



REF – ISSN 1808-0804 Vol. X (3), 43 – 53, 2013.

## **ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Senna obtusifolia***

*ANTIBACTERIAL ACTIVITY, TOXICITY AND ANTIOXIDANT OF ETHANOL EXTRACT OF *Senna obtusifolia**

*ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL Y TOXICIDAD DE EXTRACTO ANTIOXIDANTE DE ETANOL DE *Senna obtusifolia**

**Ana Cláudia Ferreira Rodrigues<sup>1</sup>, Jacqueline Ferreira da Costa<sup>1</sup>, Alexandre de Lira Silva<sup>1</sup>, Emanuela Pereira do Nascimento<sup>2</sup>, Flávia Rafaela G. Silva<sup>2</sup>, Larissa Isabela Oliveira de Souza<sup>3</sup>, Rhuana Rackel de Sá Azevedo<sup>4</sup>, Thiago José Matos Rocha<sup>5</sup>, Aldenir Feitosa dos Santos<sup>6\*</sup>**

<sup>1</sup> Graduado (a) em Farmácia pelo Centro Universitário Cesmac. Maceió-AL.

<sup>2</sup> Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário Cesmac. Maceió-AL.

<sup>3</sup> Biomédica. Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Maceió-AL.

<sup>4</sup> Farmacêutica. Especialista em Farmacologia clínica pelo Instituto Brasileiro de Pós-graduação e Extensão (IBPEX). Maceió-AL.

<sup>5</sup> Farmacêutico. Doutorando em Inovação Terapêutica pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Recife-PE.

<sup>6</sup> Doutora em Química e Biotecnologia pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Professora do Centro Universitário Cesmac. Maceió-AL.

\*autor para correspondência: aldenirfeitosa@gmail.com

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico, antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico da folha e do caule de *Senna obtusifolia*. A pesquisa da atividade antioxidante foi realizada pelos métodos de DPPH e FTC, além da determinação de compostos fenólicos pelo método do Follin. A atividade antibacteriana foi realizada por meio de difusão em disco de papel. Os resultados indicaram que o extrato etanólico do caule apresentou atividade antibacteriana superior ao da folha. Na análise antioxidante pelo método DPPH e FTC extratos das folhas e caules exibiram atividade biológica.

**PALAVRAS-CHAVE:** Atividade antioxidante; atividade antibacteriana; *Senna obtusifolia*.

**ABSTRACT:** This study aimed to evaluate the antioxidant and antibacterial potential of the ethanolic extract of the stem and leaf *Senna obtusifolia*. The survey of antioxidant activity was measured by the FTC and DPPH methods, in addition to the determination of phenolic compounds by the method of Follin. The antibacterial activity was by disk diffusion paper. The results indicated that the ethanolic extract of the stem showed antibacterial activity than the leaf. In analyzing the antioxidant DPPH method and FTC both stem and leaf showed good, but the largest amount of phenolic compounds.

**KEY-WORDS:** Antioxidant activity, antibacterial activity; *Senna obtusifolia*.

## INTRODUÇÃO

Desde o surgimento da Penicilina em 1929 e seu uso como quimioterápico em 1941 a história de sucesso de fármacos antimicrobianos consiste na busca contínua de drogas para combater o desafio de cepas resistentes de microrganismos <sup>(1)</sup>.

Linhagens patogênicas de *Escherichia coli* são causadoras de infecções no trato geniturinário, meningite neonatal, septicemia hospitalar e infecções intestinais. A

resistência antimicrobiana tem sido relatada, fato que restringe as opções terapêuticas disponíveis <sup>(2)</sup>.

O *Staphylococcus aureus* é considerado o patógeno humano oportunista de maior sucesso, que pode infectar tanto indivíduos na comunidade como em ambiente hospitalar, causando um grande número de síndromes clínicas através de dois mecanismos: infecção piogênica ou doença mediada por toxinas. O *S. aureus* é responsável por um amplo espectro de doenças, dentre elas, septicemia, endocardite,

pneumonia, osteomielite, artrite séptica, bacteremia, infecções da pele, de feridas, do sistema nervoso central, do trato urinário e infecções associadas com dispositivos intravasculares e corpos estranhos. Sendo a bacteremia por *S. aureus* uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo todo<sup>(3)</sup>.

Devido à rápida disseminação global de cepas resistentes a antimicrobianos é necessária a descoberta de novas terapias. Por esta razão a busca de antimicrobianos extraídos de plantas tornou-se uma alternativa importante<sup>(4)</sup>. Há milhares de anos a natureza tem sido uma fonte de agentes medicinais e um número impressionante de modernas drogas tem sido isolado de plantas. A pesquisa de plantas com atividade antimicrobiana tem sido objetivo de vários trabalhos<sup>(5)</sup>.

Cerca de 80.000 espécies de plantas no Brasil, são descritas por constituírem um potencial para o descobrimento de novos fármacos, porém apenas 17% delas são exploradas para pesquisas de compostos biologicamente ativos<sup>(6)</sup>. A investigação quanto à ação antimicrobiana de plantas produz resultados úteis e elas constituem de um potencial terapêutico com ação significativa frente a patógenos humanos, incluindo bactérias, fungos e vírus<sup>(5)</sup>.

As plantas com maior atividade antimicrobiana são aquelas ricas em polifenóis, flavonóides e taninos<sup>(1)</sup>. Em

pesquisa realizada por Nascimento Filho et al.<sup>(6)</sup> foi possível identificar a presença desses constituintes químicos em *Senna obtusifolia*, sendo portanto válido a investigação do seu potencial antimicrobiano, visto que sua composição química sugere tal atividade, além de um estudo mais detalhado de seu potencial antioxidante. O potencial antioxidante pode ser avaliado através dos métodos DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila), FTC (Tiocianato Férrico) e TBA (Ácido Tiobarbitúrico).

O método do radical livre DPPH consiste em avaliar a atividade seqüestradora desse radical livre (2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•), de coloração púrpura que absorve a 515 nm<sup>10</sup>. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional<sup>(7)</sup>. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE<sub>50</sub>), também chamada de

concentração inibitória ( $CI_{50}$ ). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua  $CE_{50}$  e maior a sua atividade antioxidante<sup>(7)</sup>.

O método FTC será usado para medir a quantidade de peróxido de hidrogênio no início da peroxidação lipídica. No qual o peróxido reage com o cloreto férrico e forma o íon férrico, que uni-se ao tiocianato de amônio e produz o tiocianato férrico, substância de cor vermelha. Quanto menor for a intensidade da coloração vermelha, maior será a absorvância da amostra analisada<sup>(7)</sup>.

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos através do uso do reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as técnicas mais extensivamente

utilizadas. O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstúico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica<sup>(7)</sup>.

A presente pesquisa tem por objetivo avaliar a atividade antibacteriana, antioxidante do extrato etanólico da folha e do caule de *Senna obtusifolia*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e preparo dos extratos vegetais etanólicos

A coleta da *S. obtusifolia* foi realizada na Fazenda Santo Antônio, povoado de Cadói, município de Limoeiro de Anadia – AL e Fazenda Monteiro, povoado de Pé - Leve-Velho, município de Arapiraca–AL. Para a coleta das folhas foi levado em consideração a morfologia, inexistência de parasitas, tamanho e aparência geral.

Os extratos foram preparados por maceração com etanol à temperatura ambiente por quatro vezes consecutivas e cada extração teve duração de quatro

dias. Os extratos foram filtrados e reunidos. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo acoplado à bomba de vácuo, os extratos secos foram pesados e calculados pela expressão:  $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato/massa do material vegetal}) \times 100$ . A partir de 20 mg do extrato seco, foi preparada uma solução em etanol a  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  (ou 1:1) para posteriores diluições das folhas e do caule de *S. obtusifolia*.

### Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi verificada em triplicata pelo método de difusão em disco de papel <sup>(8)</sup>.

### **Amostra**

Foram utilizados extratos etanólico do caule e folha de *S. obtusifolia* (pertencentes à coleção de extratos da FCBS-CESMAC) frente a 20 isolados de *S. aureus* e 20 isolados de *E. coli* (pertencentes à coleção de bactérias da FCBS-CESMAC). As cepas cultivadas em óleo mineral foram reativadas em Ágar Nutriente, incubadas em temperatura de aproximadamente 37 °C durante 24 ou 48 horas e provas bioquímicas foram realizadas para confirmação das espécies.

### **Preparação das amostras**

De cada isolado ativo e re-identificado foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina 0,85% equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 0,1 mL x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Cada suspensão bacteriana foi uniformemente distribuída com *swab* sob a superfície de uma placa de Petri contendo Ágar Mueller Hinton.

### **Amostras vegetais**

Discos de papel estéreis de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram embebidos com 20 µL da solução

do extrato etanólico (o extrato foi esterilizado utilizando filtros de milipore 0,22 µm) nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 mg/mL e colocados para secar em ambiente estéril.

### **Amostras controle**

Como cepas padrão foram utilizadas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e ATCC 35218, *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 27853. Como controle positivo de sensibilidade foi utilizado Imipenem de 5 mg/mL e como controle negativo um disco contendo 20 µL de Etanol absoluto.

### **Avaliação da Atividade Antibacteriana**

Os discos contendo o material vegetal e os discos controles foram inseridos nas placas em que as bactérias foram inoculadas (bactérias testes e padrão) e foram incubadas durante 24 horas em estufa a uma temperatura de aproximadamente 37 °C. Após o término da incubação foi realizada a observação da formação de halos. Halos iguais e superiores a 7 mm (halos maiores que o disco com amostras testes do item 2.1.3 e maiores que os halos do controle negativo) foram considerados como atividade antibacteriana<sup>(8)</sup>.

### **Atividade antioxidante**

### **Método do DPPH: Teste quantitativo**

As amostras foram diluídas nas concentrações de 500, 250, 125, 50, 10 e 5 µg/mL. Para cada concentração o teste foi realizado em triplicata. Em 3 mL de cada amostra foi acrescido 0,1 mL de solução etanólica do radical livre DPPH, e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Como branco foram utilizadas as amostras em cada uma das diluições. Decorrido o tempo foi realizada a leitura das absorvâncias em 517 nm (espectrofotômetro) das amostras com DPPH contra seu branco específico. Como controle foi utilizada uma alíquota de 0,1 mL de solução etanólica de DPPH adicionada de 3 mL de etanol <sup>(9)</sup>.

Para avaliar a atividade captadora de radical livre, a porcentagem de inibição foi baseada na equação: % de inibição = [(absorvância do controle – absorvância da amostra)/absorvância do controle] x 100.

#### **Cálculo de CE<sub>50</sub>**

Os valores de AAO% e das concentrações (500, 250, 125, 50, 10 e 5 µg/mL) foram relacionados utilizando o programa "Excel for Windows", obtendo-se, para cada planta, a equação da reta. A resolução desta equação (substituindo

o valor de Y por 50) resultará no valor de CE<sub>50</sub>, que é a concentração necessária para produzir metade (50%) de um efeito máximo estimado em 100% para o extrato da planta <sup>(9)</sup>.

#### **Método FTC**

O método FTC foi feito seguindo metodologia descrita na literatura com pequenas modificações, monitorando-se a quantidade de peróxido de hidrogênio no início da peroxidação lipídica que levou a formação de tiocianato férrico, substância de cor vermelha <sup>(10)</sup>.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O extrato etanólico do caule de *S. obtusifolia* apresentou atividade antibacteriana superior à folha frente a bactérias da espécie de *S. aureus*. 30% das amostras de *S. aureus* foram inibidas pelo extrato etanólico da folha e do caule de *S. obtusifolia* a partir da concentração de 50mg/mL. Nenhum dos extratos inibiu bactérias da espécie de *E. coli* nas concentrações estudadas (Tabela 1). Halos iguais ou superior 7mm serem considerados sensíveis de acordo com estudos realizados por Philippsen et al. <sup>(11)</sup>.

**Tabela 1 - Atividade antibacteriana do extrato etanólico do caule e da folha de *S. obtusifolia* frente à *S. aureus* determinada pelo método de difusão de difusão em disco de papel.**

Parte da planta	Concentração (mg/mL)				CIM 50 (mg/mL)
	25	50	75	100	
Caule	10%	30%	30%	30%	> 100
Média de halo (mm)	8	8,83	9	9	-
Folha	0%	30%	30%	30%	> 100
Média de halo (mm)	< 7	8,5	8	8	-

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados obtidos da atividade antibacteriana estão de acordo com outro estudo, onde bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) mostram-se mais resistentes que as bactérias Gram-positivas (*S. aureus*)<sup>(12)</sup>.

Todas as concentrações avaliadas (500, 125, 50, 10 e 5 µg/mL) dos extratos etanólicos do caule e folha de *S. obtusifolia* apresentam a atividade antioxidante pelo método do DPPH (Tabela 2).

O maior percentual de atividade antioxidante medida pelo método do DPPH foi à concentração de 500 µg/mL foi observado no extrato etanólico da folha (73,46%) e o menor percentual (1,06%) no extrato etanólico do caule na concentração de 5 µg/mL. A folha de *S. obtusifolia* apresentou melhor CE<sub>50</sub> pelo método de DPPH (Tabela 2).

**Tabela 2 - Percentual da atividade antioxidante do extrato etanólico pelo método do DPPH das folhas e caules de *S. obtusifolia*.**

Conc. µg/mL	Caule	Folha
	Percentual da atividade antioxidante (AAO%)	
500	17,91	73,46
250	10,07	43,26
125	3,39	17,08
50	2,23	9,04
10	1,63	2,13
5	1,06	1,53
CE50	10,44	1,65

Fonte: Dados da pesquisa.

O método de DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical

livre, que à medida que sofre redução perde sua coloração púrpura e torna-se amarelada. Desta forma, esse método

avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes, por isso faz-se necessária à realização de testes como o FTC <sup>(13)</sup>.

Da habilidade dos extratos etanólicos do caule e da folha de *S.*

*obtusifolia* para sequestrar o peróxido de hidrogênio, avaliada pelo método do Tiocianato Férrico, obteve-se valores médios para porcentagens de captura entre 82,8% e 103,16%. Tanto o caule quanto a folha mostraram bons resultados de atividade antioxidante (Tabela 3).

**Tabela 3. Percentual da atividade antioxidante total obtida pelo método do Tiocianato Férrico (FTC) de *S. obtusifolia*.**

Parte da planta	Tempo em horas	Percentual da atividade antioxidante (AAO%)			
		Concentração µg/mL			
		25	50	75	100
Caule	0 h	93,68	94,03	98,6	100,7
	24 h	95,56	96,09	96,63	97,51
	48 h	97,56	97,6	99,51	100
	72 h	99,15	100,33	100,5	102,69
	96 h	97,72	98,04	98,21	98,21
Folha	0 h	82,8	92,45	93,5	103,16
	24 h	97,34	98,04	98,22	98,4
	48 h	99,51	100	100,16	100,8
	72 h	99,32	99,66	100,67	101,34
	96 h	100,48	100,8	101,62	102,34

Fonte: Dados da pesquisa.

O método FTC é usado para medir a quantidade de peróxido no início da peroxidação lipídica, na qual irá reagir com o peróxido de cloreto ferroso e forma íons férrico. Os íons férrico, então, unem-se com tiocianato de amônio e produzir tiocianato férrico. A substância é vermelha, e cor mais densa é indicativa de maior absorbância <sup>(12)</sup>.

A quantidade de compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos das plantas foi igual para as duas partes da planta sendo 0,04 mg de ácido

gálico/g de amostra, logo não e pode fazer correlação entre a atividade antioxidante total e os compostos fenólicos das plantas estudadas <sup>(14)</sup>.

A atividade antioxidante relacionada a compostos fenólicos provêm de suas propriedades redutoras e estrutura química. O papel desempenhado por eles é importante na neutralização ou no seqüestro de radicais livres, além da quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de

iniciação como na propagação do processo oxidativo<sup>(14)</sup>.

Estudo semelhante ao nosso foi realizado por Rocha et al.<sup>(9)</sup>, que avaliaram a atividade antioxidante de *Anacardium occidentale* e *Glycyrrhiza glabra* pelo método fotocolorimétrico do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Semelhante ao nosso estudo, foram avaliadas as concentrações de 5, 10, 50, 125 e 500 µg/mL. Foi observado que os extratos de *A. occidentale* apresentaram maior atividade antioxidante quando comparado aos resultados de *G. glabra*. Os extratos de *A. occidentale* exibiram atividade antioxidante em todas as concentrações avaliadas, resultados esses semelhantes

ao nosso, já que a espécie estudada apresentou atividade antioxidante em todas as concentrações avaliadas independente da parte utilizada.

## CONCLUSÃO

Com os resultados pode-se concluir que as partes aéreas de *S. obtusifolia* é uma fonte de compostos biologicamente ativos com propriedade antioxidante e antibacteriana, sendo a folha a parte que teve melhor desempenho. Isso induz a continuação de pesquisas com outras frações desta planta com a finalidade de identificar os compostos responsáveis por tais atividades.

## REFERÊNCIAS

1. Doughari JH, El-Mahmood AM, Tyoyina I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L). African J Pharm and Pharmacol, 2(1): 7-13, 2008.
2. Schneider RN, Nadvorny A, Schmidt V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. Biotemas, 22 (3): 11-17, 2009.
3. Pacheco RL, LEVIN ASS. Avaliação da disseminação de *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina em serviço de dermatologia do Hospital das Clínicas. 81f. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
4. Schuck VEJA, Fratini M, Rauber CS, Henriques A, Schapoval EES. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. RBCF, 37(1), 2001.

5. Politi FAZ, Pietro RCL, Moreira RRD. Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiraceae). 2009. 144p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de fármacos e medicamentos) – Programa de Pós-graduação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.
6. Nascimento Filho BP, Noé BDR, Santos KCBS, Queiroz EFS, Rocha, TJM, Nascimento HF, Santos MM, Santos AF. Efeitos alopáticos de extratos aquosos e etanólicos de folhas, caules e raízes de *Senna obtusifolia* na germinação de *Lycopersicum esculentum*. Revista Semente, 3 (3): 97-103, 2008.
7. Sánchez-Moreno C, Larrauri JÁ, Saura-Calixto FJ. Sci Food Agric 76:270, 1998.
8. Maia-Araújo YLF, Mendonça LS, Orellana SC, Araújo ED. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. Scientia Plena, 7 (4): 1-4, 2011.
9. Rocha TJM, Santos KCBS, Nascimento Filho BP, Noé BDR, Nascimento HF, Santos AF. Atividade antioxidante dos extratos de *Anacardium occidentale* e *Glycyrrhiza glabra* pela captura do radical livre DPPH. BIOFAR, 6 (2): 11-19, 2011.
10. Rahmat A, Kumar V, Fong LM, Endrini E, Sani HA. Determination of total antioxidant activity in three types of local vegetables shoots and the cytotoxic effect of their ethanolic extracts against different cancer cell lines. Asia Pac J Clin Nutr, 12 (3): 308-311, 2003.
11. Philippsen AF, Miguel OG, Miguel MD, Lima CP, Kalegari M, Lordello ALL. Avaliação da atividade antibacteriana das cascas das raízes de *Xylosma ciliatifolia* (Clos) Eichler (Flacourtiaceae/Salicaceae *sensu lato*). Rev Cub de Plant Med, 18(2):258-267, 2013.
12. Aqil F, Ahmad I, Mehmood Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used indian medicinal plants. Turk J Biol, 30: 177-183, 2006.
13. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. Cienc Tecnol Aliment, 26(2): 446-452, 2006.

13. Sousa CMM, Rocha E Silva H, Vieira Júnior GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova*, 30(2): 351-355, 2007.

14. Wettasinghe M, Shahidi F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J Agric Food Chem*, 47: 1801-1812, 1999.