

Estudo da atividade antimicrobiana das folhas de *Cayaponia citrullifolia* (Griseb.) Cogn. (Cucurbitaceae).

Kaysson Rodrigues de Oliveira* (IC). Yara Cecília Monteiro Oliveira (IC). Plínio Lázaro Faleiro Naves (PQ). Geralda de Fátima Lemes (PQ); yaracmoqi@gmail.com.

Universidade Estadual de Goiás - Campus de Ciências Exatas e Tecnológicas. BR 153, Nº3105
Fazenda Barreiro do Meio- Campus Henrique Santillo- Anápolis. Caixa Postal 459, CEP 75132400.

Atualmente o estudo interdisciplinar de produtos naturais se faz de total importância para o desenvolvimento da farmacologia moderna, na busca de novos agentes biológicos potenciais. Os produtos naturais estão envolvidos nas várias funções biológicas das plantas onde ocorrem, podem ter muita aplicação no setor produtivo, principalmente na medicina como medicamentos. Dentro deste contexto, sendo o Brasil dono do maior número de angiospermas do mundo, torna-se imprescindível a realização de trabalhos interdisciplinar onde seja possível selecionar agentes biológicos a partir desses recursos naturais, devido principalmente ao rápido crescimento da resistência bacteriana à agentes antimicrobianos atuais. Sendo assim, se faz de total relevância a busca por novas moléculas com potencial antimicrobiano, que possa vir a serem utilizadas na produção de antimicrobianos mais eficazes. A família Cucurbitaceae é muito conhecida por suas características nutritivas e medicinais, principalmente das espécies do gênero *Cayaponia*. A espécie *Cayaponia citrullifolia* é uma planta trepadeira ainda pouco estudada e o estudo da atividade antimicrobiana de suas folhas, evidenciou que nenhuma das amostras estudadas demonstraram sensibilidade ou inibição do crescimento bacteriano para as 5 cepas utilizadas em concentração $< 2000 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Cucurbitaceae, *Cayaponia*, *Cayaponia citrullifolia*, antimicrobiano.

Introdução

O estudo químico voltado para produtos naturais é de suma importância para a busca de agentes biológicos potenciais, além de promover o desenvolvimento da ciência e principalmente da farmacologia moderna (OSTROSKY et al, 2008).

O homem sempre desfrutou das plantas como um recurso alimentício oferecido pela natureza. Porém, foi após séculos, que o poder farmacológico das plantas foi reconhecido devido ao desenvolvimento da tecnologia, a qual possibilitou o isolamento e a elucidação estrutural de princípios ativos benéficos presentes nas plantas (DEVIIENNE; RASSI, 2004; MATOS, 2015; SOARES, 2010).

Sendo o Brasil dono de uma grande biodiversidade, como o bioma cerrado, diariamente se faz crescer o interesse na investigação de plantas medicinais deste bioma como fonte de compostos bioativos de grande interesse ao homem (VIOLANTE, 2008). Dentre as variadas famílias com potencial terapêutico encontradas no território brasileiro, a família Cucurbitaceae é uma delas. Com aproximadamente 95 gêneros, a família Cucurbitaceae é conhecida por suas características nutritivas e medicinais, como as espécies do gênero *Cayaponia*: *C. racemosa* (antitumoral) e *C. pilosa* (emenagoga, anti-sifílica e purgativa) (ABELHA et al, 2006).

O gênero *Cayaponia* constitui um dos mais vastos dentro da família Cucurbitaceae, com aproximadamente 60 espécies, de ocorrência na América do Sul e algumas na África Ocidental (NEE, 2007). A espécie *Cayaponia citrullifolia* é uma das espécies do gênero *Cayaponia*. Ainda com poucos estudos relatados até o momento, sua investigação biológica se faz de total importância na busca de novas substâncias benéficas, já que houveram tantos registros de outras espécies do mesmo gênero.

O consumo excessivo e inapropriado de drogas antimicrobianas, tanto sintéticas como naturais, tem intensificado consideravelmente a resistência bacteriana à agentes antimicrobianos atuais. E está é uma das principais preocupações da medicina moderna. Sendo assim, um dos estudos que tem se tornado ultimamente de grande relevância, é o da busca de novas moléculas para a produção de antimicrobianos mais eficazes que combatam esta resistência microbiana (CORDOVA, 2010; DUARTE, 2006; GUIMARÃES et al., 2010; MATOS, 2015).

Assim, se faz certa a necessidade de se buscar e desenvolver estudos de forma urgente, para a busca de antimicrobianos mais eficazes e de baixo custo (SILVEIRA et al., 2012), através de pesquisas que compreendam o mecanismo genético da resistência microbiana, para que assim seja possível obter novas drogas (LOGUERCIO et al., 2005).

Na família Cucurbitaceae algumas espécies apresentaram atividade antibacteriana, a exemplo dos extratos clorofórmicos da polpa e do fruto de *S. edule* (chuchu), os quais foram ativos frente a *E. coli* ATCC 8739 (SIBI et al., 2013). Já os extratos etanólicos das folhas e dos caules de *Siraitia grosvenorii* Swingle, mostraram ação bacteriostáticas para a *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*,

Micrococcus luteus e *Candida albicans* (LI et al., 2014). Citam ainda a atividade antibacteriana do extrato bruto das sementes de *Momordica charantia* L, frente a *E. coli*, *Salmonella typhi* e *S. aureus* (JABEEN et al., 2014).

Material e Métodos

Para a determinação da CMI, o bioensaio foi realizado submetendo as amostras-teste de extaro bruto etanólico frações hidrometanólica e acetato de etila, a microdiluição em caldo. Este ensaio foi realizado conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) para testes de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbias (CLSI, 2009).

Micro-organismos

Nos testes antimicrobianos foram utilizadas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC), mantidas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Goiás (UEG), descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Microrganismos utilizados na determinação da concentração mínima inibitória (CMI).

Microrganismo	ATCC
Bactérias Gram(+)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
Bactérias Gram (-)	
<i>Escherichia coli</i>	8739
<i>Escherichia coli</i>	25312
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853

Manutenção das cepas

A manutenção das cepas foi realizada conforme descrito por Silva e colaboradores (2008) com pequenas modificações. Primeiramente foram realizados repiques das cepas em meio sólido ágar *Mueller Hinton*, pela técnica de esgotamento por estrias, a fim de se obter colônias isoladas. As placas foram

incubadas a 35 °C por 24 horas. Após esse tempo, transferiu-se de 3 a 5 colônias isoladas e típicas para um tubo de ensaio com vedação contendo 15 mL de caldo BHI (*brain heart infusion*) contendo 20% de glicerol. Em seguida agitou-se o tubo de ensaio em agitador (vórtex) por 15 segundos, para melhor homogeneização. Os tubos foram incubados à 35 °C por 12 horas e, em seguida, transferidas alíquotas de 1,0 mL para microtubos tipo Eppendorf previamente esterilizados e devidamente rotulados. Os tubos foram armazenados a 8 °C, por sete dias e, em seguida congeladas em freezer a -20 °C.

Para realização do bioensaio as cepas foram reativadas em ágar *Mueller Hinton* pela técnica do esgotamento. As placas foram semeadas com o microrganismo de interesse, com o auxílio de alças de platina e em seguida incubadas a 35 °C por 24 h.

Preparação dos inóculos

Os inóculos bacterianos foram preparados 15 minutos antes da próxima etapa. Aqui eles foram suspensos em solução salina estéril (NaCl 0,9 %) até obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, obtida por leitura em espectrofotômetro a 625 nm (79,4% a 83,2% de transmitância). Em seguida, uma diluição 1:10 em solução salina 0,9 % foi preparada, obtendo uma concentração de células de 10^7 UFC mL⁻¹.

Determinação da CMI

O meio de cultura utilizado neste ensaio foi o caldo *Muller Hinton* (MH) duas vezes concentrado. Por motivos de solubilidade, as únicas amostras empregadas neste bioensaio foram o extrato bruto e as frações hidrometanólica e acetato de etila, sendo que para melhor solubilização do extrato e da fração acetato de etila, foi necessária a adição de DMSO 5%. As amostras foram diluídas em caldo MH, obtendo-se soluções com concentrações de 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62,5 µg.mL⁻¹. Também foi incluído neste ensaio os controle de teste, utilizando o antibiótico Cloranfenicol nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg.mL⁻¹; controle de viabilidade (caldo MH e as cepas bacterianas); e controle de solvente (DMSO 5% e as cepas bacterianas).

Em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em “V”, providas de tampa e com auxílio de uma micropipeta, a placa foi organizada de modo a conter 100 μL da amostra na concentração a ser testada e 5 μL da suspensão bacteriana, sendo um poço para cada tipo de cepa, sendo que o mesmo foi repetido para o controle de teste, controle de viabilidade e controle de solvente. Também foram organizadas no bioensaio, poços contendo o controle negativo (branco) de todos os controle testados, em todas as concentrações estudadas, menos as cepas bacterianas.

A microplaca foi tampada e incubadas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16-20 h. Após este período, foi realizada leitura visual, observando se há ou não sedimentação ou turvação provindas das bactérias. A CMI foi definida como a menor concentração da amostra em $\mu\text{g.mL}^{-1}$, capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano. O bioensaio foi realizado em triplicata.

Resultados e Discussão

A avaliação da capacidade antimicrobiana do extrato bruto e das frações hidrometanólica e acetato de etila, foi realizada a partir do método de microdiluição, com determinação da concentração mínima inibitória (CMI), que corresponde a menor concentração de amostra necessária para inibir o crescimento visível do microrganismo, após um período de contato do microrganismo com a amostras em várias concentrações.

O valor da CMI foi determinado a partir da observação da ausência de sedimentação ou turvação nos poços contendo com as amostras e a suspensão bacteriana, após o período de incubação de 24 horas.

Com a análise dos resultados da CMI (Tabela 2) do extrato bruto e das frações hidrometanólica e acetato de etila, se determina que nenhuma das amostras estudadas demonstraram sensibilidade ou inibição do crescimento bacteriano para as 5 cepas utilizadas em concentração $< 2000\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Enquanto que a droga clássica utilizada cloranfenicol, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) inibiu o crescimento microbiano da *P. aeruginosa* na concentração de $15\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. Houve também a inibição do crescimento microbiana para a *S. epidermidis* na concentração de $60\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que para o restante das cepas utilizadas não houve atividade antimicrobiana em nenhuma de suas concentrações.

Porém, a fração acetato de etila apresentou CMI de $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Tal fato pode ser atribuído, a maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas, devido estas apresentarem uma barreira de peptidoglicano presente em sua parede celular menor e mais frágil que as Gram-negativas, as quais são bactérias mais resistentes a ação antimicrobiana (DUARTE et al., 2014; RABÊLO et al., 2014).

Tabela 2- Concentração mínima inibitória para o extrato bruto e as frações acetato de etila e hidrometanólica.

Amostra	CMI ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)				
	<i>E. coli</i> 8739	<i>E. coli</i> 25312	<i>S. aureus</i> 25923	<i>S.</i> <i>epidermidis</i> 12228	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> 27853
Extrato bruto	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
Fração hidrometanólica	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000	> 2000
Fração acetato de etila	> 2000	> 2000	2000	2000	> 2000
Cloranfenicol	> 120	> 120	> 120	60	15

De acordo com a CMI obtida do bioensaio com as amostras de extrato bruto etanólico e frações hidrometanólica e acetato de etila das folhas de *C. citrullifolia*, se determina que a ação antimicrobiana não se encontra nesta parte da planta. Tal ação pode ser encontrada em outras de suas frações ou em outra parte da planta estudada que não foram estudadas aqui.

Considerações Finais

A partir do estudo realizado para a determinação da atividade antimicrobiana das amostras de extrato bruto etanólico e frações hidrometanólica e acetato de etila das folhas de *Cayaponia citrullifolia*, não foi demonstrado por nenhuma destas amostras, sensibilidade ou inibição do crescimento bacteriano para as 5 cepas utilizadas em concentração $< 2000 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Programa de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico PBIT/UEG, por patrocinar e possibilitar o desenvolvimento deste projeto, assim como a UEG-CCET a partir de apoio técnico. A Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação.

Referências

ABELHA, T. F., DUSMAN, L. T., COSTA, W. F. Estudo preliminar do potencial antioxidante das folhas de *Cayaponia podantha* Cong. (Cucurbitaceae). In: **Anais da 58ª reunião anual da SBPC**, Florianópolis-SC, jul. 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. 8rd edn. Approved Standard M07-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

CORDOVA, S. M. Análise da atividade antimicrobiana de extratos isolados de plantas nativas da flora brasileira frente a *Mycoplasma arginini*, *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum*. **RBAC**, v. 42, n. 4, p. 241-244, 2010.

DEVIIENNE, K. F.; RASSI, G.; POZETTI, G. L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 3, p. 11-14, 2004.

DUARTE, Marta C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, outubro 2006.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, nº 3, 667-679, 2010.

JABEEN, U.; KHANUM, A. Isolation and characterization of potential food preservative peptide from *Momordica charantia* L. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.

LI, C.; LIN, L. M.; SUI, F.; WANG, Z. M.; HUO, H. R.; DAI, L.; JIANG, T. L. Chemistry and pharmacology of *Siraitia grosvenorii*: A review. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 2, p. 89-102, 2014.

LOGUERCIO, 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**, v. 35, n. 2, p. 371-376, 2005.

NEE, M. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: *Cucurbitaceae*. **Rodriguésia**, n. 58, p. 703-707, 2007.

MATOS, M. J. C. P. P. Novos métodos cromatográficos para análise e separação de novos produtos naturais antimicrobianos. **Dissertação de Mestrado**, 2015.

OSTROSKY, Elissa A. et al. Métodos Para Avaliação da Atividade antimicrobiana e Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI) de plantas Medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol.18, n.2, pp. 301-307, 2008.

SIBI, G.; KAUSHIK, K.; DHANANJAYA, K.; RAVIKUMAR, K. R.; MALLESHA, H. Antibacterial activity of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz against Gram negative food borne bacteria. **Advances in Applied Science Research**, v. 4, n. 2, p. 259-261, 2013.

SILVEIRA, S. M., CUNHA, A., SCHEUERMANN, G. N., SECCHI, F. L., VERRUCK, S., KROHN, M., VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavanda angustifolia* (lavanda). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.3, p. 471-80, 2012.

SOARES, C. M. L. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana e antitumoral de extratos de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne (Jatobá do Cerrado). 2010.

VIOLANTE, I. M. P. Avaliação do potencial antimicrobiano e citotóxico de espécies vegetais do Cerrado da Região Centro-Oeste. **Dissertação de Mestrado**, 2008.