



Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae)

S. Virtuoso, A. Davet, J.F.G. Dias, M.M. Cunico, M.D. Miguel, A.B. Oliveira, O.G. Miguel*

Departamento de Farmácia, Laboratório de Fitoquímica, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner 3400, 80210-170, Jardim Botânico, Curitiba, PR, Brasil

RESUMO: A *Erythrina velutina* é popularmente conhecida como suinã, mulungu, corticeira, mulungu-da-catinga dentre outros. Das várias espécies distribuídas pelo mundo cerca de doze estão no Brasil. A casca é utilizada, principalmente no nordeste brasileiro, pelas propriedades sudorífica, calmante, emoliente, peitoral, anestésica local e outras. Considerando-se que não existem estudos sobre o potencial microbiológico das cascas de *Erythrina velutina* este trabalho teve por objetivo avaliá-lo preliminarmente contra oito bactérias patogênicas. Foram utilizados os métodos de difusão em disco e concentração inibitória mínima para o extrato etanólico bruto e difusão em disco para a fração hexano. A atividade contra o *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* foi evidenciada para ambas as amostras. A viabilidade de futuras pesquisas com outras frações e substâncias isoladas na busca de novas alternativas, visando uma terapêutica racional a partir de fontes naturais foi apontada pelos resultados.

Unitermos: *Erythrina velutina*, Fabaceae, atividade antibacteriana.

ABSTRACT: "Preliminary study of the antibacterial activity of *Erythrina velutina* Willd. Fabaceae (Leguminosae) bark". *Erythrina velutina* is popularly known as suinã, mulungu, corticeira, mulungu-da-catinga among others. Of the several species spread around the world about twelve are found in Brazil. Mainly in the Brazilian northeast the bark is used due to its sudorific, sedative, emollient, pectoral and topical anesthetic properties. Considering that there are no studies about the antibacterial potential of *Erythrina velutina*, this research aimed at evaluating, at least preliminarily, bark activity against eight pathogenic bacteria. The crude ethanol extract was tested by the disk diffusion method and minimal inhibitory concentration (MIC) and the hexane fraction by the disk diffusion method. Both samples demonstrated activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. The results pointed to the viability of future research on other fractions and substances isolated from *Erythrina velutina* in search for new rational therapeutic alternatives based on natural sources.

Keywords: *Erythrina velutina*, Fabaceae, antibacterial activity.

INTRODUÇÃO

A partir do século XIX a humanidade se deparou perplexa diante do diverso e inesgotável arsenal terapêutico presente nas plantas medicinais devido a descoberta de substâncias ativas, que em estado natural ou após sofrerem processos de transformação química, possuem atividade biológica, muitas vezes já confirmadas pelo uso popular e comprovadas cientificamente (Miguel; Miguel, 2004).

O gênero *Erythrina* (família Fabaceae) ocorre nas regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. Possui cerca de 110 espécies, das quais 70 são nativas da América (EPAMIG, 1993; Vasconcelos et al., 2003). O nome *Erythrina*, do grego "erythros", significa "vermelho" em alusão à cor de suas flores. São empregadas como ornamentais e sombreadoras das lavouras de café e cacau (EPAMIG, 1993).

Erythrina velutina Willd. (Fabaceae) é

popularmente conhecida como suinã, mulungu, canivete, corticeira, mulungu-da-catinga, pau-de-coral, sanaduí, sananduva, dentre outros (Lorenzi, 1992; EPAMIG, 1993). É uma espécie nativa da flora brasileira que tem sido utilizada na medicina popular em algumas regiões do nordeste brasileiro.

São atribuídas às preparações da casca propriedades sudorífica, calmante, emoliente, peitoral e do seu fruto seco ação anestésica local que é usado na forma de cigarro como odontológico, embora a eficácia e segurança de seu uso ainda não tenham sido confirmadas cientificamente (Lorenzi; Matos, 2002). Este fato torna imperioso o investimento na pesquisa fitoquímica e biológica a fim de se comprovar seu potencial terapêutico. Por meio de estudos farmacológicos empregando-se o extrato da *E. velutina* foram demonstrados os seus efeitos periféricos e sobre o sistema nervoso central. Dantas et al. (2004) evidenciaram que o extrato aquoso das folhas de *E. velutina* em baixas doses interferiu em processos

mnemônicos e em doses maiores agiu como sedativo e bloqueador neuromuscular periférico.

As plantas do gênero *Erythrina* são conhecidas por produzirem alcalóides, flavonóides e isoflavonóides. Estas plantas representam a principal fonte de alcalóides tetracíclicos, sendo que estes possuem atividade semelhante ao curare causando paralisia muscular (Amer et al., 1991; Decker et al., 1995).

Por meio do fracionamento em coluna cromatográfica da fração acetato de etila obtida das cascas de *E. velutina* foram isolados a erivelutinona (2',4'-dihidroxi-6-prenil-7-metoxiisoflavanona) de aspecto viscoso e coloração marrom-amarelado e a 3'-*O*-metilsigmoidina (Da Cunha et al., 1996), também a faseolidina e homohesperetina, sendo que a última ainda não havia sido isolada de uma planta da família Fabaceae (Rabelo et al., 2001).

Além disto, este gênero tem provado ser uma fonte farta de espécies contendo agentes antimicrobianos que pertencem a várias classes estruturais de flavonóides, como por exemplo, a *E. variegata* cuja atividade do extrato bruto das raízes foi demonstrada para *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* (Telikepalli et al., 1990).

Atividades com interesse farmacêutico foram apresentadas também por outros representantes do gênero como a *E. speciosa* que no Brasil é utilizada como analgésica, anti-inflamatória e bactericida (Dias Filho et al., 2002).

Considerando-se que não há estudos sobre o potencial microbiológico da *E. velutina* e que as pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de plantas representam um grande desafio para a descoberta e identificação de fármacos (Cunico et al., 2003), este trabalho teve por objetivo avaliar preliminarmente o potencial de atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto e fração hexano das cascas da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Os solventes utilizados para todos os procedimentos apresentavam grau de pureza analítico (Merck®). As suspensões bacterianas foram diluídas em salina estéril e padronizadas pela turbidez conforme o tubo 0,5 da escala de MacFarland (0,5 mL de BaCl₂.2H₂O 0,048M - 1,75% peso/volume em 99,5 mL de H₂SO₄ 0,36 N - 1% volume/volume). As culturas puras das bactérias (ATCC - American Type Culture Collection) e os discos de antibióticos usados como controle, cloranfenicol e cefalotina, foram adquiridos comercialmente (Newprov®). Os meios de cultura utilizados foram ágar Muller-Hinton para difusão em disco e caldo caseína de soja (CASOY) para o teste de concentração inibitória mínima - CIM. O etanol utilizado nos testes antibacterianos foi o mesmo da extração.

Material vegetal

As cascas de *E. velutina* Willd., (Fabaceae) foram coletadas na cidade de Petrolina, Pernambuco em janeiro de 2003 e em seguida, foram secas e estabilizadas pela EMBRAPA Semi-Árido e a exsiccata de identificação está registrada sob número 2298 no Museu Botânico da mesma instituição.

Preparo do extrato bruto

As cascas secas, estabilizadas e moídas em total de 2,960 kg, foram submetidas a extração com etanol 96° GL em soxhlet até esgotamento. O material obtido foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida (50 °C) para aproximadamente 1/5 do seu volume. Este volume foi conservado em freezer por 24 horas, em frasco âmbar, visando a precipitação de substâncias com aparência de goma e os pigmentos. Após esse período o extrato foi filtrado a vácuo em funil de Büchner e obteve-se 200 mL (aproximadamente 71,2 g) de extrato etanólico bruto (EB). O resíduo seco do EB foi determinado conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV edição (1988) pesando-se 1,0 mL (medida volumétrica) do material em triplicata, e submetendo as amostras a 105 °C até peso constante após resfriamento em dessecador, obteve-se 312,75 mg/mL o que corresponde a 3,67 % (peso/peso) em relação a massa inicial das cascas.

Preparo da frações

Uma amostra do EB foi submetida a fracionamento líquido-líquido em aparelho de soxhlet modificado (Carvalho, 2001) com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila gerando as frações hexano (FHEX), fração diclorometano (FDMT), fração acetato de etila (FATE) e o restante foi denominado fração hidroalcolica remanescente (FHAR).

Para este estudo foi utilizada somente a fração hexano padronizada a 200 mg/mL.

Cromatografia gasosa da fração hexano

Uma amostra da FHEX solubilizada em metanol foi analisada por cromatografia gasosa conforme método de Padronização Interna de Carvalho (2001) com a finalidade de caracterizar e quantificar os analitos voláteis por Retenção Relativa em relação ao acetato de tocoferol. Utilizou-se cromatógrafo gasoso equipado com colunas megabore DB-1 (100% dimetilpolisiloxano, polaridade 5) e DB-17 (50% fenil e 50% dimetilpolisiloxano, polaridade 24) de 0,53 mm de diâmetro interno por 30 m de comprimento. Utilizou-se como gás de arraste hidrogênio a 6 mL por minuto, split a 6 mL por minuto (razão 1:1), purga do septo 3 mL por minuto, make up nitrogênio 25 mL por minuto e oxigênio a 100 mL

por minuto. O gradiente de temperatura utilizado foi: temperatura inicial 100°C com patamar de 1 minuto e rampa de aquecimento a 7 °C por minuto até 260 °C com patamar de 66 minutos. A temperatura do injetor foi de 260 °C e do detector foi de 280 °C. O volume de injeção foi de 2 µL.

Avaliação da atividade antibacteriana

Para a realização do ensaio foram utilizados dois métodos: difusão em ágar adaptado por Romeiro (2001) para o extrato etanólico bruto e fração hexano, e Concentração Inibitória Mínima (CIM), segundo Konemann et al. (1993) para o extrato bruto. Foram utilizadas as seguintes bactérias em ambos os testes: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615); *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); *Proteus mirabilis* (ATCC 43071); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27283); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); *Escherichia coli* (ATCC 11229); *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

Teste de difusão em ágar

Discos estéreis de papel de 6 mm de diâmetro

foram impregnados com 10 µL do EB e da FHEX nas concentrações de 100%, 50%, 25% e 12,5% conforme mostra a Tabela 1. As diluições foram feitas em etanol 96° GL e os testes realizados em triplicata.

Como padrões de inibição de crescimento foram utilizados dois discos de antibióticos comerciais, o cloranfenicol 30 µg e cefalotina 30 µg.

Os discos contendo a amostra em estudo foram secos a 40 °C e distribuídos nas placas de Petri contendo meio ágar Mueller-Hinton, onde foram inoculadas as bactérias em solução padronizada segundo o tubo 0,5 da escala de MacFarland. Em cada placa de teste foram colocados um disco de cada diluição, um disco com etanol 96° GL (controle) e um com o padrão de cloranfenicol, totalizando seis discos por placa. Foram feitas placas-controle com os dois padrões de antibióticos e o controle com etanol 96° GL para cada microrganismo. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C e os resultados foram lidos após 24 horas.

Concentração inibitória mínima (CIM)

Este teste foi realizado com o EB. As bactérias em suspensão na concentração padronizada pelo tubo

Tabela 1. Concentrações de EB e FHEX nos resíduos secos e discos

Concentração	EB		FHEX	
	Resíduo seco em mg/mL	Sólidos em mg/10 µl	Resíduo seco em mg/mL	Sólidos em mg/10 µl
100,0%	312,75	312,75 x 10 ⁻²	200	200 x 10 ⁻²
50,0%	156,37	156,37 x 10 ⁻²	100	100 x 10 ⁻²
25,0%	78,19	78,19 x 10 ⁻²	50	50 x 10 ⁻²
12,5%	39,10	39,10 x 10 ⁻²	25	25 x 10 ⁻²

Tabela 2. Dados de comparação da fração hexano com os padrões de metabólicos

Referência	tr	RR	FHEX	RR	tr
Ácido fênico	3.464	0.060	Ponto 2	0,061	2.690
Ácido cinâmico	12.315	0.214	Ponto 14	0,213	9.415
Acetato de tocoferol	57.629	1.000	-	-	-
Alfa amirina	64.964	1.130	Ponto 73	1,135	50.085
Estigmasterol	67.204	1.170	Ponto 74	1,170	51.605
Beta amirina	71.064	1.230	Ponto 75	1,237	54.581
Beta sitosterol	73.261	1.270	Ponto 72	1,273	49.098
Lupeol	82.729	1.440	Ponto 82	1,457	64.278

Legenda: tr = tempo de retenção; RR = retenção relativa;

Tabela 3. Resultados das médias dos halos de inibição (em mm) dos ensaios de atividade antibacteriana do EB e FHEX de *E. velutina* sobre espécies bacterianas

<i>E. velutina</i>		Difusão em ágar - Média do diâmetro dos halos de inibição em mm							
	Concentrações	Microorganismos							
		<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Se</i>	<i>Pm</i>	<i>Pa</i>	<i>Kp</i>	<i>Ec</i>	<i>St</i>
EB	312,75 mg/mL (100,0%)	7	12	0	0	0	0	0	0
	156,37 mg/mL (50,0%)	0	9	0	0	0	0	0	0
	78,19 mg/mL (25,0%)	0	7	0	0	0	0	0	0
	39,10 mg/mL (12,5%)	0	0	0	0	0	0	0	0
FHEX	200 mg/mL (100,0%)	7	13	0	0	0	0	0	0
	100 mg/mL (50,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	50 mg/mL (25,0%)	0	0	0	0	0	0	0	0
	25 mg/mL (12,5%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle Cloranfenicol (30µg/mL)		34	35	38	28	30	30	33	36
Controle Cefalotina (30µg/mL)		50	45	40	11	0	26	0	29
Controle dos Microorganismos		+	+	+	+	+	+	+	+
Controle do etanol		0	0	0	0	0	0	0	0
		Concentração Inibitória Mínima (mg/mL)							
EB		9,77	9,77	19,55	39,10	19,55	19,55	19,55	19,55
		(1:16)	(1:16)	(1:8)	(1:4)	(1:8)	(1:8)	(1:8)	(1:8)

Legenda: EB = extrato bruto; FHEX = fração hexano; *Sa* = *Staphylococcus aureus*; *Sp* = *Streptococcus pyogenes*; *Se* = *Staphylococcus epidermidis*; *Pm* = *Proteus mirabilis*; *Pa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *Kp* = *Klebsiella pneumoniae*; *Ec* = *Escherichia coli*; *St* = *Salmonella typhimurium*; + = crescimento dos microrganismos no meio de cultura isento de droga.

contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, o α -amirina (0,29%) demonstrou a maior atividade entre os triterpenos presentes na *Arnebia hispidissima* (Lehm.) DC. contra a *E. coli* (Singh; Singh, 2003; Jain et al., 2003).

Há de se considerar que o tamanho da zona de inibição de crescimento no teste de difusão é bastante influenciada pela velocidade de difusão das substâncias no ágar (Lenette et al, 1987), sendo assim, é possível que a baixa polaridade dos compostos da fração hexano diminua a velocidade de difusão destes no ágar, gerando um halo de inibição proporcionalmente menor em relação aos antibióticos controle que são polares e ao extrato bruto. Esses resultados colaboram na elucidação preliminar de que os compostos presentes na FHEX estão envolvidos na atividade biológica testada, podendo futuramente direcionar os estudos realizados.

Considerando os resultados dos testes nota-se que existe potencial antibacteriano e por este motivo novos ensaios estão sendo efetuados visando a melhor exploração desta atividade na fração hexano, nas frações não avaliadas e substâncias isoladas da *E. velutina*, na busca de novas alternativas terapêuticas que possam servir de subsídio para uma terapêutica racional a partir de fontes naturais brasileiras.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Viseldo Ribeiro de Oliveira, Ph.D, da EMBRAPA Semi-Árido, pela obtenção e viabilização da identificação da espécie vegetal e As Ervas Curam Indústria Farmacêutica pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Amer MA, Shamma M, Freyer AJ 1991. The tetracyclic *Erythrina* alkaloids. *J Nat Prod* 54: 329-363.
- Carvalho JLS 2001. *Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do Nasturtium officinale R. BR., Brassicaceae*. Curitiba, 105p. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.
- Cunico MM, Miguel OG, Miguel MD, Kerber VA, Montrucchio DP, Auer CG, Grigoletti Júnior A 2003. Avaliação da atividade antibacteriana de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. *Rev Ciên Farm* 24: 141-145.
- Da Cunha EVL, Dias C, Barbosa-Filho JM, Gray AI 1996. Eryvellutinone, an isoflavanone from the stem

- bark of *Erythrina vellutina*. *Phytochemistry* 43: 1371-1373.
- Dantas MC, Oliveira FS, Bandeira SM, Batista JS, Silva Junior CD, Alves PB, Antonioli AR, Marchioro M 2004. Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. *J Ethnopharmacol* 94: 129-133.
- Decker MW, Anderson DJ, Brioni DL, Donnelly-Roberts DL, Chae KH, O'neill AB, Piattoni-Kaplan M, Swanson S, Sullivan JP 1995. Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *European J Pharmacol* 280: 79-89.
- Dias Filho BP, Nakamura CV, Cortez DAC, Sanches NR, Pessini GL, Holetz FB 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1027-1031.
- EPAMIG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais 1993. O Gênero *Erythrina* L. no PAMG - Herbário da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais. *Daphne* 3: 20-25.
- Farmacopéia Brasileira 1988. 4 ed. Parte II, São Paulo, p. v.4.2.3, v. 4.2.4.
- Jain SC, Jain R, Singh B 2003. Antimicrobial principles from *Arnebia hispidissima*. *Intern J Pharmacogn* 41: 231-233.
- Konemann EW, Allen SD, Dowwel Jr VR, Sommers HM 1993. *Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido*. 2.ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda.
- Lenette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ 1987. *Manual de microbiologia clínica*. 4. ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Lorenzi H 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. São Paulo: Editora Plantarum.
- Lorenzi H, Matos FJA 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.
- Miguel MD, Miguel OG 2004. *Desenvolvimento de fitoterápicos*. 2ed. São Paulo: Robe Editorial.
- Rabelo LA, Agra MF, Da Cunha EVL, Silva MS, Barbosa Filho JM 2001. Homohesperetin and phaseollidin from *Erythrina velutina*. *Biochem Syst Ecol* 29: 543-544.
- Romeiro R da S 2001. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: Ed. UFV.
- Singh B, Singh S 2003. Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytother Res* 17: 814-816.
- Telikepalli H, Gollapudi SR, Keshavarz-Shokri A, Velazquez L, Sandamann RA, Veliz EZ, Jagannadha Rao KV, Madhavi AS, Mitscher LA 1990. Isoflavonoids and a cinnamyl phenol from root extracts of *Erythrina variegata*. *Phytochemistry* 29: 2005-2007.
- Vasconcelos SMM, Rebouças Oliveira G, Mohana de Carvalho M, Rodrigues ACP, Rocha Silveira E, Fonteles MFM, Florenço Sousa FC, Barros Viana GS 2003. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. *Biol Pharm Bull* 26: 946 -949.