

Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae)

V. V. Vale¹ & J. F. F. Orlanda^{2*}

¹Estudante de Iniciação Científica da Faculdade de Imperatriz (FACIMP), 65900-000, Imperatriz – MA, Brasil

²Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC), Universidade Estadual do Maranhão, Campus de Imperatriz, 65901-480, Imperatriz – MA, Brasil

*ffranca@cesi.uema.br

(Recebido em 29 de janeiro de 2010; aceito em 7 de abril de 2011)

Os produtos naturais extraídos de plantas exercem um papel importante no processo de descoberta de fármacos, sejam como modelos estruturais para a síntese de moléculas novas ou pelas suas propriedades farmacológicas. Uma planta medicinal bastante utilizada no nordeste brasileiro é a *Euphorbia tirucalli* Linneau, popularmente conhecida como avelós ou pau-pelado, que apresenta atividade no tratamento de diversas patologias sem comprovação científica da sua eficiência e segurança. O presente trabalho teve como objetivo realizar estudos fitoquímicos e avaliar os efeitos de extratos etanólicos de avelós sobre o crescimento *in vitro* de bactérias patogênicas. Os resultados mostraram que o extrato fresco de avelós apresentou potencial antimicrobiano sobre o crescimento das bactérias patogênicas *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Serratia odorifera*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, com formação de halos de inibição variando de 9,0 a 20,0 mm de diâmetros. A atividade antibacteriana confirmada para o extrato etanólico, pode ser devido à presença de taninos, saponinas e flavonóides que apresentam diversas aplicações biológicas comprovadas. Estes resultados mostraram que a utilização de extrato alcoólico de avelós pode ser uma alternativa promissora para o controle de microrganismos patogênicos.

Palavras-chave: avelós, extrato alcoólico, atividade antimicrobiana

Natural products from plants play an important role in the process of drug discovery, either as structural models for the synthesis of new molecules or their pharmacological properties. A widely used medicinal plant in northeastern Brazil is the *Euphorbia tirucalli* Linneau, popularly known as avelós or stick-naked, which has activity in treating various diseases without scientific proof of its efficiency and safety. This study aimed to evaluate phytochemical studies and evaluate the effects of ethanol extracts of hazelnuts on the *in vitro* growth of pathogenic bacteria. The results showed that the extract of fresh avelós presented antimicrobial activity on the growth of the pathogenic bacteria *Salmonella typhi*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Serratia odorifera*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, with the formation of inhibition zones ranging from 9,0 to 20,0 mm in diameter. The activity antibacteriana confirmed for the ethanol extract may be due to the presence of tannins, saponins and flavonoids which have several biological applications of proven. These results showed that the use of alcoholic extracts of hazelnuts may be a promising alternative for the control of pathogenic microorganisms.

Keywords: avelós, alcoholic extract, antimicrobial activity

1. INTRODUÇÃO

A *Euphorbia tirucalli* Linneau, pertencente à família Euphorbiaceae, conhecida popularmente como pau-pelado, graveto-do-cão, árvore lápis ou avelós. É um arbusto originário da África e trazido para o Brasil com fins ornamentais, possuindo altura em torno de 2 a 6 metros, apresentando ramos jovens cilíndricos e suculentos, folhas pouco visíveis que caem pouco tempo após surgirem. No Brasil, a planta se adaptou muito bem ao clima quente, desenvolvendo látex de melhor qualidade para uso medicamentoso com propriedades anticarcinogênicas, antiasmáticas, antiespasmódicas, antibióticas, antibacterianas, antiviróticas, fungicidas, expectorantes, purgativo e antisyfilitico [1, 2, 3, 4].

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre diversos microrganismos patogênicos, estudos buscam por medicamentos que apresenta maior espectro de ação, baixo custo e menor indício de resistência bacteriana, haja vista que já existe resistência bacteriana a alguns produtos antimicrobianos [5, 6]. A resistência a agentes antimicrobianos é preocupante e requer não somente a pesquisa para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, mas também o desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo realizar a triagem fitoquímica e avaliar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico obtido das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* L. frente a cepas de bactérias patogênicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

Partes aéreas e caules de *Euphorbia tirucalli* L. foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Faculdade de Imperatriz (FACIMP) na cidade de Imperatriz (Maranhão), no período de julho a setembro de 2010. O material botânico foi identificado pelo Professor M. Sc. Marcelo Francisco da Silva da Universidade Estadual do Maranhão, Campus de Imperatriz. A exsicata depositada no herbário dessa instituição sob registro 0048/2010.

O material vegetal foi lavado em água destilada, com descarte dos atacados por praga ou doenças. Uma parte do material foi separado para o preparo do extrato fresco. O restante foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar forçado à temperatura de 40 °C durante 48 horas, e conservado ao abrigo de luz e umidade.

Preparação do extrato etanólico bruto

O extrato bruto foi preparado utilizando 30 g da droga vegetal fresca e seca com maceração durante 15 dias, com etanol a 95% (30 g/300 mL), por três vezes. Após filtração, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida (40 °C) para aproximadamente 1/5 do seu volume. O material foi levado à estufa de secagem a temperatura de 40 °C por 24 horas para obtenção do extrato etanólico do caule e partes aéreas (EBETOH) e armazenado em frasco âmbar para posterior análise.

Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada no extrato etanólico, segundo metodologias adaptadas de [7, 8]. Os grupos químicos testados foram: heterosídeos antraquinônicos, saponinas, taninos, alcalóides, cumarinas e resinas, polissacarídeos, fenóis, açúcares redutores, proteínas e aminoácidos, flavonóides e catequinas, sesquiterpenolactonas, esteróides e triterpenóides, purinas e alcalóides. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Microrganismos

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de *Euphorbia tirucalli* L., foram utilizados cepas padrões de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Salmonella typhi* (ATCC 566K), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) e *Serratia odorifera* (ATCC 3077T). Os microrganismos selecionados são padrões para testes de suscetibilidade antimicrobiana, responsáveis por infecções em humanos e apresentam elevada resistência aos antimicrobianos comerciais.

Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi verificada pelo método de difusão em disco de papel (tipo 3 com 6 mm de diâmetro) no meio gelosado Müller Hinton (Oxoid), de acordo com a Norma M07-A8 [9]. As suspensões dos microrganismos-teste foram desenvolvidas em caldo BHI (brain heart infusion) por 24 horas (cerca de 10^8 UFC/mL) foram semeadas na superfície do meio, em placas de Petri, com auxílio de alça de Drigalsky (100 μ L /placa). Foram utilizados discos de 6 mm de diâmetro, embebidos com 20 μ L de uma solução a 0,09 mg/mL dos extratos em estudo, e as placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em milímetro (mm) pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas três repetições. Os solventes bem como os diluentes utilizados na dissolução dos extratos foram usados como controle negativo.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a determinação da concentração mínima inibitória foram utilizadas concentrações de 0,09; 0,06; 0,03 e 0,01 mg de extrato da planta diluído para 1 mL de meio líquido BHI, aos quais foram repicadas as cepas bacterianas. Esses tubos foram acondicionados em estufa bacteriológica em temperatura de 35 °C por 24 h. Para averiguação dos resultados foi semeado 10 μ L de cada solução em placas contendo o meio de cultura Ágar Müeller-Hinton e novamente mantido em estufa bacteriológica sob as mesmas condições. Os resultados foram determinados de acordo com o aparecimento ou não de colônias bacterianas na superfície do meio de cultura.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A investigação fitoquímica dos extratos etanólicos das partes aéreas e caule de *Euphorbia tirucalli* L. frescas resultaram na verificação da presença de alcalóides, flavonóides, saponinas, esteróides, triterpenóides, cumarinas e resina (Figura 1).



Figura 1. Triagem fitoquímica do extrato etanólico fresco de *Euphorbia tirucalli* L.

Nos extratos etanólicos de avelós obtidos a partir de material vegetal seco, não foram observados a presença de flavonóides (Figura 2).

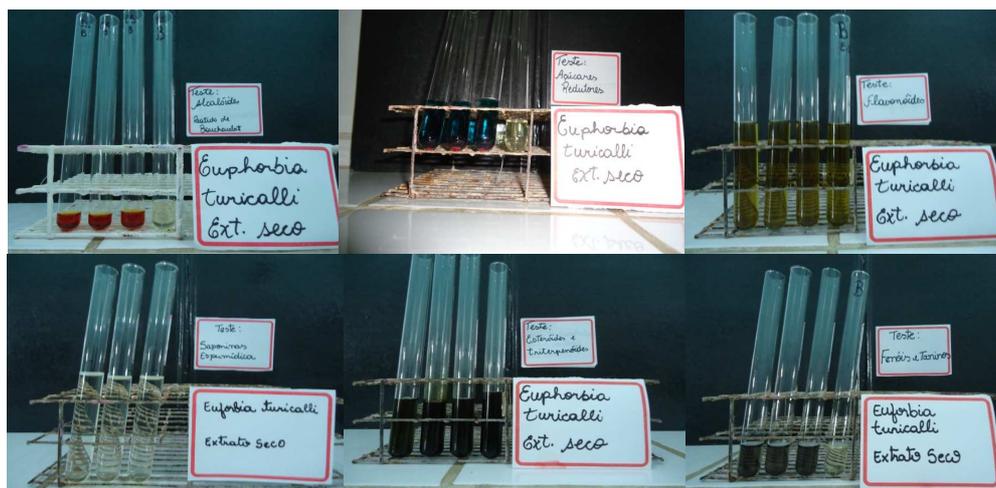


Figura 2. Triagem fitoquímica do extrato etanólico seco de *Euphorbia tirucalli* L.

O extrato etanólico das partes aéreas frescas de *Euphorbia tirucalli* L., apresentou melhor atividade antimicrobiana que o extrato obtido das plantas secas (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antibacteriana do extrato alcoólico de avelós fresco e seco na concentração de 0,09 mg/mL frente às bactérias patogênicas.

Microrganismos	Halos de Inibição em milímetro (mm)		
	Extrato fresco de avelós	Extrato seco de avelós	Controle Negativo (Etanol 95%)
<i>Escherichia coli</i>	7,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Salmonella typhi</i>	12,50 ± 0,50	6,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	9,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19,00 ± 0,00	14,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Citrobacter freundii</i>	11,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Serratia odorifera</i>	10,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Os valores são médias de três repetições ± erro padrão.

De acordo com a Tabela 1, podemos observar que não houve inibição do crescimento bacteriano quando usado os controles com o diluente (álcool etílico a 95%), demonstrando que o solvente não influenciou na formação do halo produzido pelos extratos.

Os antibióticos tetraciclina e cefalexina não apresentaram halos de inibição para esses microrganismos, podendo indicar o desenvolvimento de resistência para esses medicamentos se tornando imune aos seus efeitos, comprovando a necessidade de uso de novas drogas para combatê-los.

Na avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de avelós fresco ficou demonstrado que o extrato apresentou potencial antibacteriano sobre o crescimento de *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Citrobacter freundii* e *Serratia odorifera*, com diâmetro médio dos halos de inibição variando de 9,0 a 19,0 mm. O mesmo não aconteceu com relação às outras cepas bacterianas testadas, uma vez que houve menor inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, com halos de inibição de 7,0 mm.

A atividade antibacteriana, detectada para o extrato etanólico bruto, pode ser devida à presença de taninos [10, 11], saponinas [12], flavonóides ou terpenos em sua composição química, pois há relatos na literatura que descrevem atividades antimicrobianas dessas classes de compostos [13, 14, 15, 16, 17].

Após a incubação com o extrato etanólico obtido a partir da planta seca, verificou-se que não ocorreu inibição do crescimento bacteriano. Com exceção da inibição do crescimento de *Vibrio parahaemolyticus* ao redor dos discos impregnados com 0,09 mg/mL, com halos de

14,00 ± 0,00 mm. A ausência da atividade antimicrobiana pode estar relacionada com a ausência de compostos flavonóidicos nos extratos testados.

Nos testes de concentração mínima inibitória (CMI) foram observados que concentrações abaixo de 0,01 mg/mL dos extratos etanólicos obtidos de plantas frescas e secas de avelós não promoveram a inibição do crescimento das sete bactérias em estudo.

Estes similares foram realizados por [18] e [19] para os extratos aquoso e metanólico de *E. tirucalli*, evidenciando perspectivas para a obtenção de antibióticos naturais.

Logo, o potencial antimicrobiano exibido pelo EBEtOH do extrato etanólico de avelós frente a bactérias Gram-positivas e negativas deve ser investigado com mais detalhes, a fim de contribuir para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos naturais, os quais, se viáveis, representarão alternativas terapêuticas aplicáveis no tratamento de processos infecciosos nosocomiais.

4. CONCLUSÃO

As análises fitoquímicas realizadas neste trabalho revelaram que a espécie estudada apresentou compostos pertencentes às classes dos alcalóides e flavonóides, que podem ser potencialmente ativos em modelos biológicos e farmacológicos.

Os ensaios antibacterianos indicaram sensibilidade do extrato etanólico de avelós fresco, desse modo, ficou demonstrado que o extrato apresentou potencial antibacteriano sobre o crescimento de *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Citrobacter freundii* e *Serratia odorifera*, com diâmetro médio dos halos de inibição variando de 10,0 a 19,0 mm.

Tendo em vista a grande diversidade de espécies vegetais presentes no Brasil, temos um grande potencial fitoquímico armazenado à espera de novas pesquisas que comprovem o verdadeiro valor biológico das plantas medicinais, de baixo custo e de fácil acesso a população.

-
1. VARRICCHIO, M. C. B. N. **Estudos Integrados: Biotecnologia, Toxicologia, Metabólitos Especiais e Atividade Antitumoral de *Euphorbia tirucalli* L.** Dissertação de Mestrado sob a orientação de Celso Lage e Co-orientação de Ricardo Machado Kuster 2003/2004. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
 2. WHELAN, L. C.; RYAN, M. F. Ethanol extracts of *Euphorbia* and other ethnobotanical species as inhibitors of human tumour cell growth. **Phytomedicine**; USA, 2003.
 3. FURSTENBERGER, G.; HECKER, E. On the active principles of the Euphorbiaceae, XII. Highly unsaturated irritant diterpene esters from *Euphorbia tirucalli* originating from Madagascar. **Journal of Natural Products**; Germany, may-jun. 1986.
 4. NEIVA, L. **A cura do Câncer pelo Aveloz**. RJ: Arte Nova S.A, 1968.
 5. PAZHANI, G.P. et al. Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* Type 1 strains associated with epidemic and sporadic dysenteries in Eastern India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.2, p.681-4, 2004.
 6. NASCIMENTO, G. G. F; LOCATELLI, J; FREITAS, P. C. D; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extract and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz J Microbiol** 31: 247-256, 2000.
 7. BARBOSA, W. L. R; QUINARD, E.; TAVARES, I. C. C; PINTO, L. N.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. **Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais**. 2 ed. Revista científica da UFPA, 2004.
 8. MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: UFC, 1997. 141p.

9. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard**. 4th ed. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 99p., 2009.
10. SOTOHY, S.A.; ISMAIL, A.A.; MUELLER, W. Further studies on the antimicrobial properties of some plant materials in relation to their tannin content. **Proceedings of the Third Scientific Congress Egyptian Society for Cattle Diseases**, v.1, n.1-3, 1995.
11. SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry** v.30, p.3875-3883, 1991.
12. ISSAC, O. Die Ringelblume. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1992 apud SHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M.L. Saponinas. In: SIMÕES, C.O,S; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. (Orgs.) **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/Ed. Da UFSC, p. 616, 1999.
13. WENIGER, B; LOBSTEIN, A; UM, B.;VONTHORON-SÉNÉCHAU, C.; ANTON, R.; USUGA, N. J. ; BARAM, H.; LUGNIER, C. Bioactive triterpenoids from *Vochysia pacifica* interact with cyclic nucleotide phosphodiesterase isozyme PDE4. **Phytother Res**. 2005; 19:75-7.
14. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Editora da UFSC; 2004. p.615-56.
15. SINGH, B.; SINGH, S. Antibacterial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. **Phytother Res**. 2003 Aug; 17(7): 814-6.
16. PERRUCHON, S. Estudo das propriedades dos flavonóides para cosméticos através do relacionamento função-estrutura. **Cosmet Toilet**. 2002; 14(6):74.
17. GUTKIND, G.; NORBEDO, C.; MOLLERACH, M.; FERRADO, G.; DE TORRES, R. Antibacterial activity of *Achyrocline flaccida*. **J Ethnopharmacol**. 1984; 10:319-21.
18. MOHANA, D. C.; SATISH, S.; RAVESHA, K. A. Antibacterial evaluation of some plant extract against some human pathogenic bacteria. **Advances in biological research** 2 (3-4): 49 -55, 2008.
19. PAREKH, J.; CHANDRA, S. V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysisof some Indian medicinal plants. **Turk. J Biol**. 2007.