

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO AQUOSO E ETANÓLICO DE *ACANTHOSPERMUM AUSTRALE*

Luís César de Castro¹, Rodrigo Dall'Agnol², Eduardo Miranda Ethur³, Luciana Weidlich⁴,
Carla Kauffmann⁵, Ismael Pretto Sauter⁶, Aleksander Westphal Muniz⁷,
Paula Michele Lohmann⁸, Olívia Bouchacourt⁹, José Carlos Germani¹⁰,
Sueli Teresinha Van Der Sand¹¹

Resumo: As plantas medicinais têm sido amplamente empregadas na terapia de diversas patologias, constituindo parte das ferramentas terapêuticas utilizadas no controle das mais variadas moléstias humanas. A atividade antibacteriana dos extratos aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze foi avaliada frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), pelo método de difusão em Agar. Foi observada a inibição de crescimento destes microrganismos por ambos os extratos, nas concentrações testadas. Paralelamente, foi realizada a análise fitoquímica dos extratos aquoso e hidroetanólico para a determinação de compostos fenólicos (taninos, flavonoides, ácidos fenólicos e antraquinonas), alcaloides e compostos terpênicos. Os extratos apresentaram perfis qualitativamente semelhantes, apresentando taninos, flavonoides, ácidos fenólicos e compostos terpênicos.

-
- 1 Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente UFRGS/RS. Professor e Coordenador do Curso de Farmácia, Bacharelado, do Centro Universitário UNIVATES/RS/BRA.
 - 2 Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFRGS/RS. Professor do Curso de Farmácia, Bacharelado, do Centro Universitário UNIVATES/RS/BRA.
 - 3 Doutor em Química UFSM/RS. Professor do PPGAD do Centro Universitário UNIVATES/RS/BRA.
 - 4 Doutora em Ciências Biológicas-Bioquímica UFRGS/RS. Professora do PPGAD do Centro Universitário UNIVATES/RS/BRA.
 - 5 Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFRGS/RS. Professor do Curso de Farmácia, Bacharelado, do Centro Universitário UNIVATES/RS/BRA.
 - 6 Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente UFRGS/RS/BRA.
 - 7 Doutor em Microbiologia Agrícola e do Ambiente UFRGS/RS. Pesquisador da EMBRAPA Amazônia Ocidental/AM/BRA.
 - 8 Mestre em Ambiente e Desenvolvimento e Professora do Curso de Enfermagem do Centro Universitário UNIVATES/RS/BRA.
 - 9 Bolsista de Iniciação Científica do Centro Universitário UNIVATES/RS/BRA.
 - 10 Doutor em Ciências do Solo pela UFRGS/RS/BRA. Professor Associado da UFRGS/RS/BRA.
 - 11 PhD em Bioquímica e Microbiologia Molecular - University Of Manchester Institut of Science and Technology. Professora Associada da UFRGS/RS/BRA.

Acanthospermum australe apresentou potencial atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Palavras-chave: *Acanthospermum*. Asteraceae. Atividade antimicrobiana. Bactéria. Flavonoides. Taninos. Compostos terpênicos.

Abstract: Medicinal plants have been widely employed in the therapy of various pathologies, constituting part of the therapeutic tools used in the control of various human diseases. The antibacterial activity of aqueous and ethanolic *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze was evaluated against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) by agar diffusion method. It was observed growth inhibition of microorganisms, for both extracts at the concentrations tested. In addition, phytochemical analysis was performed for the determination of phenolic compounds (tannins, flavonoids, phenolic acids and anthraquinones), alkaloids and terpene compounds. The extracts showed qualitatively similar profiles, characterized by the presence of tannins, flavonoids, phenolic acids and terpene compounds. *Acanthospermum australe* has a potential antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Keywords: *Acanthospermum*. Asteraceae. Antimicrobial activity. Bacteria. Flavonoids. Tannins. Terpene compounds.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é quase tão antigo quanto a civilização humana, de modo que estas têm servido como fonte constante de substâncias biologicamente ativas, possibilitado o tratamento de uma gama de doenças. A família *Asteraceae*, dotada de elevada diversidade química e biológica, tem sido caracterizada como uma importante fonte de plantas e, conseqüentemente, substâncias farmacologicamente ativas (MAGNER, 2005).

A família *Asteraceae*, contendo mais de 1.100 gêneros e aproximadamente 25000 espécies, representa em torno de 10% da flora mundial. Embora cerca de 98% das *Asteraceae* sejam plantas pequenas, a família também inclui subarbustos, trepadeiras, algumas árvores e espécies aquáticas. A principal característica dessa família é a organização das flores em conjuntos denominados capítulos (CRONQUIST, 1981). Entre os representantes das *Asteraceae*, a *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze, uma espécie vegetal encontrada nas regiões tropicais e subtropicais da América e África e popularmente conhecida como carrapichinho ou carrapicho-de-carneiro, tem merecido atenção. No Brasil, encontra-se amplamente distribuída, podendo ser localizada desde os estados da região Norte até a região Sul do país.

Devido à sua capacidade para crescer de forma abundante em solos agrícolas, pastagens e terrenos baldios é considerada como uma espécie invasiva. Entre a população destas regiões, seus ramos são amplamente utilizados sob a forma de chás, sendo considerados como tônicos, diaforéticos, eupépticos, vermífugos, antidiarreicos, antimaláricos, antiblenorrágicos, febrífugos e antianêmicos (LORENZI; MATOS,

2002). Shimizu et al. (1987) relataram o uso da planta, por via oral, para o tratamento de estagnações sanguíneas, reumatismos e artrites e, topicamente, em inchaços e hemorragias. No estado do Rio Grande do Sul, preparações da planta têm sido utilizadas para diferentes finalidades, entre elas o tratamento de “infecções” ou “inflamações” do trato urinário. Tendo em vista as diferentes aplicações populares e considerando a necessidade e a importância da avaliação de plantas ou substâncias dotadas de potencial atividade antimicrobiana, este trabalho teve como objetivo avaliar os extratos aquoso e etanólico de *Acanthospermum australe* quanto à atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal. Coleta e preparo do material vegetal.

Acanthospermum australe (Loefl.) O. Kuntze foi coletada em abril de 2009, no município de Lajeado. A exsiccata foi depositada no Herbário do Vale do Taquari (HVAT), do Museu de Ciências Naturais da UNIVATES, com o código HVAT 2346. A planta foi submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar, por 22 horas, a uma temperatura máxima de 40°C. Após a completa secagem, o material foi moído por abrasão em uma peneira de aço inox (1 mm).

2.2 Obtenção dos extratos vegetais

2.2.1 Obtenção do extrato etanólico (EE)

O EE de *A. australe* foi obtido por maceração estática a frio em etanol/água (9:1), utilizando-se 100 g de folhas moídas em 1,5 L do solvente. Após sete dias, o material foi filtrado e o solvente foi totalmente removido a 40°C, sob pressão reduzida, em rota- evaporador. O rendimento do EE foi de 12,8% p/p.

2.2.2 Obtenção do extrato aquoso (EA)

O EA de *A. australe* foi obtido por infusão, em água deionizada, a 90°C, utilizando 100 g de folhas moídas em 1,5 L do solvente. Após 30 minutos de repouso, o material foi filtrado e o solvente foi totalmente removido a 40°C, a pressão reduzida, em rota- evaporador. O rendimento do EA foi de 17,1% p/p.

Os extratos secos foram reconstituídos em metanol de modo a obter concentrações finais de 100 µg/mL e 200 µg/mL.

2.3 Ensaio para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólico e aquoso

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), adquiridos do *American Type Culture Collection* (ATCC). Os microrganismos obtidos a partir das culturas estoque foram transferidos para tubos contendo ágar nutriente e mantidos a 37°C +/- 1°C, por 24 horas, de modo a obter subculturas. Os inóculos bacterianos foram preparados a partir das subculturas e mantidos em condições ótimas de crescimento para cada microrganismo por 24 horas. Após o período de incubação, os inóculos foram ajustados, com auxílio de uma escala de turbidez de McFarland, de modo a apresentarem uma concentração aproximada de 1.5×10^8 CFU/mL. O meio de cultura empregado para a manutenção dos microrganismos e elaboração das subculturas foi o meio No.1 de Grove- Randall, enquanto os inóculos foram preparados utilizando-se o meio No. 3 de Grove-Randall.

As atividades antimicrobianas dos extratos etanólico e aquoso foram avaliadas separadamente, utilizando-se o método de difusão em ágar, como descrito por Schapoval et al. (1988). Alíquotas de 20 mL de meio No.11 de Groove Randall, recém preparado, foram distribuídas em placas de Petri (20x100 mm). Porções de 5 mL de meio No.11 contendo o inóculo bacteriano (0,5%) foram distribuídas diretamente sobre a superfície das placas obtidas. As placas foram deixadas em repouso por 5 minutos e cilindros de vidro (sete por placa) foram distribuídos, com auxílio de pinça esterilizada, sobre a superfície das placas inoculadas. Volumes de 200 µL dos extratos aquoso e etanólico (em concentrações de 100 ou 200 µg/mL) foram aplicados em cinco cilindros de cada placa. Em todas as placas, dois dos cilindros foram usados como controle (200 µL de metanol e 200 µL de água). No centro de cada placa, um disco de papel contendo cloranfenicol (30µg) foi utilizado como controle positivo.

2.4 Screening fitoquímico

A análise química dos extratos foi realizada utilizando-se métodos fitoquímicos padrões segundo Harborne (1998) para a determinação da presença de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, antraquinonas e terpenos.

2.5 Análise cromatográfica

As análises cromatográficas visando a determinar a presença de flavonoides, taninos, fenóis simples, antraquinonas, alcaloides e compostos terpênicos nos extratos aquoso e etanólico foram realizadas em placas de gel de sílica F₂₅₄ (Merck) e envolveram a utilização dos seguintes sistemas cromatográficos: a) Flavonoides: Fase móvel: *n*-butanol-ácido acético-água; 4:1:5, fase superior; Reveladores: UV (254 e 365 nm);

cloreto de alumínio + aquecimento a 110°C, seguido de visualização sob UV (365 nm); b) Taninos e fenóis simples: Fase móvel: acetato de etila-ácido fórmico-água (90:5:5); Revelador: UV (254 e 365 nm) e cloreto férrico 5% (em metanol) c) Antraquinonas: Fase móvel: acetato de etila-metanol-água (100:13,5:10); Revelador: UV (254 e 365 nm) e KOH 5% SR em etanol; d) Alcaloides: Fase móvel: diclorometano-metanol (95:5); Revelador: UV (254 e 365 nm) e Dragendorff; e) Compostos terpênicos: Fase móvel: diclorometano: acetato de etila (80:20); Revelador: anisaldeído sulfúrico 5%

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos aquoso e etanólico de *A. australe* foram testados para a atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, uma bactéria Gram positiva conhecida por representar um papel significativo em doenças de pele, incluindo lesões superficiais e foliculares profundas, e *E. coli*, uma bactéria Gram negativa relacionada a doenças do trato digestivo, incluindo síndrome de Crohn e outros quadros infecciosos potencialmente letais (BARNICH; DARFEUILLE-MICHAUD, 2007; CHENG et al., 2011). A escolha destes microrganismos deve-se ao fato de que, além da sua contribuição na manifestação dos quadros infecciosos, tais bactérias também estão envolvidas no desenvolvimento de infecção urinária (BARABOUTIS et al., 2010; EMAMGHORASHI et al., 2011). Desta forma, os microrganismos foram selecionados considerando a indicação tradicional da planta.

De acordo com os resultados obtidos, os extratos avaliados apresentaram uma atividade significativa contra *S. aureus*, não havendo, neste caso, diferença estatisticamente significativa entre as concentrações utilizadas (TABELA 01). Por outro lado, o extrato etanólico, em sua maior concentração, exerceu um efeito inibitório mais pronunciado do que as demais amostras, quando o microrganismo confrontado foi a *E. coli*.

Muitos antibióticos empregados clinicamente são ativos a uma concentração de 10 µg/mL. Se uma substância pura não é ativa a 100 µg/mL, ela não será clinicamente útil. Extratos vegetais que são ativos a 100 µg/mL possuem uma boa potência, de modo que a sua determinação dos componentes ativos é recomendada (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988).

É conhecido que polifenóis podem apresentar atividade antimicrobiana. Polifenóis podem combinar-se com as adesinas bacterianas de forma a comprometer a adesão do microrganismo sobre a superfície celular. A literatura demonstra, também, que taninos podem afetar a síntese da parede celular ao formarem complexos irreversíveis com proteínas (CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2009; COWAN, 1999). Diversos ensaios *in vitro* demonstram interações potencialmente significativas com bactérias e outros organismos, além de propriedade antioxidante, sequestradora de radicais livres e de inibição enzimática (DE BRUYNE et al., 1999). Flavonoides, por sua vez, podem

eventualmente atuar como inibidores da topoisomerase tipo-II bacteriana, constituindo-se, também, como substâncias potencialmente ativas (CUSHNIE; LAMB, 2011).

Compostos de natureza terpênica têm sido relacionados com a inibição do crescimento microbiano. Óleos voláteis de diversas espécies vegetais têm exibido atividade inibitória contra fungos e bactérias (ESPINA et al., 2011; HUANG et al., 2010). Além dos terpenos presentes nos óleos voláteis, outros terpenos fixos, como lactonas sesquiterpênicas e diterpenos, também têm sido relacionados a este tipo de atividade (RADULOVIĆ; DENIĆ; STOJANOVIĆ-RADIĆ, 2010; WEDGE; GALINDO; MACÍAS, 2000).

Visando a identificar os grupos de compostos ativos, uma análise fitoquímica foi efetuada, evidenciando a presença de compostos terpênicos e polifenólicos, como taninos e flavonoides.

Sánchez et al. (2009), fazendo uso do mesmo sistema cromatográfico empregado neste estudo, juntamente com a análise por RMN 2D, determinaram a presença de oito melampolídeos a partir do extrato etanólico de *A. australe*. Os Rf observados por estes autores para os compostos foram: 0.74, 0.73, 0.73, 0.53, 0.53, 0.43, 0.40 e 0.34.

Sob o ponto de vista prático, a única diferença entre a técnica cromatográfica utilizada por Sánchez et al. (2009) e aquela utilizada na realização deste trabalho reside no emprego dos reveladores. Enquanto os autores do artigo fizeram uso de vanilina sulfúrica 2%, neste estudo foi empregado o anisaldeído 5%. No entanto, é importante destacar que isso não implica impossibilidade de comparar os resultados das cromatografias em camada delgada, uma vez que ambos os reveladores apresentam comportamentos e afinidades químicas similares.

Apesar de tanto as técnicas cromatográficas quanto os extratos utilizados serem similares, os resultados verificados não foram idênticos. Embora a nossa análise cromatográfica tenha apontado a presença de compostos terpênicos (caracterizados pelas manchas arroxeadas observadas na placa), os valores de Rf (0,11; 0,38; 0,56; 0,67; 0,71; 0,88; 0,93; 0,97) não são totalmente compatíveis com aqueles descritos por Sánchez et al. (2009).

A caracterização fitoquímica dos extratos indicou a presença de flavonoides. Tal fato foi corroborado pela análise cromatográfica que permitiu observar que os extratos apresentam um perfil qualitativamente similar com relação a estes metabólitos. Utilizando-se como padrões de referência rutina, quercetina e hiperosídeo foi possível observar a presença dos dois primeiros em ambos os extratos. Tal observação vai de encontro aos dados obtidos na literatura (SÁNCHEZ et al., 2009), que indicam a presença de diversos flavonoides, incluindo os dois observados em nossa análise.

A análise cromatográfica, além de confirmar a presença de taninos, evidenciada por meio das reações de caracterização, revelou, também, a presença de ácido cafeico

em ambos os extratos. Tal observação está em concordância com os resultados obtidos por outros autores (SÁNCHEZ et al., 2009).

A análise cromatográfica, assim como as reações empregadas no *screening* fitoquímico, não indicou a presença de alcaloides e antraquinonas em nenhum dos extratos.

Microrganismos vêm desenvolvendo resistência a muitos antibióticos devido à utilização indiscriminada de agentes antimicrobianos, agravando os problemas clínicos no tratamento de doenças infectocontagiosas. Além disso, o uso de antibióticos está eventualmente associado a efeitos adversos que incluem hipersensibilidade, destruição da microbiota bacteriana intestinal, imunossupressão e reações alérgicas. Desta forma, há uma necessidade evidente para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos àqueles disponíveis atualmente. Para efetuar esta busca, uma abordagem de interesse consiste em avaliar plantas medicinais dotadas de potenciais propriedades antimicrobianas. Plantas medicinais representam uma fonte importante de compostos farmacologicamente ativos, e novos agentes antifúngicos e antibacterianos podem ser eventualmente obtidos a partir delas (COWAN, 1999; LEVY, 2000; WECKESSER et al., 2007).

Embora os presentes resultados indiquem que *A. australe* seja uma espécie vegetal dotada de potencial atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, novos estudos visando à determinação da MIC dos extratos frente aos microrganismos testados e o isolamento e caracterização dos constituintes ativos devem ser desenvolvidos.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana, zona de inibição medida em mm, do extrato aquoso e etanólico de *A. australe*.

	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Extrato aquoso 100 µg/mL	22,59 ± 0,23	11,01 ± 0,31
Extrato aquoso 200 µg/mL	23,66 ± 0,08	13,26 ± 0,12
Extrato etanólico 100 µg/mL	22,58 ± 0,13	14,66 ± 0,21
Extrato etanólico 200 µg/mL	24,01 ± 0,39	16,28 ± 0,27
Cloranfenicol	24,42 ± 0,40	19,07 ± 0,47
Água	7,55 ± 0,77	7,01 ± 0,8
Metanol	7,67 ± 0,16	7,08 ± 0,23

± desvio padrão

REFERÊNCIAS

BARABOUTIS, I. G. et al. Primary *Staphylococcus aureus* Urinary Tract Infection: The Role of Undetected Hematogenous Seeding of the Urinary Tract. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 29, n. 9, p. 1095-1101, 2010.

- BARNICH, N.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. Adherent-Invasive *Escherichia coli* and Crohn's Disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 16-20, 2007.
- CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Detailed Studies on *Quercus infectoria* Olivier (Nutmalls) as an Alternative Treatment for Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Applied Microbiology**. v. 106, n. 1, p. 89-96, 2009.
- CHENG, A. G. et al. A Play in Four Acts: *Staphylococcus aureus* Abscess Formation. **Trends in Microbiology**. v. 19, n. 5, p. 225-232, 2011.
- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University, 1981.
- CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 38, n. 2, p. 99-107, 2011.
- DE BRUYNE, T. et al. Condensed Vegetable Tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 27, p. 445-459, 1999.
- EMAMGHORASHI, F. et al. The Prevalence of O Serogroups of *Escherichia coli* Strains Causing Acute Urinary Tract Infection in Children in Iran. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**. v. 22, n. 3, p. 597-601, 2011.
- ESPINA, L. et al. Chemical Composition of Commercial Citrus Fruit Essential Oils and Evaluation of Their Antimicrobial Activity Acting Alone or in Combined Processes. **Food Control**. v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.
- HARBORNE, J. B. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. London: Chapman & Hall, 1998.
- HUANG, Y. et al. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and its Main Component Trans-Anethole. **Molecules**. v. 15, n. 11, p. 7558-7569, 2010.
- LEVY, S. B. Antibiotic and Antiseptic Resistance: Impact on Public Health. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 19, n. 10, p. S120-S122, 2000.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.
- MAGNER, L. N. **A History of Medicine**. 2. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005.
- RADULOVIĆ, N.; DENIĆ, M.; STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z. Antimicrobial Phenolic Abietane Diterpene From *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 20, n. 17, p. 4988-4991, 2010.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening Methods for Natural Products With Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 23, n. 2-3, p. 127-149, 1988.
- CADERNO PEDAGÓGICO, LAJEADO, v. 9, n. 2, p. 153-161, 2012

SÁNCHEZ, M. et al. Melampolides from Argentinean *Acanthospermum australe*. **Phytochemistry Letters**. v. 2, n. 3, p. 93-95, 2009.

SCHAPOVAL, E. E. S. et al. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de *Sizygium cumini*. **Revista Portuguesa de Farmácia**. v. 38, n. 4, p. 55-57, 1988.

SHIMIZU, M. et al. Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay. I. Isolation and Identification of Lens Aldose Reductase Inhibitor from "Tapecué", *Acanthospermum australe* O.K. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 35, p. 1234-1237, 1987.

WECKESSER, S. et al. Screening of Plant Extracts for Antimicrobial Activity Against Bacteria and Yeasts With Dermatological Relevance. **Phytomedicine**. v. 14, n. 7-8, p. 508-516, 2007.

WEDGE, D. E.; GALINDO, J. C. G.; MACÍAS, F. A. Fungicidal Activity of Natural and Synthetic Sesquiterpene Lactone Analogs. **Phytochemistry**. v. 53, n. 7, p. 747-757, 2000.