

Desenvolvimento farmacotécnico de gel dermatológico de *Erythrina velutina* Willd. (Mulungu) e determinação de sua atividade antimicrobiana

Thamara Ravana da Silva^{1*}, Meyrilane Torres de Lima¹, Paula Priscila Paixão da Silva¹ & Cynthia

Gisele de Oliveira Coimbra²

¹ Acadêmicas do curso de Farmácia do Centro Universitário Tabosa de Almeida ASCES-UNITA, Caruaru-PE, Brasil

² Docente do curso de Farmácia do Centro Universitário Tabosa de Almeida ASCES-UNITA, Caruaru-PE, Brasil

* Contato: Thamara Ravana da Silva, Avenida Portugal n.897 Universitário-Caruaru-PE CEP – 55016-400
E-mail: thamara_ravana@hotmail.com

RESUMO

A *Erythrina velutina Willd.* é uma planta medicinal com atividade sedativa e calmante. Este estudo buscou desenvolver a forma farmacêutica de um gel dermatológico de carbopol do extrato etanólico avaliando também a atividade antimicrobiana do extrato bruto seco do pó da casca pela determinação de CMI e CIMA e determinar o potencial tóxico contra *Artemia salina*. O extrato bruto da casca de *Erythrina velutina Willd* apresentou-se atóxico (CL50=13.762,75µg/mL) e não ativo frente a nenhum dos micro-organismos testados, diferente do relatado em literatura prévia. O gel produzido apresentou maior espalhabilidade quando mantido sobre refrigeração; não houve alteração de pH ou separação de fase quando submetido a nenhuma das condições testadas. O extrato de *E. velutina* não pode ser indicado para o combate a infecções, mas é atóxico e estável, podendo ser utilizado com fins terapêuticos previamente relatados na literatura “como anestésico e calmante”.

Palavra-chave: *Erythrina velutina Willd.*, Fabaceae, Toxicidade

ABSTRACT

Erythrina velutina Willd. It is a medical plant with sedative and calming activity. This study sought to develop the pharmaceutical form of a dermatological gel made with the carbopol of ethanol extract also evaluating the antimicrobial activity of dry crude extract of the bark powder for determination of CMI and UP and determine the potential toxicity against *Artemia salina*. The crude extract of *Erythrina velutina* Willd bark presented itself non-toxic (LC50 = 13.762,75µg / ml) and not active against any of the tested microorganisms, differently of the reported in previous literature. The produced gel showed greater spreadability when kept on cooling; no change in pH or phase separation when subjected to any of the tested conditions. *E. velutina* extract may not be suitable for fighting infections, but is non-toxic and stable and can be used with therapeutic purposes as previously reported in the literature "as an anesthetic and soothing."

Keywords: *Erythrina velutina* Willd, Fabaceae, Toxicity.

INTRODUÇÃO

Durante séculos, o índice de consumo de plantas medicinais vem crescendo em todo o mundo, a prática do consumo de fitoterápicos vem sendo construída a partir de observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais, mesmo não sendo conhecidos seus constituintes químicos. Diversas partes das plantas são utilizadas na fitoterapia, como as raízes, cascas, frutos e sementes. A decocção ou infusão são as principais formas de preparação de chá, sendo ele o mais utilizado (Rezende & Monteiro, 2002; Maciel et al., 2001).

A *Erythrina velutina* Willd., pertence a família Fabaceae, presente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, a mesma possui cerca de 110 espécies das quais 70 são nativas das Américas . No Brasil constar aproximadamente doze espécies catalogadas, dentre elas se destacam *E. velutina*, originária do nordeste e o *E. mulungu*, nativa do Sudeste (Craveiro et al., 2008; Virtuoso et al.,2005).

Conhecida popularmente como mulungu, suinã, canivete, corticeira, mulungu-da-caatinga, pau-de-coral, sanaduí, sananduva, dentre outros. É bastante utilizada na prática de diversos fins terapêuticos, desempenhando principalmente papel hipotensivo e sedativo. Suas características são altura entre 8 metros e 12 metros, seu fruto produzido é do tipo legume, suas flores são de coloração vermelha e as folhas resistentes á seca, devido a fixar nitrogênio (Bona et al., 2011; Lopes et al., 2011).

Na medicina popular, principalmente em regiões do Nordeste, tem como finalidade o tratamento de hemorroidas e verminoses, atua como calmante e sedativo quando aplicada a infusão das cascas da espécie. O cigarro como odontálgico é usado como anestesia local, quando atribuído ao fruto seco (Lopes et al., 2011; Craveiro et al., 2008).

Considerando-se os estudos sobre o potencial microbiológico e toxicológico da *Erythrina velutina*, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o potencial da atividade antibacteriana e

toxicológica do extrato bruto seco do pó das cascas da planta, e desenvolver uma formulação a base de gel dermatológico incorporando o extrato.

A *Artemina salina* é uma espécie de microcrustáceos, que é utilizada devido a sua finalidade de avaliar os testes citológicos diante à sua capacidade de formar cistos dormentes. É bastante utilizada nos laboratórios por ser de baixo custo econômico e de fácil manuseio. Esse ensaio toxicológico tem como intuito quantificar a toxicidade relativa das substâncias e avaliar ou prever os efeitos tóxicos em sistemas biológicos (Lima et al., 2009; Forbes & Forbes, 1994; Calow, 1993).

Os géis por serem de simples aplicação e fácil espalhamento, não apresentam características gordurosas e podem estar incorporados a ativos hidrossolúveis e lipossomas, são designados principalmente a produtos cosméticos e como base dermatológica. A forma farmacêutica gel, apresenta vários benefícios por apresentar menor grau de intoxicação com a disponibilidade de aplicação em diversos locais (Lopes et al., 2006; Corrêa et al., 2005).

Os fitoterápicos apresentam uma vasta vantagem quando aplicados sobre a pele. Os benefícios vão desde a proteção contra a acidez do pH do estômago; permite o controle de absorção; diminui a toxicidade sistêmica e reduzida irritação; reduz o efeito de primeira passagem e interações com alguns fármacos (Ferreira, 2002).

A finalidade do trabalho é de determinar o potencial antimicrobiano e seu desenvolvimento farmacotécnico da *Erythina velutina* Willd por meio de um experimento com o extrato bruto seco da casca da planta a cima citada frente a algumas bactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As cascas do tronco em forma de pó da *Erythrina velutina* Willd. (Fabaceae) foram adquiridas pela indústria. Em fornecedores idôneos (Pharma Nostra), em Março de 2015, o extrato seco tem como lote 15042168C.

Preparação do Extrato Bruto Seco

O pó das cascas da planta foi submetido à extração com álcool etílico absoluto a 99,9°C num processo de maceração por sete dias. O solvente foi removido na estufa climatizada (BOD), e dessecador obtendo-se o extrato bruto seco das cascas.

Microrganismos Testados

A ação antimicrobiana foi procedida *in vitro* sendo utilizadas sete cepas de microrganismos sendo seis cepas de bactérias e uma de levedura. As cepas bacterianas utilizadas foram: *Salmonella* sp. , *Proteus* sp., *Escherichia coli* sp. , *KLebsiella pneumoniai* sp. , *Staphylococcus aureus* ATCC 3613, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 7546 e a levedura *Candida albicans* ATCC 76615.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Para a realização da avaliação da ação antimicrobiana frente aos microrganismos foi utilizados três métodos: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) do Extrato bruto seco da *Erythrina velutina* Willd (Bauer et al., 1969; Gebara et al., 1996).

A Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) do extrato da *Erythrina velutina*, frente às bactérias patogênicas supracitadas, foi realizada a partir da técnica de poços. Os inóculos foram preparados em solução salina de soro fisiológico, a partir de semeio por esgotamento feito anteriormente, para controlar a concentração bacteriana foi utilizada a escala 0,5 de Marc-Farland. Com o auxílio do swab, foram semeadas com o inóculos toda a extensão das placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. Em cada placa semeada foram confeccionados quatro poços de 6

mm de diâmetro, para a inserção de 50µL de extrato bruto obtido em diferentes concentrações, partindo de soluções de 100% inicialmente formada a partir de 1,0g do extrato vegetal e diluído em 10mL de soro fisiológico, seguido pelas diluições 50%, 25%, 12,50% do extrato bruto seco da *Erythrina velutina Willd.*. Após essa etapa, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior mensuração dos halos em milímetros (mm).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) da bactéria ao tubo de vidro foi determinada na presença de sacarose a 5% em 3,5mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI), incorporou 1mL das concentrações de 100% que foi inicialmente preparada a partir de 1,0g do extrato e diluir em 10mL de soro fisiológico, seguida pelas diluições consecutivas de 50%, 25% e 12,5% do extrato em tubos de vidro respectivos para cada diluição, foi adicionado 0,5mL de inóculos das cepas, os tubos foram cultivados a 37°C na estufa com inclinação de 30°C, os inóculos foram previamente preparados em caldo Mueller-Hinton, por um período de 24 horas alcançando um inóculos de 10⁶ UFC/mL, equivalente a 20 µL de suspensão bacteriana. A leitura foi realizada através da observação visual da aderência da bactéria às paredes do tubo após a agitação com a coloração de azul de metileno.

Avaliação da Atividade Tóxica

Foi avaliada a atividade tóxica do extrato diante do teste de letalidade frente à *Artemia salina* Leach, de acordo com o método proposto por Meyer et al. (1982). Posteriormente a eclosão larvas de *A. salina* foram separadas em 7 grupos com 10 a 13 larvas. O primeiro grupo recebeu a solução controle contendo água salina. Os outros 6 grupos respectivamente receberam diferentes concentrações (1000µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL) do extrato do mulungu constituídas a partir de 50mg da substância que está sendo analisada onde adicionou-se 5mL de água salina, os testes foram realizados em triplicata. Estes grupos foram colocados por um período de 24 horas sobre iluminação artificial. Após este período, foi contabilizado o número de larvas vivas e mortas (Siqueira et al., 2007; Meyer et al., 1982; Finney, 1971).

PREPARO DO GEL DERMATOLOGICO

Preparo das Formulações

Para a formulação do gel foram usados os seguintes constituintes: Carpobol® (2,5g), Aminometilpropanol (AMP) (2,0mL), água destilada e a incorporação do extrato seco da *Erythrina velutina Willd.* (0,04g), onde estão presentes alguns componentes ativos da planta. Posteriormente a manipulação, ambos foram divididos em triplicata nas suas respectivas embalagens de plástico fechados, todas identificadas e posteriormente expostas nas condições de estresse estabelecidas. Estas condições foram na estufa a 37°C, geladeira a 5°C e temperatura ambiente para que possa ser comparada com as demais amostras, foram efetuados os testes organolépticos e ensaios físico-químicos e a determinação da espalhabilidade.

Na realização dos estudos de estabilidade foram separadas amostras em triplicata com 50mg cada do produto acabado, onde antes da realização dos testes uma amostra do produto foi submetida ao teste de centrifugação a 3500 rpm durante 30 minutos.

Teste organoléptico

Foram determinados aspecto, cor, odor e separação de fases dos três ambientes.

Teste físico-químico

Foram analisados o pH, centrifugação e densidade. Para a determinação do pH utilizou-se papel de tornassol Merck (pH 0,0 a 14,0). A avaliação da estabilidade diante da centrifugação foi utilizado 1 g da amostra em estudo, centrifugando-a a 3500 rpm, durante 30 minutos. A densidade aparente do gel foi definida através da variação do volume de água destilada na proveta foi empregado 5g do extrato analisado, para desenvolvimento da técnica.

Determinação da espalhabilidade

Para desenvolvimento da técnica foi empregador placa-molde circular de vidro com orifício central de 1,0 cm de diâmetro onde foi colocada sobre uma placa suporte de vidro (20 cm x 20 cm)

posicionado sobre uma escala milimetrada. A amostra foi introduzida no orifício da placa-molde e preenchida com o auxílio de uma espátula, a placa-móvel foi retirada cuidadosamente e sobre amostra foi depositado uma placa de vidro de peso (297g). Após um minuto foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em posições horizontal e vertical, com o auxílio do papel milimetrado e depois calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se, sucessivamente outras placas de vidro com pesos 673g, 1135g, 1689g, 2470g e 3441g em intervalos de um minuto de uma placa para outra (total de 6 placas). A espalhabilidade das amostras foi determinada em função do peso adicionado, de acordo com a equação abaixo. Knorst (1991), apud Borghetti, *et al.* (2006).

$$Ei = d^2 \times \pi / 4$$

Em que: Ei = espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetro quadrado (mm^2); $\pi = 3,14$ e d = diâmetro médio em milímetro (mm).

RESULTADO E DISCUSSÃO

O extrato bruto seco da casca de *Erythrina velutina*, não apresentou atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos nos testes Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA), diferente do relatado por Virtuoso *et. al.* (2005) que informaram serem os extrato bruto e a fração hexânica da casca de *Erythrina velutina* serem ativos contra *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, como pode ser verificado na Tabela 1.

Tabela 1

Devido à considerável divergência entre os resultados do teste da atividade antimicrobiana realizados neste trabalho e os de Virtuoso *et al.* (2005), o teste que já era realizado em triplicata, foi

repetido seis vezes, a fim de eliminar qualquer possível dúvida, confirmando a ausência de atividade frente a tais cepas.

Os resultados diferiram do de Virtuoso et al. (2005) porque ele usou a fração hexânica da planta, que concentra mais compostos lipossolúveis do que o extrato bruto. Essa diferença nos resultados permite entender que os compostos ativos desta planta são lipossolúveis e que provavelmente a concentração no extrato bruto era muito reduzida, insuficiente para inibir qualquer um dos micro-organismos testados, conforme mostra a Tabela 2. Apesar disso, os halos das placas que Virtuoso et al. (2005) exibiram no artigo apresentaram diâmetro insignificante, o que indica que a atividade, mesmo maior do que a observada no seu trabalho, não permite a consideração de que é ativo.

Tabela 2

O halo de inibição obtido pelo extrato bruto para *Streptococcus pyogenes* foram de 12 mm na concentração de 100% e na fração hexano o halo foi de 13 mm na concentração de 100%, para *Staphylococcus aureus* os halos foram de 7 mm na concentração de 100% e na fração hexano foram de 7 mm também na concentração de 100%, medidas próximas às do disco. Evidenciando uma baixa atividade, próximo ao halo do disco, que é de 6 mm. (Virtuoso et al.,2005).

Virtuoso et al. (2005) também relatou atividade moderada contra *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Proteus mirabilis* (ATCC43071), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 138883), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) no teste de concentração inibitória mínima (CIM) para o extrato bruto e fração hexano das cascas de planta.

No bioensaio de toxicidade, evidenciou após 24 horas de exposição sob iluminação artificial da *Artemia salina* Leach, verificou-se que não houve grande número de óbitos na maioria das concentrações e condições testadas da amostra de *Erythrina velutina*. Diante das circunstâncias, foi constatado experimentalmente que o extrato apresenta valores de CL50 µg/mL na faixa de

13.762,75 $\mu\text{g/mL}$, que designar que amostra analisada não indica uma toxicidade relevante ao teste da *Artemia salina* Leach (CL50), uma vez que a baixa toxicidade só é considerada as substâncias que tenham $\text{TAS} > 1000\mu\text{g/mL}$ ($1\mu\text{g/mL} = 1\text{ppm}$), em conformidade com o exposto na figura 1.

Figura 1

Em relação às características organolépticas na estabilidade da formulação do gel, realizadas no início e após cinco meses, apenas as amostras acondicionadas na estufa sofreram pequenas alterações em relação à coloração. As demais (mantidas à temperatura ambiente e sob refrigeração) apresentaram-se homogêneas, incolores e com odor característico da formulação. O tempo de realização dos testes físico-químicos foi equivalente aos testes anteriormente citados. O pH foi 6,0 em todas as amostras e não foi observada separação de fases ou sedimentação após a centrifugação. Quanto à densidade aparente, determinada utilizando-se o método de deslocamento, o resultado foi proporcional a 1,35 g/mL.

A espalhabilidade das amostras foram representadas nos gráficos 3 e 4. Este teste tem como propósito avaliar o tempo gasto da formulação para se expandir sobre a superfície aplicada, podendo assim identificar mudanças na consistência do produto. No gráfico são expostos os índices de espalhabilidade (y) e os pesos aplicados sobre a amostra (x).

Gráfico 3

Gráfico 4

A espalhabilidade é explícita com a amplificação das formulações destinadas a aplicações tópicas em determinado período de tempo em locais de ação, é um essencial atributo nas formas farmacêuticas (Knorst & Borghetti, 2006).

As amostras acondicionadas na geladeira apresentaram maior espalhabilidade tanto no primeiro dia de avaliação quanto após cinco meses após o preparo. Já as amostras de temperatura ambiente e estufa denota espalhabilidade semelhantes, apresentando índice de espalhabilidade menor.

A espalhabilidade máxima foi considerada sendo o ponto no qual a adição de massa acarretou alterações significativas nos valores da mesma (Heberlé; Lange & Milão, 2008).

Devido a isso é possível verificar também um aumento do Ei de todos os géis após o período de cinco meses, mas com a manutenção dos perfis verificados anteriormente. A elevação do Ei com o tempo pode ser explicado devido à incorporação do extrato bruto na formulação do gel, sua estabilidade sofre uma variação (Florence & Attwood, 2003).

A espalhabilidade do gel no uso tópico tem como intuito avaliar as alterações do produto podendo apresentar facilidade ou dificuldade na aplicação. Quanto à avaliação sensorial tátil antes do estudo, a formulação retratou adequada, no decorrer do teste ao final não apresentou nenhuma alteração visível (Bugnotto et al., 2016).

CONCLUSÕES

A não toxicidade do extrato bruto de *Erythrina velutina* comprovada neste trabalho permite a expectativa de aproveitamento de suas propriedades anestésica e calmante, comprovadas na literatura, do princípio ativo de desta formulação tópica. A ausência de atividade antimicrobiana do extrato inviabiliza o uso da formulação como medicamento de escolha para o combate a infecções tópicas, mas a estabilidade comprovada para esta formulação e a atoxicidade do extrato é um indicativo de sucesso de terapias que o associem a formulações com atividade antimicrobiana ou mesmo como único medicamento em lesões não infectadas.

REFERÊNCIAS

- Bauer Aw, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology*. 45: 493-496, 1969.
- Bona AP, Batitucci MCP, Andrade MA, Riva JAR, Perdigão TL. Estudo fitoquímico e análise mutagênica das folhas e inflorescências de *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) através do teste de micronúcleo em roedores. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu. 14(2): 344-351, 2011.
- Bugnotto C, Soares G, Laporta LV, Alves MP, Schmidt CA, Limberger JB. Estudo de Estabilidade de Formulação Tópica Contendo Própolis. *Disc. Scientia*. 7(1), 1-12, 2016.
- Cordeiro MSF, Costa JKB, Lima CG, Júnior DCC & Melo AFM. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). *Revista Brasileira de Farmácia (RBF)*. 94(2): 148-153, 2012.
- Corrêa NM, Júnior FBC, Ignácio RF, Leonardi GR. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 41(1): 73-78, 2005.
- Craveiro ACS, Carvalho DMM, Nunes RS, Fakhouri R, Rodrigues AS, Silva FT. Toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *Erythrina velutina* em animais experimentais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(supl): 739-743, 2008.
- Ferreira AO. Guia Prático da Farmácia Magistral. 2.ed. Juiz de Fora: Editora Ferreira., 2002.
- Finney D.J. Probit analysis. 3. ed. London: Cambridge University Press, 1971. 333p.
- Gebara ECE, Zardetto CGC, Mayer MPA. Estudo in vitro da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ*. 10(4): 251-256, 1996.

Heberlé G; Lange MK & Milão D. Avaliação da estabilidade e atividade antioxidante de uma emulsão base não-iônica contendo resveratrol. *Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 45(1): 145-151, 2008.

Knorst MT & Borghetti GS. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 42(4): 531-537, 2006.

Lima JM, Silva CA, Rosa MB, Santos JB, Oliveira TG, Silva MB. Prospecção Fitoquímica de *Sonchus oleraceus* e sua toxicidade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. *Planta Daninha*. 27(1): 7-11, 2009.

Lopes ARA, Vargas MLS, Cavalcanti ASS, Silva AG. Plantas e seus extratos – administração e biodisponibilidade de fitoterápicos aplicados na pele. *Natureza On Line*. 4(2): 62-66, 2006.

Lopes CRFR, Lima TC; Nunes RS; Damião Sousa DP. *Erythrina velutina* Willd. Fabaceae: uma revisão. *Revista de Biologia e Farmácia*. 6(2): 80-92, 2011.

Maciel MAM, Pinto AC, Júnior VFV, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. *Química Nova*. 25(3): 429-438, 2001.

Meyer BB, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen IB, Nichols DE, Mclaughlin JL. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Médica*. 45: 31-34, 1982.

Rezende HA & Monteiro MI. A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural. *Revista Escola Enfermagem – Usp*. 36(3): 282-288, 2002.

Siqueira JM, Ziminiani MG, Resende UM, Boaventura MAD. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *duguetia glabriuscula* - annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *artemia salina* leach. *Química Nova*. 24(2): 185-187, 2007.

Virtuoso S; Davet A; Dias JFG; Cunico MM; Miguel MD; Oliveira AB & Miguel OG. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosa). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15(2): 137-142, 2005.