



Atividade antimicrobiana das folhas de *Casearia decandra* Jacq.

Antimicrobial activity of the leaves of *Casearia decandra* Jacq.

Recebido em 12/07/2010

Aceito em 20/05/2011

Katiuska Marins^{1*}, Regina Ferronato², Vanessa Zanatta¹, Neusa Fernandes de Moura²

^{1,3}Laboratório de Produtos Naturais, UNOCHAPECÓ, Santa Catarina, Brasil

^{2,4}UNOCHAPECÓ, Chapecó, Santa Catarina, Brasil

RESUMO

A atividade antimicrobiana das folhas da espécie *Casearia decandra* foi determinada utilizando o método de difusão em disco de papel filtro. Foram testados o extrato bruto e as frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, sendo que todas demonstram atividade antimicrobiana. Entre as frações testadas, a acetato de etila foi efetiva frente todas as bactérias testadas, apresentando maior halo de inibição frente a *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: *Casearia decandra*, difusão em disco, guaçatonga

ABSTRACT

The antimicrobial activity of the leaves of *Casearia decandra* species was determined using the method of paper filter disc diffusion. Also were tested the crude extract and the hexane, chloroform and ethyl acetate fractions, which all showed antimicrobial activity. Among the fractions tested, the ethyl acetate was effective against all the bacteria, showed largest inhibition zone against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Casearia decandra*, disk diffusion, guaçatonga

INTRODUÇÃO

Casearia decandra Jacq. pertencente à família Salicaceae, que compreende 50 gêneros com cerca de 1.000 espécies (Sobral & Jarenkow, 2006). É uma árvore caducifólia de 4 a 10 metros de altura encontrada em todo o Brasil (Lorenzi, 2006). *C. decandra* é popularmente conhecida como cambroé, pitumba, cafezeiro do mato e guaçatonga (Lorenzi, 2006). Em relação a sua composição química, apresenta lipídios do tipo óleo-resina e compostos fenólicos do tipo tanino (Thadeo et al., 2009).

Na medicina popular, a espécie *C. decandra* é utilizada como antiofídica, cicatrizante, anti-inflamatória e antitérmica (Gonçalves et al., 2009). E segundo estudo realizado por Menezes (2004), a espécie apresenta resposta

farmacológica em modelos experimentais de úlcera gástrica.

Diversos estudos já revelaram o potencial antimicrobiano das espécies do gênero *Casearia*, entre as espécies estudadas estão *C. multinervosa* (Mosaddik et al., 2004) e *C. sylvestris* (Schneider, 2008; Tavares et al., 2008). Porém atualmente nenhum estudo relata a atividade antimicrobiana dos extratos e frações da espécie *C. decandra*.

Desta forma, este trabalho visa avaliar a atividade antimicrobiana do extrato bruto, fração hexânica, clorofórmica e acetato de etila das folhas de *C. decandra* frente a várias cepas patogênicas, utilizando a metodologia

* **Contato:** Katiuska Marins, Unochapecó, Avenida Senador Attílio Fontana, 591 E, Bairro Efapi, Chapecó, SC, Brasil. CEP 89809-000, email: katiuska@unochapeco.eu.br

de difusão de papel filtro.

MÉTODOS

Coleta do material botânico

Casearia decandra foi coletada no município de Chapecó, Santa Catarina, Brasil, em janeiro de 2009. A identificação foi realizada pela professora Dr^a. Rosiane Berenice Nicoloso Denardin. E uma excisada da espécie (SMDB 12358) foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Obtenção do extrato e frações

Para a obtenção dos extratos e frações da espécie *C. decandra*, foram maceradas aproximadamente 60 a 80g de folhas em solução hidroalcolica de água:metanol (25:75 v/v - 1L), por um período de 48 horas. Após este período a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo e concentrada em evaporador rotativo a 40°C, obtendo-se assim o extrato bruto (EB).

O EB foi submetido à partição líquido-líquido com solventes orgânicos (hexano, clorofórmio e acetato de etila) em grau crescente de polaridade, resultando na fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FC) e fração acetato de etila (FA). Após, as frações foram concentradas em evaporador rotativo a 40°C, para a retirada do solvente. O extrato e as frações também foram liofilizadas, para a retirada completa da água remanescente. Acondicionadas em vidro âmbar e armazenados em geladeira (Costa, 2007).

Bactérias utilizadas

Para a realização da atividade antibacteriana foram utilizadas cepas padrão, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), sendo três Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), e quatro Gram-negativas: *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do EB, FH, FC e FA de *C. decandra* foi avaliada in vitro, pela metodologia de difusão em disco de papel filtro (Bauer et al., 1996), seguindo a padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em disco da NCCLS (2003).

Para a realização da metodologia, as bactérias liofilizadas foram ativadas em tubo contendo 0,5mL de caldo nutritivo e incubadas a 37°C, por um período de 48 horas. Depois de transcorrido este período, foi transferida uma alíquota de cada cultura microbiana para tubos contendo solução salina a 0,8%.

A turvação da suspensão microbiana foi padronizada de acordo com a escala nefelométrica de MacFarland, em 0,5 que corresponde à concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL). Após, alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana foi

semeada por superfície em Placas de Petri contendo 20mL de Ágar Mueller-Hinton.

Após preparado o material, o EB, FH, FC e FA, foram dissolvidos em metanol, de forma que a concentração final fosse de 50 µg/mL, 25 µg/mL e 10 µg/mL.

Para a aplicação do extrato e frações foram utilizados discos de papel filtro qualitativo de 10mm (milímetros) de diâmetro esterilizados por 20 minutos em luz ultravioleta. Sobre os discos foram aplicados 10µL de cada amostra nas três concentrações testadas. Depois da aplicação, o metanol foi evaporado, devido à volatilidade deste solvente.

Após as Placas de Petri foram incubadas por 16-18 horas a 35°C ± 1. Depois de transcorrido este período, com o auxílio de uma régua, os halos de inibição foram medidos em mm, incluindo-se o diâmetro do disco, de 10 mm.

Como controle positivo utilizou-se cloranfenicol (CLO), e como controle negativo utilizou-se metanol (MET), todos na concentração de 10 µg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de difusão fornece dados qualitativos. Sendo que, discos de papel filtro são os mais adequados quando se deseja trabalhar com extratos vegetais coloridos e/ou extraídos com solventes orgânicos. Nesta metodologia é possível evaporar o solvente do disco, devido à característica de volatilidade que alguns solventes apresentam. E a cor dos extratos não interfere na leitura dos resultados (Silveira et al., 2009).

Os resultados da atividade antimicrobiana do extrato (EB), fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FC) e fração acetato de etila (FA) da espécie *C. decandra* estão relacionados na Tabela 1.

De acordo com a Tabela 1, a espécie *C. decandra* foi ativa contra todas as bactérias testadas, em maior ou menor proporção. Em relação à atividade antimicrobiana da espécie, pode-se observar que na concentração de 10µg, o EB e a FA frente *S. epidermidis* e a FC frente *P. aeruginosa*, apresentaram halos de inibição maior que o controle positivo cloranfenicol.

Ao analisarmos os resultados dos halos de inibição do EB, FH e FA para as bactérias Gram-positivas, observamos que na concentração de 50µg os resultados são maiores que 15,00mm. Enquanto a FC não demonstrou halos de inibição frente as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* e *S. epidermidis*, em nenhuma concentração testada.

Dentre as bactérias Gram-positivas que apresentaram os maiores halos de inibição está a FA frente *S. epidermidis*, que na concentração de 50µg, demonstrou um halo de 34,66mm. As principais doenças causadas por este patógeno estão associadas ao uso de dispositivo médico hospitalar, tais como cateteres e próteses, podendo causar também septicemias e endocardites (Trabulsi & Alterthum, 2005).

Referente aos resultados para as bactérias Gram-negativas descritos na Tabela 1, os maiores halos de inibição estão associados à FC e demonstraram na concentração de 50µg, valores superiores a 20 mm. E dentre todos os resultados obtidos para as bactérias Gram-

negativas, a FC frente *S. flexneri*, apresentou o maior halo de inibição, de 26,66mm.

A *S. flexneri* é responsável pela shigelose, que provoca diarreia hemorrágica, infecção e ulcerações gastrintestinais (Murray et al., 2004). Este quadro clínico pode ser evitado pela prevenção higiênica, podendo-se utilizar a espécie *C. decandra* como anti-séptico tópico natural.

Em *screening* antimicrobiano realizado com 88 espécies vegetais, por Agripino et al., (2004), demonstrou-se que o extrato etanólico de *C. decandra* e *C. sylvestris* é inativo contra *S. aureus* e *E. coli*, pelo método de difusão em disco. Este resultado é comparável ao trabalho apresentado, uma vez que o EB frente *E. coli* não demonstrou halo de inibição. Nos dois estudos os extratos foram obtidos a partir de um álcool.

Tabela 1. Halo de inibição (mm) obtido para a *C. decandra*

| Bactérias | Concentração | EB ^a | FH | FC | FA | CLO ^b |
|-----------------------|--------------|-----------------|-------|-------|-------|------------------|
| <i>S. aureus</i> | 50µg | 20,66 | 20,33 | 0,00 | 22,00 | |
| | 25µg | 19,33 | 16,00 | 0,00 | 19,33 | |
| | 10µg | 12,33 | 16,00 | 0,00 | 12,33 | 19,00 |
| <i>S. epidermidis</i> | 50µg | 20,00 | 24,66 | 0,00 | 34,66 | |
| | 25µg | 16,00 | 12,00 | 0,00 | 22,33 | |
| | 10µg | 14,33 | 12,00 | 0,00 | 18,00 | 14,00 |
| <i>E. faecalis</i> | 50µg | 16,66 | 18,66 | 16,66 | 24,66 | |
| | 25µg | 16,66 | 12,00 | 12,00 | 18,66 | |
| | 10µg | 12,00 | 12,00 | 12,00 | 14,33 | 26,00 |
| <i>S. flexneri</i> | 50µg | 14,66 | 0,00 | 26,66 | 0,00 | |
| | 25µg | 12,33 | 0,00 | 16,33 | 0,00 | |
| | 10µg | 0,00 | 0,00 | 12,00 | 0,00 | 30,00 |
| <i>S. typhimurium</i> | 50µg | 0,00 | 12,00 | 20,66 | 16,66 | |
| | 25µg | 0,00 | 0,00 | 12,66 | 12,66 | |
| | 10µg | 0,00 | 0,00 | 12,00 | 12,66 | 26,00 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 50µg | 14,66 | 24,66 | 22,00 | 20,66 | |
| | 25µg | 12,00 | 0,00 | 18,00 | 18,00 | |
| | 10µg | 12,00 | 0,00 | 18,00 | 12,00 | 14,00 |
| <i>E. coli</i> | 50µg | 0,00 | 0,00 | 20,66 | 20,66 | |
| | 25µg | 0,00 | 0,00 | 18,66 | 14,66 | |
| | 10µg | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 12,66 | 28,00 |

Nota: ^a Amostras: EB (Extrato Bruto), FH (Fração Hexânica), FC (Fração Clorofórmica), FA (Fração Acetato de Etila); ^b Controle positivo: CLO (Cloranfenicol)

Conforme a Tabela 1 pode ser observado que este trabalho obteve valores de halos de inibição para o EB

frente *P. aeruginosa* e *S. aureus*, que variam de 12,00 a 20,66mm. Este resultado é contraditório ao descrito por Gonçalves et al., (2005) ao estudar o EB das folhas de *C. sylvestris* por difusão em disco. E Mosaddik et al., (2004) ao avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato metanólico das folhas de *C. multinervosa*. Estes não encontraram atividade frente *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Porém, para as espécies *C. costulata*, *C. grewiifolia* e *C. grayi*, Mosaddik et al., (2004) relatam atividade frente estas bactérias.

Neste contexto, Albernaz (2006) ao estudar a atividade antimicrobiana de *C. sylvestris*, também por difusão em disco, obteve para o extrato etanólico e FH da madeira da raiz, atividade frente *P. aeruginosa*. E para a FH da madeira do caule, casca da raiz e fruto obteve atividade frente *E. faecalis*. No trabalho apresentado, a FH das folhas de *C. decandra* frente às bactérias *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, obtiveram halos de inibição que variam de 12 a 24,66 mm.

Em trabalho descrito por Schneider et al., (2009), o EB, FH e FC da espécie *C. sylvestris*, foram efetivos contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. E a FA foi efetiva frente *S. typhimurium*, utilizando a metodologia de CIM. Esta metodologia fornece dados quantitativos, sendo muito utilizado para medir a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (Nascimento et al., 2007).

Acredita-se que a diferença encontrada entre os trabalhos descritos esteja relacionada com os extratos em estudo e as metodologias aplicadas. Além disso, as espécies apresentam diferenças como variabilidade de quimiotipos, ciclo vegetativo, sazonalidade, fatores extrínsecos e processo de obtenção, mesmo quando pertencentes ao mesmo gênero (Costa et al., 2009).

De acordo com o demonstrado neste trabalho, a espécie *C. decandra* apresentou os maiores halos de inibição frente às bactérias Gram-positivas quando comparadas as Gram-negativas. As bactérias Gram-positivas possuem uma quantidade maior de peptidoglicano (90%) em sua parede celular, o que torna a parede dessas mais espessa e rígida (Trabulsi & Alterthum, 2005). Desta forma, a parede das bactérias Gram-positivas é menos susceptível a quebra, sendo que, alguns agentes antimicrobianos têm dificuldade de quebrar esta "barreira biológica". Podendo-se utilizar a espécie *C. decandra* como uma alternativa antimicrobiana. Segundo trabalho descrito por Thadeo et al., (2009), ao estudar a anatomia e histoquímica das estruturas secretoras das folhas da espécie *C. decandra*, evidenciaram lipídios do tipo óleo-resina e compostos fenólicos do tipo tanino em sua composição química.

Os compostos fenólicos são de grande interesse, pois são descritos como os responsáveis pela atividade antimicrobiana de muitas espécies vegetais. Estes compostos apresentam atividade principalmente sobre bactérias Gram-positivas, devido à maior facilidade que a amostra tem em penetrar a parede destas (Albernaz, 2006).

CONCLUSÃO

A análise da atividade antimicrobiana da espécie *C. decandra* demonstra os maiores halos de inibição frente às

bactérias Gram-positivas quando comparada as bactérias Gram-negativas. Os resultados demonstram grande variação de intensidade de ação entre as frações testadas. Dentre as frações, a que demonstrou melhores resultados foi a FA, pois apresentou os maiores halos de inibição.

Por fim, apesar do método de difusão em disco de papel filtro ser muito utilizado para a constatação da ação medicinal de produtos naturais, esta metodologia serve como um parâmetro de triagem antimicrobiana.

Os resultados obtidos pelo presente trabalho sugerem que a espécie *C. decandra* apresenta resultados promissores em relação ao potencial antibacteriano. Porém mais estudos devem ser realizados, a fim de melhor caracterizar as atividades biológicas desta espécie.

REFERÊNCIAS

Agripino DG, Lima MEL, Silva MR, Meda CI, Bolzani VS, Cordeiro I, Young MCM & Moreno PRH. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and dna-damaging activities. i. atlantic rain forest - ecological station juréia - itatins. *Biota Neotropica*, 4(2): 1-15, 2004.

Albernaz LC. Substância antimicrobiana de amplo espectro de *Tabebuia caraiba*. 2006. Brasília, 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), UnB.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC & Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *J. Clin. Pathol*, 45(4): 493-496, 1966.

Costa JGM, Sousa EO, Rodrigues FFG, Lima SG de & Braz-Filho R. Composição química e avaliação das atividades antibacteriana e de toxicidade dos óleos essenciais de *Lantana camara* L. e *Lantana* sp. *Rev. Bras. Farmacogn*, 19(3): 710-714, 2009.

COSTA LM. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do gênero *Capsicum*. 2007. Chapecó, 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Unochapecó.

Gonçalves AL, Alves Filho A & Menezes H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq. Inst. Bio*, 72(3): 353-358, 2005.

Gonçalves TO, Vieira JR GM, Silva DHS & Cavalheiro Alberto J. Hidroquinona: Princípio antioxidante e tóxico de *Casearia decandra* (Salicaceae). Reunião Anual da SBQ, 1 cd-rom, Fortaleza, Brasil, 2009.

Guntzel ARC. Avaliação das atividades farmacológicas de extratos de *Casearia sylvestris* Sw. 2008. Lajeado, 68 p. Dissertação (Mestrado em Ambientes e Desenvolvimento), Univates.

Lorenzi H. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: De consumo in natura. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

Menezes FG. Avaliação farmacológica e toxicológica de diferentes espécies do Gênero *Casearia*. 2004. São Paulo,

153 p. Tese (Doutorando em Farmacologia), USP.

Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL & Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quím. Nova*, 28(5): 892-896, 2005.

Mosaddik MA, Banbury L, Forster P, Booth R, Markham J, Leach D & Waterman PG. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytomedicine*, 11(5): 461-466, 2004.

Murray PR, Pfaller MA & Rosenthal KS. *Microbiologia médica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 762 p.

Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli ÂR, Santos PO, Barbosa Júnior AM, Trindade R. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev. Bras. Farmacogn*, 17(1): 108-113, 2007.

NCCLS. National Committee For Clinical Laboratory Standards. Padronização dos Testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: Norma Aprovada - M2-A8. 8. ed. USA: NCCLS, 2003. 58 p.

Schneider NFZ. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Casearia sylvestris* swart. 2008. Chapecó. 65 p. Monografia (Graduação em Farmácia), Unochapecó.

Schneider NFZ, Moura NF & Marins K. Atividade antimicrobiana das folhas de *Casearia sylvestris* Swart. Simpósio Brasileiro De Farmacognosia, 7, 1 cd-rom, Maringá, Brasil, 2009.

Silveira LMS, Olea RSG, Mesquita JS, Cruz ALN & Mendes JC. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Rev. Bras. Farm*, 90(2): 124-128, 2009.

Sobral M & Jarenkow JA. Flora arbórea e arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre: Novo Horizonte; São Carlos, SP: Rima, 2006. 350 p.

Tavares WLF, Apolônio ACM, Gomes RT, Teixeira KIR, Brandão MGL & Santos VR. Assessment of the antimicrobial activity of *Casearia sylvestris* extract against oral pathogenic microorganisms. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 29(3): 257-260, 2008.

Thadeo M, Meira RMSA, Azevedo AA & Araújo JM. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). *RBBot*, 32(2): 329-338, 2009.

Trabulsi LR & Alterthum F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 718 p.