unicrio.org.br/oms-adverte-sobre-doencas-resistentes-a-medicamentos>. 2010. Acesso em 21 de abril, 2014.

PIAZ, F.D. et al. Structural characterization of tetranortriterpenes from *Pseudocedrela kotschy* and *Trichilia emetica* and study of their activity towards the chaperone Hsp90. **Phytochemistry**, v. 75, p. 78–89, março - 2012.

PINTO, M. da R. **Utilização de Materiais de Origem Vegetal em Produtos Farmacêuticos e Cosméticos de Aplicação Cutânea.** Dissertação apresentada na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Lisboa, 2013.

SANTOS, N. de Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto - enferm.**, Florianópolis , v. 13, n. spe, p. 64-70, 2004 .

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 10° ed. Porto Alegre, Artmed, 934 p., 2012.

USP 35. **THE UNITED STATES Pharmacopeia.** 30 ed. Rockville, 2012.

VELASCO, M.V.R. et al. Desenvolvimento e teste preliminar da estabilidade de formulações cosméticas acrescidas do extrato comercial de *Trichilia catinguá* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.2, 2008.

