

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE *FICUS CARICA* E *POLYGALA SPECTABILIS*

(Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts of *Ficus carica* and *Polygala spectabilis*)

Lew Kan Sprenger, Elane Guerreiro Giese, Jeannie Nascimento dos Santos, Marcelo Beltrão Molento

¹Correspondência: lew.sprenger@gmail.com

RESUMO: O objetivo foi avaliar a eficácia de diferentes formulações de fitoterápicos candidatos a antimicrobianos, produzidos a partir de folhas de caamembeca (*Polygala spectabilis* - EFC) e figo (*Ficus carica* - EFF). Os fitoterápicos foram produzidos com 30 dias de percolação a 4°C e lyofilizados, sendo posteriormente utilizados para realizar a marcha fitoquímica, o teste de toxicidade e o ensaio antioxidant. O bioensaio de ação antibacteriana foi realizado frente a *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* utilizando diluições em caldo com concentrações exponenciais (20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ a 2560 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) dos extratos. Nas análises fitoquímicas, foram evidenciados diversos compostos com propriedades antimicrobianas. A atividade antioxidante mensurada em 640 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, em relação ao ácido ascórbico, do EFC foi de 68,4% ao passo que para o EFF foi de 89,9%. O EFF teve eficácia, frente a todas as bactérias testadas, com uma concentração bactericida mínima (CBM) de 1280; 2560; 1280 e 320 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, para *C. perfringens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente, todavia o EFC só agiu frente a *S. aureus*, com CBM de 2560 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Os resultados obtidos nos testes bioquímicos, juntamente com os encontrados nos testes *in vitro*, evidenciaram que o EFF é um candidato a antimicrobiano.

Palavras-chave: Controle alternativo, Fitoterapia, Resistência microbiana

ABSTRACT: The objective was to evaluate the antimicrobial effectiveness of different formulations of herbal candidates, produced from leafs of caamembeca (*Polygala spectabilis* - EFC) and common fig (*Ficus carica* - EFF). Extracts were produced with 30 days of percolation at 4°C and lyophilized; subsequently they were used to perform the phytochemical march, toxicity test and antioxidant test. The antibacterial bioassay was performed against *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* using dilution with exponential concentrations (20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ -2560 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) of the extracts. Several compounds with antimicrobial properties were determined in phytochemical analysis. The antioxidant activity measured at 640 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, compared to the ascorbic acid was 68.4% for the EFC while for the EFF was 89.9%. The EFF was efficacious in different concentrations, against all bacteria tested, with the minimum bacterial concentration (MBC) of 1280; 2560; 1280 e 320 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, to *C. perfringens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, however the EFC only acted against *S. aureus*, with 2560 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ MBC. The results of the biochemical tests, along with those found in *in vitro* tests showed that the EFF may be considered as an antimicrobial candidate

Key Words: Alternative methods, Herbal medicine, Microbial resistance

INTRODUÇÃO

Durante o processo de civilização, as comunidades iniciaram a descoberta e cultivo de espécies vegetais que poderiam ser úteis na sua vida, como por exemplo as plantas medicinais (Leão et al., 2007). Mesmo com a evolução da indústria farmacêutica, existe atualmente problemas na assistência médica e na logística medicamentosa brasileira. Para contornar esta situação, medicamentos produzidos a base de extratos vegetais, vêm sendo utilizados com bons resultados, frente a diversas afecções infecciosas e parasitárias, causadas por nematódeos gastrintestinais, carrapatos, bactérias e fungos. Os fitoterápicos são de fácil obtenção, além de possuírem baixo custo e serem, geralmente, atóxicos no meio ambiente (Sprenger et al., 2015). O Brasil é considerado privilegiado quanto a exuberância desses compostos, pois abriga mais de um quarto da flora mundial conhecida (Sousa et al., 2013).

A Floresta Amazônica apresenta uma grande diversidade vegetal, com diversas plantas com propriedades farmacêuticas. Muito embora, o caamembeca (*Polygala spectabilis*) e o figo (*Ficus carica*) estejam entre as plantas mais populares e estudadas, sendo que ambas possuem atividades anti-helmíntica, anti-inflamatória, antioxidante e antitussígeno em humanos (Leão et al., 2007; Sousa et al., 2013), estudos na área veterinária ainda são necessários.

A situação de patógenos apresentando resistência frente aos antimicrobianos utilizados rotineiramente na clínica médica veterinária é alarmante. Entre as bactérias que apresentam mais relatos de falha no tratamento estão o *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (D'Lima et al.,

2012). Estas bactérias estão envolvidas em inúmeros processos infecciosos, de grau leve a grave, como em enfermidades do canal auditivo, cutâneas, gastrintestinais e respiratórias (Quinn et al., 2011).

Tendo em vista a crescente seleção de bactérias resistentes e a falta de opções medicamentosas para combater estes patógenos, o objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes formulações de fitoterápicos, produzidos a partir de folhas de caamembeca e figo, contra *C. perfringens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Folhas frescas de caamembeca (*P. spectabilis*) e figo (*F. carica*) foram coletados de produtores no mercado Ver-o-Peso, Belém, PA, no mês de julho de 2014. O material foi identificado por meio de chaves de identificação botânica (Henderson, 1995). Após a colheita, as folhas foram secas a sombra e em temperatura ambiente, sendo posteriormente trituradas em moinho de facas.

Para a produção do extrato hidroalcoólico utilizou-se um frasco de cor âmbar, no qual foram colocados, separadamente, 72g de folhas de cada planta isoladamente com 720 ml de álcool etílico 70% (v/v). Em seguida, o conteúdo ficou 30 dias armazenado em refrigerador a 4°C, sob agitação periódica.

Após essa etapa, realizou-se a filtração, com auxílio de uma bomba de vácuo em funil com papel filtro para um frasco tipo Kitasato. Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida à temperatura inferior a 30°C e posteriormente foram liofilizados. O rendimento obtido em relação as folhas de caamembeca foi de 4,98% e para as folhas de figo foi de 5,13%.

Os fitoterápicos foram diluídos em água destilada na concentração de 10mg/ml, para a realização da determinação dos seguintes metabólitos (Matos, 1997): fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonóides, catequinas, leucoantocianidinas, esteróides, triterpenos, saponinas, resinas e alcalóides. A dosagem de fenóis totais foi realizada pelo teste de Folin-Ciocalteu (McDonald et al., 2001). As absorbâncias dos extratos foram comparadas ao padrão de ác. gálico (1 a 50 µg/ml).

A atividade sequestrante do radical DPPH foi determinada de acordo com a metodologia de Blois (1958), com modificações. Em microtubos tipo *Eppendorf* foram colocados 300 µl dos extratos em diferentes concentrações (40-640 µg/ml) junto a 100 µl de solução etanólica de DPPH (0,1 mM). Para o branco da amostra foi adicionado 100 µl de etanol (EtOH) ao invés do DPPH, enquanto que no branco do método foi utilizado 300 µl EtOH no lugar das amostras.

A solução foi misturada em agitador e posteriormente se transferiu 200 µl do preparado para uma placa de 96 poços. O preparado foi incubado no escuro, sob temperatura ambiente por 30 min. Decorrido esse tempo, a absorbância de cada solução foi mensurada em espectrofotômetro a 515 nm. Para o cálculo do efeito foi usada a seguinte fórmula:

$$AA (\%) = (ABS_{\text{controle}} - (ABS_{\text{amostra}} - ABS_{\text{BRamostra}})) \times 100 / ABS_{\text{controle}}$$

Onde, ABS_{controle} é a absorbância do controle, ABS_{amostra} é a absorbância das amostras incubadas com diferentes concentrações e $ABS_{\text{BRamostra}}$ é a absorbância do branco da amostra.

A atividade antioxidante dos extratos testados foi comparada com padrão do antioxidante comercial ácido ascórbico (vitamina C), o qual foi

preparado em etanol e utilizado nas mesmas concentrações dos extratos.

A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada seguindo a metodologia adaptada de Meyer et al. (1982). Ovos do microcrustáceo foram colocados em aquário contendo sal marinho artificial (38g/L) sob aeração constante e temperatura controlada (28°C). Após eclosão, foram transferidos dez metanáuplios para placas de 24 poços, contendo os extratos diluídos e sal marinho: DMSO (1% v/v), em concentrações variando de 31,75 a 8000 µg/ml. O controle positivo utilizou-se sulfato de quinidina. Os testes foram produzidos em triplicata. Após 24h de contato, realizou-se a contagem do número de larvas vivas. A partir desse valor foi calculada a CL_{50} . O critério de toxicidade dos extratos foi estabelecido de acordo com Déciga-Campos et al. (2007), sendo valores >1000 µg/ml (não tóxicos), ≥ 500 a ≤ 1000 µg/ml (fracamente tóxico) e < 500 µg/ml (tóxicos).

Todos os microrganismos foram obtidos da American Type Culture Collection (ATCC), sendo dois Gram-positivos: *C. perfringens* (ATCC 12919) e *S. aureus* (29213), e dois Gram-negativos: *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

As bactérias foram inoculadas em ágar BHI e incubados a 37°C por 24h. Transcorrido o tempo, realizou-se o subcultivo, transferindo 50 µl do inóculo inicial para 50 ml de caldo Mueller-Hinton, o qual foi incubado a 37°C por 1h, produzindo leve turvação, com densidade de 0,5 na escala McFarland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ UFC ml⁻¹.

O teste de difusão em ágar foi feito seguindo a metodologia de Karaman et al., 2003. Para tal, com auxílio de swabs estéreis, o inóculo microbiano foi semeado na superfície de placa de Petri com ágar Muller-Hinton, com profundidade de 4 mm. Discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram

impregnados com 10 µl de extratos. Foi utilizado o método de diluição seriada, com um total de oito concentrações diferentes dos fitoterápicos (20 a 2.560 µg/ml). Os discos foram dispostos com 30 mm de distância da parede e de outro inócuo, visando impedir a sobreposição das zonas de inibição. Os controles negativos foram preparados utilizando os mesmos solventes utilizados para dissolver os extratos. Para controle positivo foi utilizado ciprofoxacina (0,4 mg/ml) e gentamicina (0,3 mg/ml). As placas inoculadas foram incubadas a 37°C durante 24h. Cada ensaio feito neste experimento foi realizado em triplicata. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da medição da zona de inibição de crescimento bacteriano formados ao redor dos discos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração da amostra que resultou na inibição completa do crescimento visível na placa. A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como a menor concentração do extrato capaz de causar a morte de 99,9% do inócuo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em ambos os extratos, foi detectada a presença dos seguintes metabólitos: fenóis, flavonóides, taninos, esteróides, triterpenos, resinas, catequinas, saponinas e alcalóides. Ao passo que antocianinas e antocianidinas foram encontrados em quantidade mensurável apenas no herbal de *F. carica*. O teor de fenóis totais para os extratos de caamembeca e figo, foram respectivamente: 71,4 mg.g⁻¹ (±1,887) e 168,2 mg.g⁻¹ (±2,035), semelhantes a literatura (Márquez Mendoza, 2011).

Os compostos fenólicos possuem uma gama de atividades biológicas, como antioxidante, antitumoral e, principalmente, antimicrobiana. Isto é explicado pela habilidade de interagir e

formar complexos de macromoléculas, tais como polissacarídeos e proteínas bacterianas. O efeito antimicrobiano dos taninos deve-se à inibição de enzimas, pela ação direta na membrana e pela competição por íons metálicos, essenciais ao metabolismo microbiano. Já para os esteróides, a ação ocorre devido à alteração do pH do meio e alquilação de proteínas importantes dos micro-organismos patogênicos. Saponinas, triterpenos e catequinas possuem relativa atividade bactericida, principalmente contra bactérias Gram-positivas.

A atividade antioxidante, na concentração de 640 µg/ml, em relação ao controle positivo, para o EFC foi de 68,4% enquanto para o EFF foi de 89,9%. Estes resultados, principalmente o encontrado no EFF, são expressivos, uma vez que o ácido ascórbico possui uma das maiores atividades antioxidantes existentes na natureza. Os compostos antioxidantes, tais como fenóis e flavonóides, possuem funções como atividades anticancerígenas, antiinflamatórias e antimicrobianas (Texeira et al., 2013). Esta última ocorre devido a oxidação de elementos fundamentais da parede celular, principalmente os peptideoglicanos, formando poros, comprometendo a integridade da parede e tornando a bactéria suscetível a agentes externos. A degradação é menor frente a bactérias Gram-negativas devido a estrutura mais complexa e do maior teor de lipídeos da parede celular, que podem tornar os patógenos mais resistentes a agentes externos (Efstratiou et al., 2012).

O ensaio de letalidade com *A. salina* possui alta confiabilidade para testar a toxicidade de fitoterápicos, devido a sua resistência ambiental. Este teste apresenta fundamental importância, quando se pretende testar os produtos em testes *in vivo* (Sprenger et al., 2015). Os resultados da CL₅₀ do

EFC e EFF foram, respectivamente: 2.281 e 1.458 µg/ml. Portanto, nenhum dos extratos demonstrou ser tóxico.

A atividade antimicrobiana dos fitoterápicos está apresentada na Tabela 1. Houve ação do extrato de figo frente a *C. perfringens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Quanto ao extrato de caamembeca ocorreu significativa atividade apenas frente ao *S. aureus*.

Tabela 1 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos hidroalcoólicos de *Ficus carica* e *Polygala spectabilis*.

Plantas/Bactérias	Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)			
	<i>C. perfringens</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>F. carica</i>	640	2.560	640	320
<i>P. spectabilis</i>	SA	SA	SA	1.280
Concentração Bactericida Mínima (µg/ml)				
<i>F. carica</i>	1.280	2.560	1.280	320
<i>P. spectabilis</i>	SA	SA	SA	2.560

SA= Sem ação.

Segundo Carauta & Diaz, (2002) extratos produzidos com folhas de plantas do gênero *Ficus*, como *Ficus sycomorus*, *F. benghalensis*, *F. religiosa* e *F. racemosa*, possuem atividade antimicrobiana frente a diferentes gêneros. Reschke et al. (2007) demonstraram ação de *F. benjamina* frente a diversas bactérias, entre elas *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, com CBM de 2.048 mg/ml e CIM entre 512 a 1.024 mg/ml.

Jeong et al. (2009) pesquisaram o efeito de extrato metanólico de *F. carica* contra diversas bactérias e identificaram a ação do fitoterápico frente a *S. aureus* e *E. coli*, sendo que a CBM e CIM variaram entre 2,5 a 10 mg/ml. Al-Yousuf (2012) visualizaram a ação bactericida de extrato metanólico de *F. carica* perante *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Lee & Cha (2010) também observaram o efeito do extrato metanólico de *F. carica* frente a *S. aureus*. Esta bactéria possui grande sensibilidade a antibióticos e substâncias com tal potencial, sendo usado como bioindicador para analisar essa propriedade.

A caamembeca é um vegetal muito utilizado pela população

amazônica, principalmente devido seu efeito anti-helmíntico, antidiarreico e expectorante (Leão et al., 2007). Porém, não há trabalhos científicos demonstrando suas propriedades antimicrobianas, sendo este a primeira pesquisa determinando seu espectro de atividade e baixo efeito tóxico.

No teste de Folin-Ciocalteu, foi observado pouco conteúdo de fenóis totais, classe de biomoléculas que possui ação antimicrobiana pronunciada. Uma maneira de aumentar a quantidade de compostos fenólicos, como flavonóides e antocianinas, e consequentemente melhorar a ação frente a bactérias seria a digestão fria em metanol das folhas.

As infecções causadas por bactérias resistentes ao tratamento com antibióticos convencionais são uma realidade mundial. Esta situação apresenta uma grande preocupação para a saúde pública e veterinária devido ao reduzido arsenal terapêutico disponível para tratamento em muitos casos (Quinn et al., 2011). O problema é maior quando ocorre desenvolvimento de resistência em bactérias zoonóticas, a exemplo dos patógenos utilizados no presente estudo, constituindo assim um maior risco para a saúde pública, pois podem afetar a eficácia do tratamento de infecções em humanos (D'Lima et al., 2012).

A pesquisa da atividade antimicrobiana da flora amazônica constitui uma alternativa viável para somar as formas alternativas de controle, sendo que este trabalho servirá como base para o desenvolvimento de novos fitoterápicos.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam ser promissora a utilização do extrato hidroalcoólico de figo no controle das bactérias *C. perfringens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* potencialmente patogênicas pesquisadas, uma vez que

a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima foram iguais ou inferiores a 2560 µg/ml. Todavia, novas formulações necessitam ser testada buscando maximizar a eficácia do produto.

REFERÊNCIAS

- AL-YOUSUF, H.H.H. Antibacterial activity of *Ficus carica* L. extract against six bacterial strains. **Internacional Journal of Drug Development and Research**, v. 4, p. 307-310, 2012.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- CARAUTA, J.P.P.; DIAZ, B.E. **Figueiras no Brasil**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2002. 85p.
- DÉCIGA-CAMPOS, M.; RIVERO-CRUZ, I.; ARRIAGA-ALBA, M.; CASTAÑEDA-CORRAL, G.; ANGELES-LÓPEZ, G.E.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 334-342, 2007.
- D'LIMA, L.; FRIEDMAN, L.; WANG, L.; XU, P.; ANDERSON, M.; DEBABOV, D. No decrease in susceptibility to NVC-422 in multiple-passage studies with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Escherichia coli*. **Antimicrobiology. Agents and Chemicals**, v. 56, n. 5, p. 2753-2755, 2012.
- EFSTRATIOU, E.; HUSSAIN, A.I.; NIGAM, P.S. MOORE, J.E.; AYUB, M.A.; RAO, J.R. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. **Complementary Therapies and Clinical Practices**, v. 18, n. 3, p. 173-176, 2012.
- HENDERSON, A. **The palms of the Amazon**. Oxford: University Press, 1995. 388p.
- JEONG, M.R.; KIM, H.Y.; CHA, J.D. Antimicrobial activity of methanol extract from *Ficus carica* leaves against oral bacteria. **Journal of Bacteriology and Virology**, v. 39, n. 2, p. 97-102, 2009.
- LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.
- LEE, Y.S.; CHA, J.D. Synergistic antibacterial activity of fig (*Ficus carica*) leaves extract against clinical isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Korean Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, 2010.
- KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; SENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.
- MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. EUFC: Fortaleza, 1997. 141p.
- MÁRQUEZ MENDOZA, G.D.C. **Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos de Prunus domestica L., Ficus carica L. y Vitis vinifera L. cv "red globe" cultivados en Perú**. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado) - Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima.
- MCDONALD, S.; PRENZLER, P.; ANTOLOVICH, M.; ROBARDS, Q. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemical**, v. 73, p. 73-84, 2001.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.

- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK E.S. FANNING, S.; HARTIGAN, P. **Veterinary microbiology and microbial disease**. 2 ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. 928f.
- RESCHKE, A.; MARQUES, L.M.; MAYWORM, M.A.S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, p. 67-70, 2007.
- SOUSA, R.G.; FALCÃO, H.S.; BARBOSA FILHO, J.M. MELO DINIZ, M.F.F.; BATISTA, L.M. Atividade anti-helmíntica de plantas nativas do continente americano: uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 15, n. 2, p. 287-292, 2013.
- SPRENGER, L.K.; BUZATTI, A.; CAMPESTRINI, L.H.; YAMASSAKI, F.T.; MAURER, J.B.B.; BAGGIO, S.F.Z.; MAGALHÃES; P.M., MOLENTO, M.B. Ovicultural and larvicultural activity of *Artemisia annua* hydroalcoholic extract against gastrointestinal parasites in cattle. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 1, p. 25-31, 2015.
- TEIXEIRA, B.; MARQUES, A.; RAMOS, C.; NENG. N.R.; NOGUEIRA, J.M.F.; SARAIVA. J.A.; NUNES, M.L. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 587-595, 2013.