

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

Ana Cláudia Ferreira Rodrigues
Jacqueline Ferreira da Costa
Flávia Rafaela G. Silva
Rhuana Rackel de Sá Azevedo
Emanuela Pereira do Nascimento
Alexandre de Lira Silva
Larissa Isabela Oliveira de Souza
. Aldenir Feitosa dos Santos
Faculdade de Ciência Biológicas e da Saúde

RESUMO: Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico do caule e da folha de *Senna obtusifolia*. A pesquisa da atividade antioxidante foi medida pelos métodos de DPPH e FTC, além da determinação de compostos fenólicos pelo método do Follin. A atividade antibacteriana foi por meio de difusão em disco de papel. Os resultados indicaram que o extrato etanólicos do caule apresentou atividade antibacteriana superior ao da folha. Na análise antioxidante pelo método DPPH e FTC tanto caule quanto a folha mostraram bons, além da maior quantidade de compostos fenólicos.

PALAVRAS-CHAVES: Atividade antioxidante. Atividade antibacteriano. *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 Follina. 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.

KEYWORDS: Antioxidant activity. antibacterial activity. *Senna obtusifolia*.

1 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 (DOUGHARI; EL-MAHMOOD; TYOUINA, 2008).

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 (SCHNEIDER; NADVORNY; SCHMIDT, 2009).

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 (PACHECO; LEVIN, 2008).

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 (FERREIRA et al., 2004). A 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 (SCHUCK et al., 2001).

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 (POLITI; PIETRO; MOREIRA, 2009). 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 (SCHUCK et al., 2001).

As plantas com maior atividade antimicrobiana são aquelas ricas em polifenóis, flavonóides e taninos (DOUGHARI; EL-MAHMOOD; TYOUNA, 2008). Em pesquisa realizada por Nascimento Filho et al. (2008) 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 nm10. 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 (SANCHES MORENO et al, 1998). 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 (CE50), também chamada de concentração inibitória (CI50). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE50 e maior a sua atividade antioxidante.

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 absorbância da amostra analisada.

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 fosfomolibídico e fosfotungstístico, 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.

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

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi verificada em triplicata pelo método de difusão em disco de papel (BAUER et al., 1966).

2.1.1 Amostra:

Foram utilizados extratos etanólico de caule e folha de *Senna obtusifolia* (pertencentes à coleção de extratos da FCBS-CESMAC) frente a 20 cepas de *Staphylococcus aureus* e 20 cepas de *Escherichia 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.

2.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

2.2.1 Amostras bacterianas

De cada cepa ativa foi preparada uma suspensão bacteriana em solução salina equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde a uma concentração de aproximadamente 0,1 mL x 10⁸ UFC/mL. Cada suspensão bacteriana foi uniformemente distribuída com swab sob a superfície de uma placa de Petri contendo Ágar Mueller Hinton.

2.2.2 Amostras vegetais

Discos de papel estéreis de aproximadamente 6 mm de diâmetro foram embebidos com 20 µL da solução do extrato etanólico nas concentrações de 25mg/mL, 50 mg/mL, 75mg/mL e 100mg/mL e colocados para secar em ambiente estéril.

2.2.3 Amostras controle

Como cepas padrão foram utilizadas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus aureus* 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.

2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os discos contendo o material vegetal e os discos controles serão inseridos nas placas em que as bactérias foram inoculadas (bactérias testes e padrão) e serão incubadas durante 24 horas em estufa a uma temperatura de aproximadamente 37 °C. Após o término da incubação será realizada a observação da formação de halos. Halos iguais e superiores a 7 mm serão considerados como atividade antibiótica.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.4.1 Método DPPH

2.4.1.1 Teste quantitativo

As amostras serão diluídas nas concentrações de 500, 250, 125, 50, 10 e 5 µg/mL. Para cada concentração o teste será realizado em triplicata. Em 3 mL de cada amostra será 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 serão utilizadas as amostras em cada uma das diluições. Decorrido o tempo será realizada a leitura das absorbâncias em 517 nm (espectrofotômetro) das amostras com DPPH contra seu branco específico.

Como controle será utilizada uma alíquota de 0,1 mL de solução etanólica de DPPH adicionada de 3 mL de etanol (SANCHEZ MORENO et al, 1998).

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

2.4.1.2 Cálculo de CE50

Os valores de AAO% e das concentrações (500, 250, 125, 50, 10 e 5 µg/mL) serão 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 CE50 (MENSOR, 2001), que é a concentração necessária para produzir metade (50%) de um efeito máximo estimado em 100% para o extrato da planta.

2.4.2 Método FTC

O método FTC será feito seguindo metodologia descrita na literatura com pequenas modificações, monitorando-se a quantidade de peróxido de hidrogênio no início da peroxidação lipídica que levará a formação de tiocianato férrico, substância de cor vermelha (RHAMAT et al, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato etanólico do caule de *Senna obtusifolia* apresentou atividade antibacteriana superior à folha frente a bactérias da espécie de *Staphylococcus aureus*. 30% das amostras de *Staphylococcus aureus* foram inibidas pelo extrato etanólico da folha e do caule de *Senna obtusifolia* a partir da concentração de 50mg/mL. Nenhum dos extratos inibiu bactérias da espécie de *Escherichia coli* nas concentrações estudadas (**Tabela 1**).

Tabela 1. Atividade antibacteriana do extrato etanólico do caule e da folha de *Senna obtusifolia* frente à *Staphylococcus aureus* determinada pelo método 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
Folha	0%	30%	30%	30%	> 100

Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados obtidos da atividade antibacteriana estão de acordo com Cordeiro et al. (2006), onde bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*) mostram-se mais resistentes que as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*).

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

O maior percentual de atividade antioxidante medida pelo método do DPPH foi na 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 *Senna obtusifolia* apresentou melhor CE50 pelo método de DPPH (**Tabela 2**).

Tabela 2. Percentual da atividade antioxidante do extrato etanólico pelo método do DPPH das parte da planta *Senna obtusifolia*.

<i>Conc.</i> µg/mL	<i>Caule</i>	<i>Folha</i>
	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 a realização de testes como o FTC (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Da habilidade dos extratos etanólicos do caule e da folha de *Senna 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 *Senna 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 indicativo de maior absorbância (AQIL; AHMAD; MEHMOOD, 2006).

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 pode fazer correlação entre a atividade antioxidante total e os compostos fenólicos das plantas estudadas.

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 quelatação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al, 2007).

CONCLUSÃO

Com os resultados pode-se concluir que as partes aéreas de *Senna 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

- AQIL F; AHMAD, I; MEHMOOD, Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used indian medicinal plants. **Turk J Biol.** v.30, p. 177-183, 2006.
- CORDEIRO, C H G et al. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v. 42, n. 3, p. 395-404, 2006.
- DOUGHARI, J. H.; EL-MAHMOOD, A. M.; TYOYINA, I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v. 2, n. 1, p. 7-13, 2008.
- DUARTE-ALMEIDA, J M et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v 26, n 2, p. 446-452, 2006.
- FERREIRA, D. T. Antimicrobial activity and chemical investigation of Brazilian *Drosera*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 99, n. 7, p. 753-755, 2004.
- FINNEY, D. J. 1962. **Probit Analysis.** Cambridge, Cambridge University Press.
- NASCIMENTO NETO, B. P. et al. Efeitos alelopáticos de extratos aquosos e etanólicos de folhas, caules e raízes de *Senna obtusifolia* na germinação de *Lycopersicon esculentum*. **Revista Semente.** v. 3, n. 3, p. 97-103, 2008.
- NUNES, X. P. et al. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** 18 (Supl.): 718-723, Dez. 2008.
- PACHECO, R. L.; LEVIN, A. S. S. **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.
- POLITI, F. A. S.; PIETRO, R. C. L. R.; MOREIRA, R. R. D. **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.
- RAHMAT, A.; KUMAR, V.; FONG, L. M., ENDRINI, E.; SANI, H. A. 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;** v.12, n.3, p.308-311, 2003.

RUIZ, A. L. T. G. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 15(2): 98-102, Abr./Jun. 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. **J. Sci. Food. Agric.** 1998, 76, 270.

SCHNEIDER, R. N.; 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**. v. 22, n. 3, p. 11-17, 2009.

SCHUCK, V. J. A. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 37, n. 1, 2001.

SOUSA, C M M et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

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.** v. 47, p. 1801-1812, 1999.