

# Abordagem Fitoquímica Preliminar e Avaliação da Atividade Antimicrobiana de *Cochlospermum regium* em Diferentes Metodologias (Bioautografia, Disco-Difusão e Microdiluição)

## Preliminary Phytochemical Approach and Antimicrobial Activity Assessment of *Cochlospermum regium* by Different Methodologies (Bioautography, Disk-Diffusion and Microdilution)

Kelly Thaynan Juvenal dos Santos<sup>a</sup>; Wanessa Costa Silva<sup>a</sup>; Heron Fernandes Vieira Torquato<sup>a</sup>; Angela Márcia Selhorst e Silva Beserra<sup>a</sup>; Rogério Alexandre Nunes dos Santos<sup>b</sup>; Iberê Ferreira da Silva Junior<sup>c\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade de Cuiabá, Curso de Farmácia, MT, Brasil

<sup>b</sup>Universidade de Cuiabá, Laboratório de Farmacognosia, MT, Brasil

<sup>c</sup>Universidade de Cuiabá, Laboratório de Microbiologia, MT, Brasil

\*E-mail: iberejr@hotmail.com

---

### Resumo

A espécie *Cochlospermum regium* é uma espécie medicinal endêmica do Cerrado muito utilizada pela população como método alternativo para tratamento de infecções, principalmente do sistema reprodutor feminino. As folhas, entrecascas e raízes de *C. regium* foram coletadas na estrada do Manso, Km 23 – Cuiabá/MT. Foram obtidos extratos e frações das partes da planta coletada. Para os ensaios foram utilizados os seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* 25922, *Shigella flexneri* 12022, *Enterococcus faecalis* 29212, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Klebsiella pneumoniae* 13883, *Candida glabrata* 90030, *Candida albicans* 10231, *Candida krusei* 6258, *Candida tropicalis* 25922 e *Candida parapsilosis* 40058. O presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil fitoquímico preliminar e avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes farmacógenos de *Cochlospermum regium* através de diferentes metodologias (bioautografia, disco-difusão e microdiluição). Os resultados obtidos validam o uso popular dessa espécie, pois apresentou propriedades antibacteriana e antifúngica.

**Palavras-chave:** *C. Regium*. Disco-Difusão. Bioautografia. Microdiluição.

### Abstract

The species *Cochlospermum regium* is an endemic medicinal species from Cerrado, widely used by the population as an alternative method for the treatment of infections, especially of the female reproductive system. Leaves, inner bark, and roots of *C. regium* were collected on Manso Road, Km 23 - Cuiabá / MT. Extracts and fractions of plant were collected. For the experiments, the following microorganisms were used: *Staphylococcus aureus* 25923, *Escherichia coli* 25922, *Shigella flexneri* 12022, *Enterococcus faecalis* 29212, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Klebsiella pneumoniae* 13883, *Candida glabrata* 90030, *Candida albicans* 10231, *Candida krusei* 6258, *Candida tropicalis* 25922 and *Candida parapsilosis* 40058. The present study aimed to investigate the preliminary phytochemical profile and to evaluate the antimicrobial activity of different pharmacogens from *Cochlospermum regium* through different methodologies (bioautography, disk diffusion and microdilution). The results validate the popular use of this species, once it showed antibacterial and antifungal properties.

**Keywords:** *C. Regium*. Disk-Diffusion. Bioautography. Microdilution.

---

## 1 Introdução

A utilização das plantas medicinais é uma das mais antigas armas empregadas para o tratamento de enfermidades humanas e muito da informação a respeito de seu uso vem através da sabedoria popular (SALVAGNINI *et al.*, 2008). O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais (CLSI, 2009).

Muitas áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias oriundas de plantas, como a fitoquímica, que trabalha no isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos. Nos últimos anos, no Brasil, várias pesquisas foram realizadas com contribuições relevantes sobre o assunto, não só quanto a aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de plantas que ocorrem nos diferentes ecossistemas brasileiros (ALBUQUERQUE *et al.*, 2006).

A espécie *Cochlospermum regium* é uma espécie medicinal

endêmica do Cerrado muito utilizada pela população como método alternativo para tratamento de infecções, principalmente do sistema reprodutor feminino (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). Estudos revelam que o extrato aquoso de *C. regium* apresentou atividade citotóxica in vitro em células de ovário de hamsters chineses (CESCHINI; CAMPOS, 2006).

Os flavonóides kaempferol, isolados do extrato da raiz de *C. regium* possuem atividade analgésica e antiedematogênica (CASTRO *et al.*, 1994). Estudos farmacológicos, químicos e agrônômicos desta espécie são escassos (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). Sendo imprescindível a realização de estudos dinâmicos aplicando várias metodologias. Para se determinar a atividade antimicrobiana de *C. regium* foram utilizados três metodologias distintas: bioautografia, disco-difusão e microdiluição.

A bioautografia é um método útil para a localização de compostos antimicrobianos em um cromatograma de um extrato complexo. Isto permite o isolamento bioguiado de compostos ativos (ZACCHINO, 2011). Na disco-difusão

o extrato da planta ou composto a testar é colocado num reservatório, em contato com um meio sólido, inoculado com um determinado microorganismo. Após um tempo adequado de incubação, mede-se o diâmetro ou o raio da zona clara em volta do reservatório (ZACCHINO, 2011). Para realizar a microdiluição preparam-se vários tubos de ensaio ou placas com meio caldo ou ágar, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão padrão do organismo a ser testado. O método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessário para inibir ou matar um microorganismo (ALVES *et al.*, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil fitoquímico preliminar e avaliar a atividade antimicrobiana de diferentes farmacógenos de *Cochlospermum regium* através de diferentes metodologias (bioautografia, disco-difusão e microdiluição).

## 2 Material e Métodos

As folhas, entrecasas e raízes de *C. regium* foram coletadas na estrada do Manso, Km 23 – Cuiabá/MT, secas em estufa de circulação de ar durante 48 h à temperatura de 40 °C, em seguida trituradas em moinho de facas e o pó tamisado em malha de 40-50 ABNT. O extrato hidroalcoólico 70% das partes da planta foram obtidos por maceração a frio, filtrados, rotaevaporados e os solventes residuais eliminados em estufa de secagem a 45 °C. A partir dos extratos da entrecasca e das folhas foram obtidas frações clorofórmica e acetato de etila a partir do método de partição (CAMPAGNOLO; ALEIXO; BAPTISTELLA, 2008). Uma amostra botânica está depositada no Herbário Central da UFMT sob exsiccata n° 33.502. A triagem fitoquímica preliminar foi realizada segundo Matos, 1988 (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Para testar a atividade antimicrobiana foram utilizados os métodos de bioautografia, disco-difusão e microdiluição. Para os ensaios foram utilizados os seguintes microorganismos: *S. aureus* 25923, *E. coli* 25922, *S. flexneri* 12022, *E. faecalis* 29212, *P. aeruginosa* 27853, *K. pneumoniae* 13883 *C. glabrata* 90030 *C. albicans* 10231, *C. krusei* 6258, *C. tropicalis* 25922, e *C. parapsilosis* 40058.

Para o ensaio de bioautografia utilizamos o método da cromatografia em camada delgada (CCD), onde foram utilizadas cromatofolhas em alumínio de sílica gel G60 F<sub>254</sub>, sobre as quais foram aplicadas 10µl do extrato das folhas de *C. regium* a 10%, usando-se a fase móvel acetato de etila/clorofórmio (1:1 v/v)[10]. Neste método a atividade antibacteriana de *C. regium* foi testada frente às seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Para realização da bioautografia foi vertido sobre as cromatoplasas ágar Müller-Hinton contendo o inóculo bacteriano. Após a solidificação do meio, as cromatoplasas foram armazenadas em estufa microbiológica a 37 °C por 24h. Para a revelação do halo de inibição das cromatoplasas foi utilizado o revelador TTC

(cloreto de 2,3,5-trifenil-1H-tetrazólio).

O ensaio realizado pelo método de difusão dos extratos das folhas e raízes foi feito em ágar Müller-Hinton e Sabouraud utilizando discos estéreis (CECON) impregnados com os extratos das folhas e raízes obtidos na dose de 1000 µg/disco. Cloranfenicol 30 µg/disco, fluconazol 25 µg/disco e anfotericina B 100 µg/disco foram utilizados como padrões. Para os ensaios, selecionaram-se as bactérias e fungos leveduriformes ATCC: *Staphylococcus aureus* 25923, *Enterococcus faecalis* 29212 *Klebsiella pneumoniae* 13883, *Shigella flexneri* 12022, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Candida parapsilosis* 40058, *Candida albicans* 10231, *Candida krusei* 6258 e *Candida albicans* 64550. As placas foram incubadas a 37°C e após 18 h, os halos de inibição de crescimento foram medidos, sendo considerados ativos, os halos ≥ 10 mm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Já para as frações clorofórmica e acetato de etila da entrecasca e das folhas a atividade antibacteriana foi avaliada em duplicata em disco em ágar Müller-Hinton utilizando discos estéreis (CECON) impregnados com diferentes doses das frações: 500µg e 1000 µg/disco. Cloranfenicol 30 µg/disco foi utilizado como padrão. As bactérias ATCC testadas foram: *S. aureus* 25923, *E. coli* 25922, *S. flexneri* 12022, *E. faecalis* 29212 e *P. aeruginosa* 27853. Após 18 h de incubação a 37 °C, os halos de inibição de crescimento foram medidos. Halos de inibição os halos ≥ 14 mm foram considerados ativos. Os ensaios de disco-difusão foram realizados e interpretados de acordo com o documento do CLSI, 2011 (CLSI, 2008; 2011).

No ensaio de microdiluição foram utilizadas cepas de *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 25922, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. parapsilosis* ATCC 40058.

As frações clorofórmica e acetato de etila da entrecasca e clorofórmica das folhas foram diluídos sucessivamente a partir da concentração de 1000 µg/mL. Anfotericina B 100mcg foi utilizada como padrão. As microplacas foram incubadas por 18 horas em estufa a 37°C e realizou-se a leitura das absorbâncias através do ELISA, 450 nm, seguido dos cálculos de percentual de inibição. A técnica de microdiluição foi realizada e interpretada de acordo com o documento do CLSI, 2008 (CLSI, 2008).

## 3 Resultados e Discussão

Na pesquisa fitoquímica preliminar foram investigados a presença de alcalóides, cumarinas, flavonóides, saponinas e taninos, sendo encontrados na planta os compostos fenólicos flavonóides e taninos, além de saponinas. Lima *et al.* (1996) isolaram uma flavonona glicosilada denominada Dihidrokaenferol 3-O-glucopiranoside (C21H22O11). Segundo Ritto (1996), foram isolados da raiz dessa espécie flavonóides e o ácido graxo 1-hidroxitetradecanona-3.

Para investigar a possível atividade antimicrobiana da planta foram utilizados os extratos hidroalcoólicos de suas partes e suas frações em diferentes metodologias, foi possível verificar a atividade proposta em todas as técnicas realizadas.

**Tabela 1:** Biautografia do extrato das folhas de *C. regium*

Microorganismos	R <sub>fs</sub>	Resultado
<i>Escherichia coli</i>	0,44	Positivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-----	-----
<i>Shigella flexneri</i>	0,24	Positivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,26	Positivo

A Tabela 1 descreve a CCD do extrato que apresentou separação de cinco bandas com Rf de 0,17, 0,24, 0,26, 0,44, 0,98; respectivamente. Os Rf 0,24 ;0,26 e 0,44 apresentou atividade para *S. flexneri*, *S. aureus* e *E. coli* respectivamente . Não se observou halo de inibição para *K. pneumoniae*.

**Tabela 2:** Disco – difusão do extrato bruto das folhas e raízes.

Microorganismos	Halo de Inibição Extrato das Folhas (mm)	Halo de Inibição Extrato da Raiz (mm)	Controle – Cloranfenicol (mm)	Controle – Fluconazol (mm)	Controle – Anfotericina B (mm)
<b>Bactérias</b>					
<i>S. aureus</i>	18	14	30	---	---
<i>E. faecalis</i>	16	12	28	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	18	12	20	---	---
<i>K. pneumoniae</i>	14	---	30	---	---
<i>S. flexneri</i>	20	14	30	---	---
<b>Fungos</b>					
<i>C. albicans</i>	20	12	---	---	---
<i>C. parapsilosis</i>	22	20	---	16	---
<i>C. krusei</i>	22	20	---	18	24

A Tabela 2 relata os resultados do teste com os extratos brutos pelo método de disco-difusão onde foi observada maior atividade em relação às folhas sobre a bactéria *S. flexneri* e sobre as leveduras *C. parapsilosis* e *C. krusei*. O extrato da raiz apresentou maior poder inibitório sobre *C. parapsilosis* e

*C. krusei*. De acordo com Oliveira (1996) o extrato etanólico e suas frações a partir do rizoma da planta apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* semelhante ao antibiótico vancomicina, enquanto os compostos isolados e a decocção não exerceram atividade sobre a bactéria.

**Tabela 3:** Disco-difusão das frações clorofórmica e acetato de etila da entrecasca e das folhas.

Bactérias	Halo de Inibição Fração clorofórmica das folhas (500µg/disco)	Halo de Inibição Fração clorofórmica das folhas (1000µg/disco)	Halo de Inibição Fração clorofórmica da entrecasca (1000µg/disco)	Halo de Inibição Fração acetato de etila das folhas (500µg/disco)	Halo de Inibição Fração acetato de etila das folhas (1000µg/disco)
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	14mm
<i>S. aureus</i>	-	18mm	-	-	14mm
<i>S. flexneri</i>	-	18mm	14mm	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	20mm	18mm	14mm	14mm	-

A Tabela 3 apresenta os resultados da disco-difusão realizada para testar a atividade das frações, verifica-se então que a fração clorofórmica das folhas na concentração 500µg/disco obteve um halo de inibição significativo para *P. aeruginosa* de 20mm. E na concentração de 1000µg/disco verificou-se atividade antibacteriana significativa de 18mm de halo de inibição para *S. aureus*, *S. flexneri* e *P. aeruginosa*. Já a fração clorofórmica da entrecasca na concentração de 1000µg/disco obteve halos de inibição de

14mm para *S. flexneri* e *P. aeruginosa*. A fração acetato de etila das folhas na concentração 500µg/disco apresentou resultado somente para *P. aeruginosa* (14mm). E na concentração de 1000µg/disco apresentou halo de inibição de 14mm para *E. faecalis* e *S. flexneri*. Na investigação feita por Solon, 2009 foi observada atividade antimicrobiana do extrato hidroalcólico, sendo verificada principalmente esta atividade na fração acetato de etila apresentando efeito frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

**Tabela 4:** Microdiluição das frações clorofórmica e acetato de etila

Leveduras	Fração clorofórmica da entrecasca [500 µg/mL]	Fração acetato de etila da entrecasca [500 µg/mL]	Fração acetato de etila da entrecasca [250 µg/mL]	Fração acetato de etila da entrecasca [62 µg/mL]
<i>C. glabrata</i>	87,72% inibição do crescimento	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	75,22% inibição do crescimento	81,89% inibição do crescimento	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	84,93% inibição do crescimento
<i>C. tropicalis</i>	-	56,22% inibição do crescimento	-	-

No teste de microdiluição foi avaliada somente a atividade antifúngica, obtendo resultados significativos para *C. glabrata* da fração clorofórmica da entrecasca na concentração de 500 µg/mL com 87,72% de inibição do crescimento, *C. krusei* da fração acetato de etila da entrecasca na concentração de 500 µg/mL e 250 µg/mL com 75,22% e 81,89% de inibição do crescimento respectivamente, *C. parapsilosis* da fração acetato de etila da entrecasca na concentração de 62µg/mL com 84,93% de inibição do crescimento e para *C. tropicalis* da fração acetato de etila da entrecasca na concentração de 500 µg/mL com 56,22% de inibição do crescimento. A fração clorofórmica das folhas não apresentou atividade inibitória para as leveduras testadas.

#### 4 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos utilizando-se as diversas metodologias apresentadas, pode-se concluir que a disco-difusão dos extratos das folhas e das raízes e a bioautografia do extrato das folhas da espécie *C. regium* apresentou ação antibacteriana contra *S. flexneri*, *E. coli*, *S. aureus* e ação antifúngica na disco-difusão superior quando comparados com a atividade dos antifúngicos controle. Somente a fração clorofórmica das folhas apresentou atividade contra *P. aeruginosa*. A ação antifúngica das frações das entrecasca de *C. regium* avaliados pelo método de microdiluição apresentou inibição do crescimento para *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

Portanto pode-se sugerir que a espécie *C. regium* tenha ação tanto para bactérias gram-positivas quanto para bactérias gram-negativas e também para leveduras do gênero *Candida*. Sendo assim é necessário buscar e caracterizar quimicamente os extratos e frações estudadas e posteriormente identificar os componentes desses compostos e quais grupamentos químicos apresentam essa atividade sobre os microorganismos testados.

#### Referências

ALBUQUERQUE, U.P. *et al.* As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.*, v.16, p.678-689, 2006.

ALVES, E.G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de

espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova*, v.31, n.5, p.1224-1229, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília DF, 2006.

CAMPAGNOLO, B.M.; ALEIXO, A.M.; BAPTISTELLA, L.H.B. Purificação e identificação dos compostos ativos dos extratos hidroalcoólicos das folhas e caules da pariparoba (*Piper regnelli*) In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 60., Campinas. 2008. *Anais...* Campinas, 2008.

CASTRO, M.S.A. *et al.* Efeito analgésico e antiedematogênico do *Cochlospermum regium* (Mart.)Pilger ('algodãozinho'). *Medicinal Plants Symposium of Brazil*, v.13. 1994.

CESCHINI, L.; CAMPOS, E.G. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart & ) Pilger aqueous root extract on mammalian cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v.103, n.302. 2006.

CLSI. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved guideline - Second edition. CLSI document M44-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard - Third edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COLLINS, CH.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. São Paulo: UNICAMP, 1997.

LIMA, D.P. *et al.* A flavanone glycoside from *Cochlospermum regium*. *Fitoterapia*, v.66, n.6, p.545-546, 1996.

MATOS, F.J.A. *Introdução a fitoquímica experimental*. Fortaleza: UFC, 1988.

OLIVEIRA, C.C.; SIQUEIRA, J.M.; REZENDE, U.M. Antibacterial Activity of Rhizomas from *Cochlospermum regium*: Preliminary results. *Fitoterapia*, v. 67, n.2, 1996.

RITTO, J.L.A. Caracterização farmacognóstica da droga e do extrato fluido de algodãozinho-do-campo, a *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank.) Pilger. Dissertação (Mestrado Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento em Tecnologia Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Farmacognosia e farmacobiocotecnologia. São Paulo: Premier, 1997.

SALVAGNINI, L.E. *et al.* Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.*, v.18, n.2, p.34, 2008.

SOLON, S. Análises fitoquímicas e farmacognósticas da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart. Et Schr.) Pilger, Cochlospermaceae. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Campo Grande, 2009.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2011, p.439-441.

