



# ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,  
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE

*Desmodium barbatum* (Fabaceae: Fabales), NO CONTROLE DE LEVEDURAS

E BACTÉRIAS DE INTERESSE CLÍNICO.

**Allan Belarmino Rodrigues<sup>1</sup>; Kelly Mari Pires de Oliveira<sup>2</sup>.**

1. Acadêmico de Biotecnologia da UFGD, Bolsista de Iniciação Científica da UFGD.

2. Orientadora do Projeto de Pesquisa.

Rodovia Dourados – Itahum Km 12 - Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Caixa Postal 533 - CEP 79.804-970, Dourados, MS, Brasil E-mail: allan\_gudim@hotmail.com; KellyOliveira@ufgd.edu.br.

### RESUMO

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Mas sua eficácia é baseada somente em conhecimentos que os mais antigos transmitem, sem evidências científicas comprovadas. O estudo dessas plantas medicinais representa uma fonte importante para o tratamento de diversas doenças, incluindo as infecções fúngicas e bacterianas. O trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade antimicrobiana da *Desmodium barbatum*, popularmente conhecida como “pega-pega”, frente a culturas de fungos e bactérias de interesse clínico. A concentração inibitória mínima (CIM) do extrato foi determinada por meio de técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002, 2008). Os microrganismos testados foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA), sendo elas: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6558, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Avaliou-se também os efeitos de toxicidade e citotoxicidade através do teste de *Allium cepa*. A avaliação da atividade antimicrobiana

do extrato etanólico de *Desmodium barbatum* não correspondeu às expectativas esperadas, porém acredita-se que este estudo servirá de base para futuras pesquisas.

**Palavras-chave:** plantas medicinais, concentração inibitória mínima, teste de *Allium cepa*.

## INTRODUÇÃO

A bioprospecção, de modo geral, consiste na avaliação de material biológico encontrado na fauna ou na flora, para obtenção de novos produtos ou processos para comercialização. E com os avanços da engenharia genética e outras ferramentas tecnológicas para processamento de dados e informações, tem sido cada vez maior o interesse pela descoberta de recursos disponíveis na natureza, para fabricação de novos produtos e processos – farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos, entre outros – visando produção em alta escala comercial (ARTUSO, 2002).

A *Desmodium barbatum*, conhecida popularmente como “pega-pega”, é uma planta de vida curta, mais o menos erva lenhosa, podendo chegar a uma altura de até 1 m. É tolerante a frio e resiste à pastagem, pisoteio e fogo, porém não sobrevivem um período maior que seis meses no cerrado brasileiro. Informações sobre propriedades medicinais, composição química, entre outras atividades ainda são bem escassas, necessitando de novos estudos sobre a espécie (FAO, 2012).

Substâncias antibióticas ou antimicrobianas compõem um grupo de agentes terapêuticos, em sua maior parte produzidos e obtidos de organismos vivos. Essas tais substâncias, mesmo em pequenas concentrações, devem ter atividade letal ou inibitória contra espécies microbianas, também devem prevenir o desenvolvimento de microrganismos resistentes e ainda apresentarem estabilidade química e ausência de efeitos colaterais ao hospedeiro (COWAN, 1999).

Diante do proposto, o trabalho teve como objetivo principal avaliar a atividade antimicrobiana da *Desmodium barbatum*, frente a culturas de fungos e bactérias de interesse clínico.

## MATERIAL E MÉTODOS

A *Desmodium Barbatum* foi coletada próximo ao câmpus da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). A planta pesquisada foi seca em estufa de ar circulante à temperatura de 30°C por cinco dias, após a secagem o material foi pulverizado em moinho de facas, pesado e armazenado em local seco sem umidade. O material botânico seco e pulverizado foi misturado em 90 mL de etanol a 95% e deixado

à temperatura de 25°C por 72 h, com agitações ocasionais. Após ser filtrado, o extrato vegetal foi completamente evaporado à 35°C, em rota-evaporador e posteriormente liofilizado. O extrato etanólico liofilizado foi mantido sob refrigeração até ser utilizado para os testes biológicos.

A concentração inibitória mínima do extrato foi determinada por meio de técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002, 2008). Os microrganismos testados foram provenientes da American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida glabrata* ATCC 2001, *Candida krusei* ATCC 6558, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

O extrato etanólico foi dissolvido em Dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich) e foram realizadas diluições em série com o caldo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para leveduras e caldo Müller Hinton (Himedia) para bactérias. As concentrações foram distribuídas em placas de microdiluição com 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark), com concentração inicial de 2048µg mL<sup>-1</sup> e concentração final de µg mL<sup>-1</sup>. Logo após, foi adicionado 100 µL do inóculo na concentração de 0,5 de McFarland (108 UFC mL<sup>-1</sup>) nos poços. As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C por 48 horas (para leveduras) e 37°C por 24 horas (para bactérias). O teste foi realizado em duplicata.

As amostras foram removidas de cada poço (10 µL) da placa de microdiluição do CIM e perfuradas em uma placa de petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco) para avaliação da ação fungicida e para avaliação bactericida foram perfuradas em uma placa de petri contendo Mueller Hinton (Himedia). As placas foram incubadas nas mesmas condições do CIM.

Para a avaliação de efeitos de toxicidade submeteu-se sementes de *Allium cepa* ao tratamento contínuo e o parâmetro analisado foi o comprimento médio das raízes das sementes (CMR) e o índice de germinação (IG). Para isso, foram distribuídas de 50 a 100 sementes de *Allium cepa*, do tipo baia periforme, em placas de Petri de vidro (100 x 15 mm) tendo como substrato uma folha de papel-filtro umedecida com diferentes concentrações do extrato de *Desmodium barbatum* (0,2; 0,3 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>), permanecendo por 5 dias em temperatura ambiente. Para controle negativo (CN) as sementes germinaram em água destilada e no controle positivo (CP) em Ciclofosfamida 0,1% (Baxter). As raízes foram medidas com auxílio de uma régua. O CMR foi

determinado pela média do tamanho das raízes para cada uma das amostras e o IG pela média de raízes germinadas por dia em cada tratamento.

Para avaliação de citotoxicidade submeteu-se sementes de *Allium cepa* ao tratamento descontínuo. Foram distribuídas de 50 a 100 sementes de *Allium cepa*, do tipo baía periforme, em placas de Petri de vidro (100 x 15 mm) tendo como substrato uma folha de papel-filtro umedecida com água destilada à temperatura ambiente por 4 a 5 dias. Quando as raízes alcançaram 2 a 4 cm de comprimento, essas foram tratadas com diferentes concentrações do extrato etanólico de *Desmodium barbatum* (0,2; 0,3 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>). Para controle negativo (CN) as sementes germinaram em água destilada e no controle positivo (CP) em Ciclofosfamida 0,1% (Baxter). Após 24 horas, as raízes de *A. cepa* foram coletadas e fixadas em Carnoy. Para montagem das lâminas as raízes de *A. cepa* foram coradas com Reativo de Schiff e Carmim acético 2%, cobriu-se com uma lamínula e pressionou-se suavemente a lâmina e a lamínula envolvidas por um papel filtro e observou-se em microscópico. As lâminas foram confeccionadas utilizando-se o meristema apical das raízes das sementes germinadas nas diferentes concentrações, referente ao extrato analisado e seus controles.

A análise da atividade citotóxica consta em realizar a investigação de anormalidades cromossômicas (AC) e o índice mitótico (IM) nas células de raízes das sementes de *A. cepa*, foram analisadas 5 lâminas por tratamento, contadas 1000 células por lâmina, totalizando 5000 células por tratamento.

Para a comparação dos resultados dos testes de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade entre os grupos experimentais foi utilizado o teste de Mann-Whitney pelo programa Bioestat. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como parâmetros de avaliação, considera-se que se a atividade do extrato testado no CIM for inferior a 100µg mL<sup>-1</sup>, sua atividade antimicrobiana será avaliada boa, se a atividade antimicrobiana for de 100 a 500µg mL<sup>-1</sup> é considerada mediana, a partir de 500 a 1000µg mL<sup>-1</sup> a atividade antimicrobiana é considerada fraca; e mais de 1000µg mL<sup>-1</sup> a ação do extrato é considerada inativa (ARAÚJO et al., 2011; HOLETZ et al., 2002).

Assim, a partir desses critérios, vê-se na tabela 1, que o extrato etanólico de *Desmodium barbatum* foi considerado inativo, pois não apresentou capacidade de inibir o crescimento de nenhum dos microrganismos nas concentrações testado na pesquisa.

Para o fluconazol, antifúngico utilizado como referência, a concentração inibitória mínima determinada em relação às cepas estudadas foram de 1, 2, 16 e 32  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, respectivamente. E para a ampicilina, antibiótico utilizado como referência, obteve-se os valores de 1, 1, 8 e 128  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

**Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do extrato etanólico de *D. barbatum*.

Microrganismos	<i>Desmodium barbatum</i>		Ampicilina*	Fluconazol**
	CIM	CFM/CBM	CIM	CIM
<i>Candida albicans</i>	-	-	°	1
<i>Candida glabrata</i>	-	-	°	32
<i>Candida krusei</i>	-	-	°	16
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	°	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	1	°
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	8	°
<i>Escherichia coli</i>	-	-	1	°
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	128	°

\* antibiótico padrão recomendado pelo CLSI. \*\* antifúngico padrão recomendado pelo CLSI. – inibição ausente.

° não testado.

Diz-se quem uma substância é genotóxica quando sua capacidade de reação direta com o DNA ou após sua ativação metabólica, produz danos em sua estrutura ou função (WEISBURGER, 1999). E o teste de *Allium cepa* é aceito para esse estudo, porque as raízes ficam em contato direto com o extrato testado, assim permitindo a avaliação de diferentes concentrações.

Os efeitos citotóxicos de *Desmodium barbatum* em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* foram avaliados em tratamento descontínuo em diferentes concentrações (0,2; 0,3 e 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) posteriores à germinação. Os valores de *p* obtidos através do teste de Mann-Whitney demonstraram quem a diferença não é estatisticamente significativa, comparando com as amostras do controle negativo. Quanto ao tratamento contínuo as raízes foram obtidas também nas concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$ , e o índice de germinação permaneceu superior a 50% em todas concentrações em relação ao controle negativo, indicando que o agente testado não é tóxico (FISKESJÖ, 1985).

## CONCLUSÃO

Não foi presenciada atividade antimicrobiana nos testes realizados com o extrato etanólico de *Desmodium barbatum* para os isolados testados. Porém acredita-se que este estudo servirá de base para futuras pesquisas.

Pode-se observar que no tratamento descontínuo o extrato etanólico de *Desmodium barbatum* não ocasionou mudanças no índice de divisão e também não apresentou aumento de alterações cromossômicas quando comparado com o controle negativo e positivo, o que indica ausência de genotoxicidade e mutagenicidade do extrato avaliado.

## AGRADECIMENTOS

À UFGD, pela bolsa concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ARTUSO. A. Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. **World Development**, v. 30, n. 8, p. 1355-1368, 2002.
- ARAÚJO, M.G.F. et al. Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leiothrix spiralis* Ruhland and their antimicrobial activity. **Molecules**, v.16, p.10479-10490, 2011.
- COWAN, M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2 (4), 564-82.
- FAO, 2012. Grassland Index. A searchable catalogue of grass and forage legumes. FAO, Rome, Italy.
- HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memorial Institute Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.
- WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research**, v.437, p.105–112, 1999.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test: a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112, 1985.