

ESTUDO DE TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Psidium myrsinites* D.C. (MYRTACEAE)

Cássia de Oliveira Clementino* (IC), Emanuelle Rosário Brito Durães (PG), Leonardo Rodrigues Faria (IC), Joelma Abadia Marciano de Paula (PQ), Plínio Lázaro Faleiro Naves (PQ).

Universidade Estadual de Goiás, Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas de Anápolis.

Resumo: As espécies do gênero *Psidium* têm despertado interesse principalmente por seus metabólitos secundários, dispondo de diversas propriedades funcionais como atividade antimicrobiana e substâncias antioxidantes. Apesar do uso popular dos frutos da *Psidium myrsinites*, poucos estudos comprovam suas potenciais atividades terapêuticas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é realizar ensaios com os extratos, frações e óleo essencial extraídos da *P. myrsinites* para avaliação da sua toxicidade através do teste de letalidade em *Artemia salina* L. e determinação da concentração mínima inibitória pelo método de microdiluição em caldo. O ensaio de toxicidade demonstrou forte toxicidade para o óleo essencial e moderada para a fração hexano. Já os extratos brutos acetônico (EBA) e etanólico (EBE), as frações obtidas com o EBE clorofórmio, intermediária de clorofórmio, acetato de etila e a fração aquosa obtida do EBA apresentaram-se como não tóxicas. No ensaio da atividade antimicrobiana o óleo essencial foi classificado como inativo com CMI $\geq 2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As demais amostras apresentaram-se ativas contra bactérias Gram-positivas com concentrações $\leq 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Assim, os resultados obtidos nesse estudo indicam a potencial atividade antimicrobiana da espécie *P. myrsinites* e contribui para estudos de desenvolvimento de novos produtos naturais para o tratamento de doenças decorrentes de infecções bacterianas.

Palavras-chave: Myrtaceae. Toxicidade. Atividade Antimicrobiana.

Introdução

As espécies da família Myrtaceae são bastante conhecidas e têm sido estudadas devido as suas características fitoquímicas, possuindo uma grande quantidade de metabólitos secundários que são associados a atividade antimicrobiana e ação contra agentes antioxidantes (BIANCHETTI, 2014; LOGUÉRCIO et. al 2005).

Estudos demonstram que o gênero *Psidium* apresenta grande potencial terapêutico e várias atividades biológicas e farmacológicas, dentre elas atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (FRANZON, et al 2009).

A *Psidium myrsinites* também conhecida como araçazeiro, araçá-bravo, araçá-de-veado e araçá-liso, é facilmente encontrada no Brasil principalmente nas áreas do estado do Ceará, Bahia, Tocantins, Goiás, Distrito Federal e Minas Gerais (FRANZON *et al.*, 2009). Um estudo recente da composição do óleo essencial de *P. myrsinites* identificou como um dos compostos mais abundantes na composição química, o acetato de nerila e o δ -cadinol, que dentre as várias atividades estão a atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (PEREIRA, 2010).

De acordo com Amaral e Silva (2008), o ensaio de toxicidade em *Artemia salina* L. permite avaliar a toxicidade aguda de compostos e é considerado um estudo preliminar na avaliação da atividade farmacológica de substâncias de origem vegetal e natural devido a semelhança dos limites dos efeitos tóxicos produzidos no microcrustáceo e em seres humanos.

Vários estudos têm sido realizados na avaliação da atividade biológica de espécies vegetais a procura por novos fármacos que sejam eficazes e seletivos para suprir a ineficiência do arsenal disponível atualmente (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2010). De acordo com o estudo de Bona *et al.*, (2014), o método de microdiluição em caldo permite uma visualização da atividade inibitória dos extratos mesmo em baixas concentrações.

Material e Métodos

As folhas de *P. myrsinites* foram coletadas no Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas Henrique Santillo da Universidade Estadual de Goiás – CCET no município de Anápolis – GO nos meses de janeiro e fevereiro de 2015.

O material vegetal foi identificado pela Professora Dra. Mirley Luciene dos Santos da Universidade Estadual de Goiás e em seguida foram preparadas três exsiccatas, as quais foram depositadas no herbário da instituição sob registros HUEG 10046, 10047 e 10048.

Após serem dessecadas, as folhas secas foram trituradas em moinho de facas e o material foi armazenado em local seco e arejado.

A extração do óleo essencial das folhas de *P. myrsinites* foi feita por hidrodestilação em aparato tipo Clevenger. O óleo essencial obtido foi dessecado

em sulfato de sódio anidro e armazenado sob atmosfera de N₂, em frasco de vidro âmbar, hermeticamente fechado em freezer a temperatura de -20°C.

O EBA foi extraído das folhas de *P. myrsinites* pelo processo de maceração com mistura de acetona/água 50% em banho de ultrassom e em seguida, o extrato obtido foi filtrado por filtração simples com algodão e acetona.

O extrato aquoso foi dividido em porções e extraído com acetato de etila em funil de separação. As frações de acetato de etila foram reunidas e rotaevaporadas para recuperação do solvente e as frações aquosas foram também reunidas e liofilizadas.

O EBE foi obtido através de extração com álcool etanólico P.A. do pó das folhas de *P. myrsinites* em percolador até a saturação do solvente. O álcool foi evaporado em rotaevaporador a 40°C.

O EBE foi solubilizado em solução metanol:água (7:3) e em seguida foi fracionado com solventes com polaridade crescente, hexano, clorofórmio e acetato de etila respectivamente. A fração aquosa obtida dessa extração foi armazenada em freezer e as demais frações foram rotaevaporadas até que estivessem completamente secas.

Avaliação das Atividades Biológicas

A toxicidade da amostra foi testada através de ensaios com *Artemia salina* L. de acordo com a metodologia de Rahman *et al.* (2005) com algumas modificações. As concentrações de cada amostra estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração de cada amostra testada no ensaio de toxicidade em *Artemia salina* L.

Amostras	Concentrações (µg.mL⁻¹)
Extrato acetônico bruto	11.520; 5.760; 2.880; 1.440; 720
Extrato etanólico bruto	23.040; 11.520; 5.760; 2.880; 1.440
Óleo essencial	500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62
Fração Acetato de Etila	2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5
Fração Clorofórmio	2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5
Fração Hexano	2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5
Fração Intermediária de Clorofórmio	2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5
Dicromato de potássio	50; 25; 12,5

Foram pesados 250 mg de cistos de *Artemia salina* L. e em seguida, os cistos foram incubados em um artemilheiro contendo 400mL de meio de água

marinha sintética, o qual foi preparado com a dissolução de sal marinho (40g.L^{-1}) e suplementação com extrato de levedura (6mg.L^{-1}). O artemilheiro foi mantido sob saturação constante de oxigênio durante 36 horas à temperatura ambiente e iluminação natural para que ocorresse a eclosão dos cistos.

Após o período de eclosão, os náuplios foram transferidos para uma placa de Petri e com auxílio de uma micropipeta, foram distribuídas dez larvas e um volume de $100\ \mu\text{L}$ de meio de água marinha sintética para cada poço da microplaca de poliestireno. Em seguida, as amostras preparadas foram adicionadas e incubadas por um período de 24 horas. Após o período de incubação foi realizada a contagem das artêmias vivas e mortas ou imobilizadas. Os ensaios de toxicidade foram realizados em triplicata. Todos os testes foram realizados juntamente com controles de DMSO 5%, controle de viabilidade e controle de toxicidade com solução de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) nas concentrações de 50; 25 e $12,5\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MOLINAS-SALINAS & SAID-FERNÁNDEZ, 2006).

A toxicidade da amostra foi observada com a concentração letal a 50% (CL_{50}) da população dos náuplios. Estes dados foram calculados utilizando o *Statplus 2009 professional (AnalystSoft)*. O nível de toxicidade foi determinado de acordo com Nguta *et al* (2012).

Ensaio Microbiológico

Os testes de microdiluição em caldo foram realizados de acordo com o *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)* com algumas modificações (CLSI, 2010).

Após manutenção e conservação das cepas bacterianas, as cepas foram reativadas pela técnica de esgotamento. Os microrganismos foram inoculados e incubados à 35°C por 24 horas.

Após incubação foram transferidas de 3 a 5 colônias isoladas e típicas para um tubo com 5 mL de solução fisiológica 0,9%. Obteve-se uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland. A solução foi diluída para 1:10 em solução fisiológica atingindo a concentração de células de $10^7\ \text{UFC mL}^{-1}$. O procedimento foi realizado 15 minutos antes da inoculação nos poços das placas de CMI.

As amostras foram solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% e diluídas em caldo MH de modo a obter uma concentração de 2000; 1000; 500; 250;

125 e 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A amostra do óleo essencial foi preparada acrescentando 0,02% de Tween 80[®]. As diluições do antibiótico, cloranfenicol, foram preparadas, conforme recomendado pelo CLSI, sendo utilizadas como controle da técnica.

Após o preparo das diluições foram pipetados nas microplacas, 100 μL de cada concentração dos extratos da coluna 1 a 7. Na coluna 8, da letra A até a G foram pipetados 100 μL de caldo *Muller Hinton* (MH) com o inóculo, sendo este, portanto, o controle de viabilidade. Na coluna 10, da letra A até a letra F, foram pipetados 100 μL da solução de DMSO 5% em caldo MH, sem amostra, sendo este, portanto, o controle de DMSO. Na linha G foram pipetados 100 μL de MH sem inóculo, com as respectivas concentrações dos extratos, sendo portanto, o controle de extratos. Em seguida, 5 μL de cada inóculo foi depositado em todos os orifícios da placa, com exceção dos poços da linha G que foram utilizados como controle da esterilidade do meio e das amostras. As microplacas foram tampadas e incubadas a 35°C por 22 horas e após incubação foram fotografadas.

Após o período de incubação na estufa foram acrescentados em todos os poços 20 μL de resazurina 0,1% em solução fisiológica 0,9% e as placas foram novamente incubadas por 2 horas.

A leitura das placas com os microrganismos foi realizada através da comparação da turvação das amostras nos poços antes de acrescentar a resazurina e após acrescentar a resazurina, sendo que o aumento da turbidez ou opacidade no meio indica o crescimento de microrganismos (LENNETTE *et al.*, 1985), a permanência da coloração azul indica ausência de microrganismo e a mudança da coloração azul para rosa indica a presença de microrganismo.

Resultados e Discussão

Os resultados de toxicidade das amostras com suas respectivas concentrações letais 50% contra *A. salina* estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2. CL₅₀ dos extratos e frações obtidos das folhas de *Psidium myrsinites* frente a *Artemia salina*.

Extratos	CL ₅₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24 horas	Grau de Toxidade Nguta et al., (2012)
Óleo Essencial	95,30	Forte
Extrato Bruto Acetônico	6.389,60	Não tóxico
Extrato Bruto Etanólico	11.336,90	Não tóxico

Frações	CL ₅₀ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 24	Grau de Toxidade Nguta et al.,
---------	--	--------------------------------

	horas	(2012)
Hexano	205,70	Moderado
Clorofórmico	1.323,30	Não tóxico
Intermediária	1.329,30	Não tóxico
Clorofórmio	1.329,30	Não tóxico
Acetato de Etila	1.582,10	Não tóxico

De acordo com Nguta et. al., (2012) há uma relação entre a toxicidade e a CL₅₀ de extratos vegetais sobre a *Artemia salina*. Os valores de CL₅₀ menores que 100 µg/mL apresentam alta atividade toxicológica, CL₅₀ entre 100 µg/mL e 500 µg/mL apresentam moderada atividade toxicológica, CL₅₀ entre 500 µg/mL e 1000 µg/mL apresentam fraca atividade toxicológica e CL₅₀ acima de 1000 µg/mL são considerados não tóxicas.

A forte toxicidade do óleo essencial sobre os náuplios é indicativo da presença de potentes compostos citotóxicos nas plantas. Dessa forma, esse teste tem sido utilizado como uma pré-avaliação da toxicidade de compostos.

A ausência de toxicidade do EBE, EBA e das frações clorofórmio, intermediária de clorofórmio e acetato de etila pode ser uma vantagem quando considerado um possível uso dos extratos no desenvolvimento de novos fitoterápicos para o uso humano.

Atividade Antimicrobiana

Os resultados do ensaio microbiológico para o óleo essencial, extrato bruto etanólico e extrato bruto acetônico estão representados na tabela 3.

Tabela 3. CMI (µg.mL⁻¹) do óleo essencial e dos extratos bruto etanólico e acetônico de *Psidium myrsinites* frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Bactérias	OE (µg.mL ⁻¹)	EBA (µg.mL ⁻¹)	EBE (µg.mL ⁻¹)
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	≥ 2000	250	500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥ 2000	125	125
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	≥ 2000	62,5	125
<i>E. coli</i> ATCC 25312	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000

Utilizou-se a classificação de Holetz et. al., (2002) para a determinação da atividade antimicrobiana das amostras testadas, sendo que os extratos que apresentam CMI menor que 100 µg.mL⁻¹ possuem boa atividade antimicrobiana,

extratos com CMI entre 100 a 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ possuem atividade antimicrobiana moderada, extratos com CMI entre 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ possuem atividade fraca e aqueles que possuem atividade antimicrobiana acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados inativos. Não foi possível a realização da leitura da atividade antimicrobiana em espectrofotômetro devido à provável interação da resazurina com pigmentos e outras moléculas presentes nos extratos vegetais.

Através dos resultados obtidos pela leitura visual foi verificado que o óleo essencial é inativo, já que apresentou CMI acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas as cepas bacterianas testadas. Por outro lado, o EBA e o EBE são inativos apenas para a linhagem de bactérias Gram-negativas, pois apresentaram CMI acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para as bactérias Gram-positivas foi possível verificar atividade antimicrobiana moderada dos EBA e EBE frente ao microrganismo *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* ATCC 25923.

É mais comum as bactérias Gram-positivas serem mais susceptíveis a ação dos extratos vegetais do que bactérias Gram-negativas (KALEMBA & KUNICKA, 2003). As bactérias Gram-negativas apresentam maior resistência a ação de agentes antimicrobianos por terem uma superfície hidrofílica na membrana rica em lipopolissacarídeos, o que forma uma barreira contra as macromoléculas hidrofóbicas presentes em alguns compostos vegetais e antibióticos (OETTING, 2005).

Em um estudo realizado por Pereira (2010), os óleos essenciais de diferentes quimiotipos de *P. myrsinites*, testados pelo teste de CMI apresentaram atividade antimicrobiana moderada da amostra de *P. myrsinites* 2 para *S. aureus* ATCC 12692 e boa atividade antimicrobiana para *E. Coli* MR 27, enquanto que a amostra de óleo essencial da *P. myrsinites* 1 apresentou fraca atividade antimicrobiana para *E. Coli* MR 27 e a amostra 3 apresentou fraca atividade antimicrobiana para *E. Coli* MR 27 e *P. aeruginosa* ATCC 15442.

As diferenças nos resultados do presente estudo e dos demais pode ser atribuída a diversos fatores como as condições de cultivo, meio de cultura, concentrações de substâncias testadas e dispersão e emulsificação dos agentes utilizados (RIOS & RECIO, 2005). Os resultados para as frações estão dispostos na tabela 4.

Tabela 4. CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) das frações acetato de etila, aquosa (EBA), clorofórmio, hexano, intermediária clorofórmio de *Psidium myrsinites* frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias	Frações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	Acetato de Etila	Aquosa (EBA)	Clorofórmio	Hexano	Intermediária Clorofórmio
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	500	2000	1000	500	500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	250	500	500	62,5	250
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	250	250	1000	125	250
<i>E. coli</i> ATCC 25312	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000	≥ 2000

De acordo com os resultados obtidos foi possível verificar que as frações são inativas frente a linhagem Gram-negativa, visto que todas apresentaram CMI acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Conforme foi verificado, os melhores resultados de CMI foram frente as cepas Gram-positivas, visto que com exceção da fração clorofórmio que apresentou atividade antimicrobiana fraca contra *S. Aureus* ATCC 29213 e *S. Epidermidis* ATCC 12228, tanto os extratos quanto as frações testadas apresentaram atividade antimicrobiana entre moderada e boa. Já nas bactérias Gram-negativas, não foi verificado atividade antimicrobiana para nenhuma das amostradas testadas.

Considerações Finais

De acordo com os resultados obtidos do bioensaio com *A. salina*, o óleo essencial e a fração hexano obtida através do EBE apresentaram toxicidade ativa, o que indica a presença de compostos citotóxicos. Foi confirmado também a potencial atividade antimicrobiana do EBA, EBE e das frações acetato de etila, aquosa (EBA), hexano e intermediária de clorofórmio contra algumas cepas Gram-positivas. Dessa forma, novas pesquisas para identificação e isolamento de compostos bioativos presentes na espécie *P. myrsinites* podem ser incentivadas para comprovação da sua potencial atividade biológica e para o desenvolvimento de novos produtos naturais no tratamento de doenças decorrentes de infecções bacterianas.

Agradecimentos

Universidade Estadual de Goiás, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Programa de Bolsas de Iniciação Científica da UEG (PBIC/UEG).

Referências

AMARAL, E. A.; SILVA, RMG. Avaliação da Toxicidade Aguda de Angico (*Anadenanthera falcata*), pau-santo (*Kilmeyera coreacea*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e cipó-de-são- joão (*Pyrostegia venusta*), por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **Perquirêre**, v. 5, 2008.

BIANCHETTI, P. Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana de extratos aquosos e etanolicos de plantas da família Myrtaceae frente ao micro-organismo *Escherichia coli*. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário Univates, Lajeado, 2014.

BONA, E. A. M., PINTO, F. G. S., FRUET, T. K., JORGE, T. C M., MOURA, A. C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanolicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n.3, p 218-225, 2014.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e Medicamentos: Uma abordagem multidisciplinar**. 1ª ed. São Paulo: Santos, p 1-15, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 8 Edition: Approved Standard M07-A8. Wayne, PA, USA: **CLSI**, 2009.

FRANZON, R. C., CAMPOS, L.Z.O.; PROENÇA, C.E.B.; SOUSA-SILVA, J.C. Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. **Embrapa Cerrados**. Planaltina, DF, 2009.

HOLETZ, et. al. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the

treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

KALEMBA D., KUNIKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.10, p. 813-829, 2003.

LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.J.; SHADOWMY, H.J. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985.

LOGUÉRCIO, A. P., BATTISTIN, A., VARGAS, A. . C., HENZEL, A. WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência rural**, Santa Maria, v 35, n. 2, p. 371 -376, 2005.

MOLINAS-SALINAS, G. M.; SAID-FERNANDÉZ, S. A modified microplate cytotoxicity with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). **Pharmacologyonline**, v.3, p. 633-638, 2006.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenyan medicinal plants using *Artemia Salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v. 14, n.2, p. 358 -361, 2012.

OETTING, L.L. Extratos vegetais como promotores de crescimento de leitões recém-desmamados. 2005. 66f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2005

PEREIRA, C. K. B. Estudo químico e atividades microbiológicas de espécies do gênero *Psidium* (Myrtaceae). 2010. 120f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Regional de Cariri, Cariri, 2010.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; THOMSEN, W. J. Bioassay Techniques for Drug Development. **1ª. Ed. Singapore**, Taylor & Francis e-Library, 2005.