Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2012;33(2):267-274
ISSN 1808-4532

Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (Mimosaceae)

Marcelo José Dias Silva[1]; Lilian Harue Endo[1]; Amanda Latercia Tranches Dias[1]; Geraldo Alves Silva[1]; Marcelo Henrique Santos[1]; Marcelo Aparecido Silva[1,*]

[1]Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Alimentos e Medicamentos.Universidade Federal de Alfenas (Unifal) Alfenas, MG, Brasil.

RESUMO

A espécie *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (Mimosaceae), conhecida popularmente como sabiá e cerva viva, é uma planta arbórea encontrada na caatinga nordestina brasileira, amplamente utilizada pela população na forma de infusões para o tratamento de feridas, bronquites e anti-inflamatório. Diante do exposto, os objetivos deste estudo, foram determinar as atividades antioxidantes e antimicrobianas do extrato etanólico das folhas (EHM), caules (EHL), cascas do caule (EHC), raízes (EHR) e frações obtidas das folhas de *M. caesalpiniifolia* Benth. A atividade antioxidante foi avaliada através do método de captação do radical DPPH, enquanto a atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo, sobre leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A capacidade antioxidante mostrou que a fração acetato de etila (Fr-EtOAc) foi diretamente proporcional ao teor de polifenóis totais com IC_{50} de 20,08 ± 0,10 µg/mL e 721,29±0,60 mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. Na atividade antimicrobiana, todos os extratos e frações exibiram atividade inibitória de crescimento frente aos micro-organismos microrganismos avaliados e em concentrações variando de 5 a 1000 µg/mL. A Fr-EtOAc apresentou valores promissores de inibição de crescimento frente a fungos, como *Candida glabrata* (ATCC 90030) e *Candida krusei* (ATCC 6258), com concentrações de 20 e 40 µg/mL, respectivamente. Estes resultados são importantes, pois são os primeiros a serem realizados com a espécie *M. caesalpiniifolia*.

Palavras-chave: Mimosa. Antioxidante. Antimicrobiano.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento de muitas doenças está associado à medicina popular de diferentes partes do mundo (Fabri et al., 2011). Diferentes culturas dos mais distintos lugares, desenvolvidos ou não, conhecem e utilizam o potencial terapêutico dos vegetais no tratamento de doenças. Práticas estas que acompanham o homem desde a pré-história e que evoluíram com ele ao longo dos anos (Coutinho et al., 2006).

O interesse pela descoberta de extratos vegetais com diferentes atividades biológicas tem aumentado muito nos últimos anos. Neste contexto, plantas que apresentam atividade antioxidante são de grande interesse visto que a presença de radicais livres está associada a diversos fatores como mutação do DNA, oxidação de proteína e peroxidação lipídica, que tem relação direta com a formação de ateromas e ateroscleroses (Santos et al., 2010). Da mesma forma, plantas que apresentam atividade antimicrobiana também são de extrema importância, devido ao fato de muitos micro-organismos apresentarem resistência, não somente aos antibióticos já pré-estabelecidos, como também aos de última geração, causando crescente problema de saúde pública mundial (Oliveira & Silva, 2008; Silva et al., 2010).

A família Mimosaceae possui cerca de 60 gêneros distribuídos em mais de 4000 espécies encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente nas regiões áridas. As plantas desta família são principalmente arbustos que apresentam suas folhas verdes praticamente o ano inteiro e seus frutos são geralmente legumes (Nunes et al., 2008). Já é relatado na literatura o uso medicinal dessa família como: anti-helmíntico, anti-inflamatório, adstringente, colestérico, anti-hemorrágico, diurético e analgésico (Sukanya et al., 2009; Mello et al., 1996; Kokane et al., 2009). Também em estudos comparativos entre as espécies *M. pudica* e *M. rubicalis,* desenvolvido por Genest et al. (2008), demonstraram a atividade antioxidante e antibacteriana frente à *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* ampicilina resistente, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A espécie *M. pudica* foi também avaliada quanto ao seu potencial terapêutico para o tratamento da psoríase, apresentando uma regeneração da taxa de crescimento celular normal, regulando o processo de apoptose celular (Poleo Armero & Gaviria, 2008). Suas folhas e cascas possuem classe de metabólitos especiais como alcaloides, taninos, flavonoides, terpenoides e carotenoides (Nunes et al., 2008).

Autor correspondente: Marcelo Aparecido Silva - Departamento de Alimentos e Medicamentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Alfenas (Unifal) - Alfenas - MG - Brasil - Departamento de Alimentos e Medicamentos - e-mail:marcelo.silva@unifal-mg.edu.br.

A espécie *Mimosa caesalpiniifolia* é nativa do Nordeste brasileiro. Ela Foi introduzida com sucesso em regiões úmidas dos Estados da Paraíba (Brejo Paraibano), Rio de Janeiro (Baixada Fluminense e Planaltos Fluminenses), São Paulo (Vale do Paraíba do Sul e Planaltos Paulistas) e Minas Gerais (Norte e Sul de Minas Gerais), sendo conhecida nessas regiões como sabiá e cerca viva (Lewis & Elias, 1981). Suas folhas verdes, ou secas, são forrageiras e servem de fonte de alimento para ruminantes, possuem alto valor nutricional, contendo aproximadamente 17% de proteína (Lorenzi, 2000). Suas cascas apresentam alto teor de taninos e flavonoides (Santos et al., 2010), relacionados com propriedades anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, antiaterogênica, antialérgica e antimicrobiana (Santos-Filho et al., 2011).

Assim, esse estudo teve como objetivo investigar o potencial antioxidante e antimicrobiano de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (Mimosaceae), bem como realizar a prospecção química dos extratos etanólicos e frações orgânicas da espécie a fim de identificar as principais classes de constituintes químicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização da área e coleta de material vegetal

As folhas, caules, cascas do caule e raízes de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. foram coletadas próximas as localidades do Café Campinho situado no município de Alfenas (21°24'44,1"S, 45°55'19,9"W), estado de Minas Gerais, Brasil, no mês de fevereiro de 2010. A identidade botânica da planta foi confirmada pelos professores Dr. Marcelo Polo e Dr. Geraldo Alves da Silva. A exsicata do vegetal encontra-se depositada como documento taxonômico no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG, sob o número 695.

As partes coletadas da espécie foram previamente divididas, separadas e dispostas em camadas finas, sendo submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 45ºC. A temperatura da estufa foi controlada por um termostato e um termômetro, os quais garantiram uma homogeneidade na temperatura utilizada durante a secagem. Já a perda da água foi monitorada por pesagens consecutivas em balança analítica. Quando o peso permaneceu constante (três pesagens consecutivas), a secagem deu-se por terminada. Após a secagem completa, as folhas, caules, casca do caule e raízes foram trituradas em moinho de facas e pesadas dando origem a 3071,52 g de folhas, 550,58 g de caule, 289,32 g de casca do caule e 57,23 g de raízes.

Os pós obtidos passaram pela padronização do tamanho de partícula, utilizando para isso o Agitador de Peneiras para Análise Granulométrico – Eletromagnético (ErTel®), com os tamise 850, 710, 500, 250, 180, 125 mm. A agitação ocorreu a uma vibração de cinco por nove minutos, seguinte a Farmacopéia Brasileira 5ª edição, (2010). Após o processo, foram obtidos o tamanho médio das partículas: folhas 250,03 µm, caule 280,12 µm, casca do caule 285,02 µm e raízes 231,03 µm.

Extração

Para a obtenção dos extratos bruto das folhas foi utilizado o método de extração exaustivo de percolação simples e maceração para as outras partes da planta. A metodologia empregada na percolação e na maceração foi desenvolvida segundo Prista et al. (2008) e Farmacopéia Brasileira 5ª edição, (2010). O liquido extrator para a obtenção de todos os extratos foi o etanol 70%.

Obtenção das frações do extrato bruto da folhas

Quatro gramas do extrato etanólico das folhas (EHM) foram dissolvidos em água (300 mL) e submetidos ao processo de extração liquído-liquído (partição). O acetato de etila (100 mL por três vezes) foi o primeiro solvente a ser parcionado com a mistura (água + extrato), e em seguida, foi feito o mesmo procedimento com o *n*-butanol (100 mL por três vezes). Após a extração, os solventes das frações, foram eliminados por rotaevaporador e liofilizador. Com isso, três frações foram produzidas: fração acetato de etila (Fr-EtOAc) (23,92% rendimento), fração butanólica (Fr-BuOH) (46,97% de rendimento) e fração aquosa (Fr-AqOH) (16,96% de rendimento).

Análise fitoquímica preliminar

As análises cromatográficas foram feitas em placas de sílica gel 60, em diferentes sistemas de solventes clorofórmio/metanol/*n*-propanol/água, 5:6:1:4 (v/v/v/v) e clorofórmio/metanol 85:15 (v/v). Os flavonoides foram identificados por sua coloração intensa em luz UV (254 nm), quando revelados com NP/PEG no sistema de solventes clorofórmio/metanol (85:15, v/v) (Wagner et al., 2009). Também foram utilizados padrões autênticos (Sigma) dos flavonoides (quercetina, catequina e rutina). Os testes para taninos foram realizados segundo os procedimentos descritos por Simões et al. (2006) na reação com a gelatina, e Schneider (1990) na reação com sais de ferro. Utilizou-se também, vapores de iodo e soluções de $CeSO_4$ (saponinas e terpenoides), iodoplatinato (alcaloides), vapores de amônia (antraquinonas e cumarinas) e anisaldeído/ácido sulfúrico (flavonoides, saponinas, terpenos, esteroides, ácidos gálico e catequinas) (Wagner et al., 2009).

Determinação do teor de polifenóis totais dos extratos e frações

O teor de polifenóis totais, (PT) nas folhas (EHM), caule (EHL), cascas (EHC), raízes (EHR) e Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH obtidas das folhas de *M. caesalpiniifolia,* foi estimado por ensaio colorimétrico baseado nos procedimentos descritos por Glasl, (1983), com algumas modificações (Yamaguti-Sasaki et al., 2007). As amostras em estudo (100 mg) foram dissolvidos em metanol, transferindo, quantitativamente, para um balão volumétrico de 100 mL e o volume final foi completado com metanol. Uma alíquota de 7,5 mL desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL. Uma alíquota de 100 µL, desta última solução, foi agitada com 500 µL

do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada por 1 minuto; passado este tempo 2 mL de Na_2CO_3 a 15% foram adicionados à mistura. Finalmente, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como "branco" o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10 a 350 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e frações

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura (Brand-Williams et al., 1995), com pequenas modificações (Sánchez-Moreno et al., 1998). Monitorando, também, o consumo do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações (Mensor et al., 2001). Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 516 nm, tendo como controle positivo o ácido ascórbico.

Ensaios microbiológicos

Avaliação do perfil de sensibilidade

Foram avaliadas as concentrações inibitórias de 50% do crescimento (IC_{50}) e 100% (IC_{100}). Os valores de IC_{50} (concentração bacteriostática/fungistática mínima) e IC_{100} (concentração bactericida/fungicida mínima) foram calculados através das análises de 50% e 100%, respectivamente, dos valores de crescimento máximo obtido pelo microrganismo, apenas na presença do meio de cultura e na ausência das diluições dos derivados utilizados. A confirmação da ação bacteriostática/bactericida e/ou fungistática/fungicida das diluições foi realizada através do plaqueamento da diluição específica, e das concentrações imediatamente superior e inferior no meio de cultura agar Mueller Hinton. As determinações do perfil de sensibilidade foram realizadas de acordo com a metodologia de microdiluição em meio RPMI 1640 para leveduras, conforme protocolo M27A3 (CLSI, 2008), e microdiluição em caldo Mueller Hinton para bactérias, conforme protocolo M7A6 (CLSI, 2003).

Derivados analisados

Os derivados analisados foram: EHM, EHL, EHC, EHR e Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH. A metodologia empregada foi desenvolvida segundo Prista et al. (2008) e Farmacopéia Brasileira 5ª edição, (2010). Os extratos e as frações foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções em DMSO foram diluídas 100 vezes no meio de cultura utilizado no ensaio, reduzindo a concentração final do solvente para 1%. O DMSO, nesta concentração e sem os derivados, foi utilizado no ensaio como controle da diluição. Os extratos foram testados em 10 concentrações (µg/mL): 1000; 500; 250, 125, 100, 80, 40, 20, 10 e 5.

Micro-organismos avaliados

Os ensaios foram realizados sobre fungos e bactérias padrões, *American Type Culture Collection* (ATCC). Para fungos, utilizou-se leveduras do gênero *Candida: Candida albicans* ATCC 64548, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750. Para bactérias Gram-positivas, utilizou-se, *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Para bactérias Gram-negativas, utilizou-se *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). As amostras de bactérias foram mantidas em agar BHI e os fungos, em agar Sabouraud, a temperatura de 8°C, até o momento de realização dos testes.

Controles do ensaio

Os meios de cultura, RPMI 1640 e Mueller Hinton, acrescidos de DMSO nas mesmas concentrações finais propostas para os derivados, foram utilizados como controle negativo. As drogas padrões utilizadas como controle positivo, no teste, foram o antifúngico Fluconazol (nas concentrações em µg/mL: 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125) e o antibiótico Cloranfenicol (nas concentrações em µg/mL: 125; 62,5; 31,2; 15,6; 3,9; 1,95; 0,975; 0,487; 0,122; 0,06). Ressalta-se que os ensaios foram realizados em duplicata.

RESULTADOS

Triagem fotoquímica

Inicialmente, as triagens fitoquímicas do EHM, EHL, EHC, EHR e Fr-EtOAc, Fr-BuOH e Fr-AqOH, indicaram a presença de flavonoides, triterpenos, ácido gálico e catequinas (Tabela 1). Flavonoides derivados da quercetina com uma unidade de açúcar estão presentes, pois apresentaram manchas amarelas, quando reveladas com NP/PEG (Wagner et al., 2009) com Rf ~ 0,4 e ~ 0,3 no sistema de solventes Clorofórmio:Metano (85:15, v/v), e também, quando comparadas com padrões de flavonoides com uma e duas unidades de açúcares.

Tabela 1. Triagem fitoquímica preliminar do extrato etanólico (EHM); extrato etanólico do caule (EHL); extrato etanólico das cascas do caule (EHC); extrato etanólico das raízes (EHR); fração acetato de etila (Fr-EtOAc), butanólica (Fr-BuOH) e aquosa (Fr-AqOH) obtidas do extrato etanólico das folhas de *M. caesalpiniifolia* Benth.

Classes de compostos	EHM	EHL	EHC	EHR	Fr-EtOAc	Fr-BuOH	Fr-AqOH
Flavonoides	++	+	++	+	++	++	++
Triterpenos	+	+	+	+	-	-	-
Esteroides	-	-	+	-	-	-	-
Ácido gálico	++	++	++	++	++	++	++
Catequinas	++	++	++	++	++	++	++
Saponinas	-	-	+	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-

(+) Fraco positivo; (++) Forte positivo; (-) Ausência.

Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos e frações

Os resultados mostraram que, a capacidade antioxidante determinada pelo método quantitativo do radical DPPH foi diretamente proporcional ao teor de polifenóis totais (Tabela 2). A Fr-EtOAc, por sua vez, apresentou alto teor em polifenóis totais (721,29±0,60 mg de EAG/g) e uma correlação direta com a capacidade antioxidante em termos de IC_{50} de 20,08±0,10 µg/mL, quando comparada ao padrão de ácido ascórbico (AA) (6,82±0,06 µg/mL); sendo este valor significativo com os relatos na literatura para outras Mimosáceas (Barros et al., 2007). Ao contrário desta observação, foi a correlação com o extrato das raízes que demonstrou uma baixa capacidade antioxidante (IC_{50}) de 47,82±1,06 µg/mL com um baixo teor em polifenóis totais (150,31±0,43 mg de EAG/g).

Tabela 2. Conteúdo de fenóis totais (FT), atividade antioxidante (IC_{50}) dos extratos e frações de *M. caesalpiniifolia* Benth.

Amostras	FT (mg de EAG/g de extrato EtOH ± DP)	IC_{50} ± DP (µg/mL)
1. EHM	651,90±6,30	28,51±0,50
2. EHL	206,15±3,97	35,32±0,04
3. EHC	603,02±0,57	26,01±0,60
4. EHR	150,31±0,43	47,82±1,06
5. Fr-EtOAc	721,29±0,60	20,08±0,10
6. Fr-BuOH	672,57±0,76	26,05±0,06
7. Fr-AqOH	211,32±0,42	38,35±0,51
8. AA	-	6,82±0,06

EHM = extrato etanólico das folhas; **EHL** = extrato etanólico do caule; **EHC** = extrato etanólico das cascas do caule; **EHR** = extrato etanólico das raízes; **Fr-EtOAc** = fração acetato de etila; **Fr-BuOH** = fração butanólica; **Fr-AqOH** = fração aquosa; **AA** = ácido ascórbico; **FT** = polifenóis totais. **EAG** = equivalente de ácido gálico; **IC_{50}** = expressa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH; **DP** = desvio padrão da média.

Avaliação microbiológica

As concentrações inibitórias de 50% do crescimento (IC_{50}) e 100% (IC_{100}) dos extratos e frações da *Mimosa caesalpiniifolia* foram determinadas sobre leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Todos exibiram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados e em concentrações variando de 5 a 1000 µg/mL. As concentrações correspondentes aos valores de IC_{50} e IC_{100} e as concentrações imediatamente superior e inferior, quando plaqueadas em Meio agar Mueller Hinton, demonstraram o efeito bacteriostático/fungistático da concentração correspondente ao valor de IC_{50} e o efeito bactericida/fungicida da concentração correspondente ao valor de IC_{100}.

No ensaio sobre fungos (Tabela 3), observou-se que o IC_{50} do EHM e suas frações, seguem a seguinte ordem decrescente de atividade: Fr-EtOAc < EHM < Fr-AqOH < Fr-BuOH, já a Fr-EtOAc apresentou valores menores de IC_{100}, quando comparado com a Fr-AqOH, Fr-BuOH e EHM (exceto, na concentração 500 µg/mL frente *C. krusei,* e não houve ação sobre *C. albicans*).

Na verificação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *M. caesalpiniifolia*, observou-se a atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-positivas contra *S. aureus* e *B. cereus.* Na tabela 4, observa-se que a ação bactericida nas mesmas concentrações tanto para o EHM, quanto para a Fr-AqOH (IC_{50} = 5 µg/mL e IC_{100} = 1000 µg/mL). Estes valores podem ser indicativos de que, possivelmente, ao fazer a partição, o(s) componente(s) responsável(is) pela ação bactericida, presentes no EHM, também pode estar presente na Fr-AqOH. Evidência sugerida pela ação obtida sobre as bactérias e análise por CCD.

A determinação das concentrações inibitórias de 50% do crescimento (IC_{50}) e 100% (IC_{100}), pelo método de microdiluição em caldo Mueller Hinton, mostraram que a Fr-BuOH em relação ao *S. aureus* apresentou ação bactericida, na concentração de 500 µg/mL e 1000 µg/mL frente ao *B. cereus*, enquanto o EHL e o EHC apresentaram ação bactericida semelhantes (IC_{50} = 1000 µg/mL e IC_{100} = não houve ação). Os extratos e frações de *M. caesalpiniifolia* demonstraram pouca eficácia sobre Gram-negativas contra *E. coli e P. aeruginosa,* com diferentes concentrações (Tabela 4).

Tabela 3. Determinações das concentrações inibitórias (C_{50}) e (IC_{100}) para fungos.

		C. albicans ATCC 10231	*C. albicans* ATCC 64548	*C. glabrata* ATCC 90030	*C. krusei* ATCC 6258	*C. parapsilosis* ATCC 22019	*C. tropicalis* ATCC 75
Fluconazol	IC_{50}	1	2	Sem ação	Sem ação	16	1
EHM 10% (µg/mL)	IC_{50}	40	40	5	20	1000	1000
	IC_{100}	Sem ação	Sem ação	1000	500	1000	1000
Fr-EtOAc (µg/mL)	IC_{50}	40	40	10	20	20	80
	IC_{100}	1000	1000	20	40	1000	1000
Fr-BuOH (µg/mL)	IC_{50}	40	40	1000	1000	1000	1000
	IC_{100}	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Fr-AqOH (µg/mL)	IC_{50}	80	80	10	20	40	100
	IC_{100}	1000	1000	1000	1000	1000	1000
EHC 10 % (µg/mL)	IC_{50}	1000	1000	40	250	500	1000
	IC_{100}	1000	Sem ação	1000	Sem ação	Sem ação	Sem ação
EHL 10 % (µg/mL)	IC_{50}	500	1000	80	100	125	1000
	IC_{100}	1000	1000	1000	1000	1000	1000
EHR 10% (µg/mL)	IC_{50}	1000	250	40	80	80	1000
	IC_{100}	1000	1000	1000	500	500	1000

EHM = extrato etanólico das folhas; Fr-EtOAc = fração acetato de etila; Fr-BuOH = fração butanólica; Fr-AqOH = fração aquosa; EHC = extrato etanólico das cascas do caule; EHL = extrato etanólico de caule; EHR = extrato etanólico das raízes.

Tabela 4. Determinações do perfil de sensibilidade, concentrações inibitórias (IC_{50}) e (IC_{100}) para bactérias.

		S.aureus ATCC 6538	*B.cereus* ATCC 11778	*E.coli* ATCC 25922	*P.aeruginosa* ATCC 9027
Cloranfenicol	IC_{50}	1.95	0.06	0.48	16.5
	IC_{100}	15.6	15.6	3.9	125
EHM 10% (µg/mL)	IC_{50}	5	5	1000	500
	IC_{100}	1000	1000	1000	Sem ação
Fr-EtOAc (µg/mL)	IC_{50}	100	500	500	1000
	IC_{100}	1000	1000	1000	Sem ação
Fr-BuOH (µg/mL)	IC_{50}	250	40	1000	1000
	IC_{100}	500	1000	Sem ação	Sem ação
Fr-AqOH (µg/mL)	IC_{50}	5	5	1000	500
	IC_{100}	1000	1000	Sem ação	1000
EHC 10 % (µg/mL)	IC_{50}	1000	Sem ação	1000	Sem ação
	IC_{100}	Sem ação	Sem ação	Sem ação	Sem ação
EHL 10 % (µg/mL)	IC_{50}	1000	1000	500	Sem ação
	IC_{100}	Sem ação	Sem ação	Sem ação	Sem ação
EHR 10% (µg/mL)	IC_{50}	10	500	500	1000
	IC_{100}	Sem ação	Sem ação	Sem ação	1000

EHM = extrato etanólico das folhas; Fr-EtOAc = fração acetato de etila; Fr-BuOH = fração butanólica; Fr-AqOH = fração aquosa; EHC = extrato etanólico das cascas do caule; EHL = extrato etanólico de caule; EHR = extrato etanólico das raízes.

DISCUSSÃO

Baseado na triagem fitoquímica realizada com os extratos e as frações de *M. caesalpiniifolia*, observou-se que flavonoides derivados da quercetina e catequina estão presentes, além de outras classes de compostos existentes, conforme Tabela 1. O gênero *Mimosa* possui. Segundo dados da literatura, a composição fitoquímica é constituída por: flavonas *C*-glicosiladas; flavonas *O*-glicosiladas; taninos; mimosina; *β*-sitosterol; ácido linoléico mimopudine; 7,3, 4'-trihydroxy 3,8-dimetoxi flavona; ácido *p*-cumárico e lupeol (Sukanya et al., 2009; Mello et al., 1996; Kokane et al., 2009).

Posteriormente, foram realizados os ensaios antioxidantes e a quantificação do teor de polifenóis totais, que podem promover investigações úteis e ser correlacionado com a atividade anti-inflamatória e microbiológica. Vários trabalhos na literatura sugerem uma correlação entre antioxidante e anti-inflamatório, ou seja, alguns extratos vegetais reduzem as inflamações e o recrutamento de células polimorfonucleares (PMN), presentes nos tecidos inflamados (Rosa et al., 2010). Além destas propriedades, há um grande interesse na possibilidade de serem utilizadas em várias doenças degenerativas, como envelhecimento prematuro, cicatrizante, câncer, entre outras (Haslam et al., 1992).

A análise dos resultados desse trabalho considera como valor de referência a IC_{50} do ácido ascórbico (IC_{50} = 6,82±0,06 µg/mL), para comparar a atividade antioxidante dos extratos e frações obtidas da espécie. A escolha do ácido ascórbico, como padrão, é devido a sua alta atividade antioxidante.

A partir dos resultados apresentados da Tabela 2, observa-se que a Fr-EtOAc apresentou maior capacidade antioxidante, em comparação com os EHM, EHC, EHL, EHR, Fr-BuOH e Fr-AqOH. Isso ocorre devido ao maior conteúdo de substâncias polifenólicas. A capacidade antioxidante relativa ou total da Fr-EtOAc foi estatisticamente comparável com a do ácido ascórbico, o que denota o potencial desta fração. Esta atividade poderá estar diretamente correlacionada com a presença de compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, presentes na maioria da espécie estudada (Fabri et al., 2011).

Vale destacar a importância da atividade antioxidante observada no extrato das folhas, o qual foi superior à da casca. Sendo assim, a substituição do uso popular das cascas pelas folhas (fonte renovável) poderia constituir uma atitude importante para a preservação da espécie.

Portanto, é possível estabelecer correlações entre a capacidade antioxidante do extrato e/ou frações de *M. caesalpiniifolia* e a atividade de sequestro de radicais livres de espécies vegetais contendo taninos e flavonoides, demonstrando a eficiência da classe de compostos na captura de radicais, o que pode contribuir para a prevenção ou redução do desenvolvimento de patologias associadas ao estresse oxidativo.

Avaliação microbiológica

Os trabalhos sobre a atividade antimicrobiana de outras espécies de *Mimosa* são poucos citados na literatura. Lozoya et al. (1989), ao realizarem um estudo com 10 plantas usadas na medicina popular do México, observaram para *M. tenuiflora* atividade inibitória dos extratos aquosos e etanólico contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos dermatófitos. Comparando com a espécie estudada, é observada uma semelhança no potencial inibitório contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Gonçalves et al. (2005), verificaram em algumas árvores nativas do Brasil que o extrato etanólico das folhas e cascas de *M. tenuiflora* inibiu 100% das bactérias testadas (*S. aureus, B. cereus, E. coli e P. aeruginosa)*, com potencial inibitório de 100 % (IC_{100}) entre 1000 e 13000 µg/mL. Da mesma forma, Genest et al. (2008) também observaram efeito inibitório em alguns estudos conduzidos com as espécies de *M. pudica* e *M. rubicalis,* apresentando atividade contra quatro bactérias da microbiota oral, associadas à doenças periodentais e cariogênicas com

potencial inibitório de 100 % (IC_{100}) entre 1000 e 15000 µg/mL.

Outra espécie de *Mimosa*, como *M. pigra*, foi testada por Sanz-Biset et al. (2009) em um estudo comparativo entre diferentes tipos de extratos (acetato de etila e etanólico), e dois órgãos da planta (cascas e folhas) frente a *S. aureus*, observando melhor atividade com o extrato etanólico das cascas (IC_{100} de 0,45 mg/mL). Para as folhas, o potencial inibitório de 100 % (IC_{100}) foi de 9,35 mg/mL.

Quando comparado os extratos das partes da espécie *M. caesalpiniifolia*, frente à atividade fungicida, a atividade seguiu a ordem decrescente: raiz < caule < folha < casca, demonstrado um potencial antimicrobiano para os mesmos, podendo com isso, ser considerados um recurso promissor para o tratamento de enfermidades. A Fr-EtOAc apresentou maior potencial inibitório de 100 % (IC_{100}) referente à fungos *C. albicans e C. parapsilosis.* Observa-se que ambos os fungos são consideradas oportunistas e podem acometer pacientes imunocomprometidos e/ou sob terapia antimicrobiana por um longo período. Sendo que, *C. albicans* é o principal patógeno responsável pela maioria das infecções nosocomiais (Matos et al., 2009). Já a *C. parapsilosis,* tende a crescer como biofilme em dispositivos médicos, relacionando-se, diretamente, com doenças clinicamente significativas, sendo identificada como fatores de riscos adicionais o uso de antibióticos (Giannini & Pires, 2011).

Os extratos mostraram maior potencial inibitório para as bactérias Gram-positivas contra *S. aureus* e *B. cereus.* Observa-se que, ambas as bactérias são consideradas agentes patogênicos e têm a capacidade de produzir toxinas responsáveis por infecções alimentares, e enzimas extracelulares que determinam o potencial de deterioração. O *B. cereus* encontra-se no solo, ar e em alimentos processados, além disso, produzem esporos. Já o *S. aureus* tem a capacidade de se adaptar em temperaturas que variam de 7°C a 48,5°C e crescem em uma variedade de alimentos (Kumar et al., 2009).

Os extratos e as frações da espécie estudada, demonstraram pouca eficácia para as bactérias Gram-negativas. Isto pode ter ocorrido devido à composição diferenciada da membrana das bactérias Gram-negativas em relação a Gram-positivas. A parede celular de Gram-negativas possui um componente adicional, uma membrana externa, que corresponde a uma segunda bicamada lipídica, que adere firmemente à camada de peptideoglicano, conferindo maior rigidez. A face externa da membrana é rica em lipopolissacarídeos, o que a torna mais lipofílica em relação a substâncias exógenas (Tortora et al., 2011).

Portanto, os componentes do extrato com caráter mais lipofílico ou outros afins, poderão atravessar ou agir sobre a membrana, desencadeando a diminuição do crescimento bacteriano. Somente o EHM e a Fr-EtOAc agem inibindo 100% do crescimento da *E. coli* na concentração de 1000µg/mL, enquanto a Fr-AqOH e o EHR foram os únicos que apresentaram inibição de crescimento de 100% frente ao *P. aeruginosa.*

A família Mimosoceae, possui na constituição química da grande maioria de suas espécies, flavonoides, alcaloides e substâncias tânicas (Meckes-Lozoya et al., 1990). A capacidade da espécie *Mimosa caesalpiniifolia* de exibir atividade antimicrobiana pode ser devido à presença de compostos como flavonoides e taninos, em diferentes graus de distribuição na planta. Isto pode ser evidenciado quando analisamos a Fr-EtOAc, que concentra grande parte dos flavonoides do extrato da folha extraídos por afinidade com o solvente utilizado na partição. A Fr-EtOAc apresentou valores promissores de inibição de crescimento frente aos fungos, *C. glabrata* e *C. krusei,* com concentrações de 20 e 40 µg/mL, respectivamente.

Os flavonoides e taninos apresentam a habilidade de inativar enzimas e complexarem-se com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias, configurando os prováveis mecanismos de ação antimicrobiana. A total ruptura de membranas microbianas pode ser dada por flavonoides de caráter lipofílico (Mendes et al., 2011). Sendo assim, podemos sugerir a presença destes compostos nos extratos e frações de *M. caesalpiniifolia,* que levam à expectativa da presença de uma atividade antimicrobiana nos mesmos, a qual foi relatada nos estudos para fungos e bactérias.

Assim, é possível estabelecer correlações entre a capacidade antioxidante e microbiológica dos extratos e frações de *M. caesalpiniifolia,* e de espécies vegetais contendo taninos e flavonoides demonstrando a eficiência destes compostos na captura destes radicais e na ação antimicrobiana. Este estudo reafirma a importância de dados etnofarmacológicos na seleção de plantas para triagem de bioatividade.

AGRADECIMENTOS

A FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL/MG. E também, ao Prof. Dr. Marcelo Polo pela contribuição da coleta e identificação da espécie.

ABSTRACT

Assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of the organic extracts and fractions of Mimosa caesalpiniifolia Benth. (Mimosaceae)

The species *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (Mimosaceae), popularly known as thrush and hind alive, is a tree found in Brazilian caaringa, widely used by the population in the form of infusions for the treatment of wounds, bronchitis and anti-inflammatory. Thus, the goal of this study was to determine the antioxidant and anti-microbial activity of ethanolic extracts from the leaves (EHM), trunks (EHL), trunk barks (EHC), roots (EHR) and fractions obtained from the leaves of *M. caesalpiniifolia* Benth., used by the populations as popular medication as an anti-inflammatory medication and as a relief to respiratory problems. The antioxidant action was evaluated through the capturing the radical DPPH, while the antimicrobial action was evaluated through the method of micro-dilution in broth, on yeasts, Gram-positive and Gram-negative bacteria. The antioxidant capacity has shown that the ethyl-acetate fraction (Fr-EtOAc) was directly proportional to the poly-phenol contents with an IC_{50} at 20.08 ± 0,10µg/

mL and 721.29±0.60mg of EAG (gallic acid equivalents) per g of the extract. As regards the antimicrobial activity, the extracts and fractions showed a growth-inhibiting activity for the micro-organisms evaluated and in concentrations from 5 to 1000µg/mL. The Fr-EtOAc showed promising growth-inhibiting figures in the case of yeasts such as *Candida glabrata* (ATCC 90030) and *Candida krusei* (ATCC 6258), in 20 and 40µg/mL concentrations, respectively. These results are important as they are the first to be obtained with the *M. Caesalpiniifolia* species.
Keywords: Mimosa. Anti-oxidant. Antimicrobial.

REFERÊNCIAS

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Technol. 1995; 28(1):25-30.

Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quím Nova. 2007; 30:351-5.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 6th ed. M7-A6. Wayne, PA: CLSI; 2003.

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

Coutinho DF, Agra MF, Barbosa-Filho JM. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae-Lauroideae). Rev Bras de Farmacogn. 2006; 16:(2):178-84.

Fabri RL, Nogueira MS, Moreira JD, Bouzada ML. Scio E. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of *Lippia* species by bioautography. J Med Food. 2011; 14:(7-8):840-6.

Farmacopéia Brasileira. 5th ed. São Paulo: Atheneu; 2010. v. 1-2.

Genest S, KC, Shah A, Rahman MM, Saif-e-Naser GMM, Nigam P, Nahar L, Sarker SD. Comparative bioactivity studies on two *Mimosa* species. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas. 2008; 7(1):38-43.

Giannini MJSM, Pires HR. *Cândida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas hemodiálise, aplicação de metodologia proteômicas e de fotocatálise; 2011. Biblioteca Virtual – FAPESP. [Cited 2012 junh. 01]. Available from: http://www.bv.fapesp.br/pt/bolsas/129292/candida-parapsilosis-c-orthopsilosis-isoladas/.

Glasl H. Zur photometrie in der drogenstandisierung. Deutsch Apoth Ztg. 1983; 123:1979-87.

Gonçalves AL, Alves Filho A, Meneze S H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq Inst Biol. 2005; 72(3):353-8.

Haslam E, Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Practical Polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press; 1992: 119,598.

Kokane DD, More RY, Kale MB, Nehete MN, Mehendale PC, Gadgoli CH. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica.* J Ethnopharmacol. 2009; 124:311-5.

Kumar TDK, Murali HS, Batra HV. Simultaneous detection of pathogenic *B. cereus*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* by multiplex PCR. Indian J Microbiol. 2009; 49(3):283-9.

Lewis GP, Elias TS. Mimoseae Bronn. In: Polhill RM, Raven PH, editors. Advances in Legume Systematics. Kew: Royal Botanic Garden; 1981:155-68.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Platarum; 2000.

Lozoya X, Navarro V, Arnason JT, Kourany E. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd) poir (tepescohuite) I - Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. Arch Invest Med. 1989; 20(1):87-93.

Matos BM, Komiyama EY, Balducci I, Koga-Ito CY. Atividade antifúngica do extrato alcoólico de *Mentha piperita* sobre *Candida albicans* e *C. Tropicalis*. Rev Odontol UNESP. 2009; 38(4):244-8.

Meckes-Lozoya MM, Lozoya X, Gonzales JL. Pharmacological properties *in vitro* of various extracts of *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). Arch Invest Med. 1990;1(2):163-9.

Mello JCP, Petereit F, Nahrstedt A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphmodendron adstringens*. Phytochemistry. 1996;41(3):807-13.

Mendes LPM, Maciel KM, Vieira ABR, Mendonça LCV, Silva RMF, Rolim-Neto PJ, Barbosa WLR, Vieira JMS. Atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa.* Rev Ciên Farm Básica Apl. 2011; 32(1):121-5.

Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leitão SG. Screening of Brazilian plant exlracts for antioxidanrt activily by the use of DDPH free radical method. Phytother Res. 2001; 15:127-30.

Nunes PX, Mesquita FR, Silva-Da, Lira DP, Costa VCP, Silva MVB, Xavier AL, Diniz MFFM, Agra MF. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(1):120-9.

Oliveira AC, Silva RS. Desafios de cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. Rev Elet Enferm. 2008; 10:189-97.

Poleo-Romero A, Gaviria R. Ointment or cream for topical treatment of psoriasis, comprises antioxidants of vegetable origin, where product is supplemented with creamy base

formed by cetyl alcohol, sterile alcohol, liquid paraffin, vaseline and distilled water. Rev Bras Farmacog. 2008; 19(1):121-9.

Prista LN, Alves CA, Morgado RMR. Técnica farmacêutica. 6th ed. Lisboa: Fundação Caloustre Gulbenkian; 2008. v. 2.

Rosa EA, Silva BC, Silva FM, Tanaka CMA, Peralta RM, Oliveira CMA, Kato K, Ferreira HD, Silva CC. Flavonoides e atividade antioxiante in *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. Rev Bras Farmacogn. 2010; 20(4):484-8.

Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto FM. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. J Sci Food Agricul. 1998; 76:270-6.

Santos PML, Japp AS, Lima LG, Schripsema J, Menezes FS, Kuster RM. A atividade antioxidante dos extratos de folhas de *Jacarandá puberula* Cham., Bignoniaceae, uma planta medicinal brasileira usada para depuração do sangue. Rev Bras de Farmacogn. 2010; 20(2):147-53.

Santos-Filho PR, Ferreira LA, Gouvêa CMCP. Protective action against chemical-induced genotoxicity and free radical scavenging activities of *Stryphnodendron adstringens* ("barbatimão") leaf extracts. Rev Bras Farmacogn. 2011; 21(6):1000-5.

Sanz-Biset J, Campos-De-La-Cruz J, Epiquién-Rivera MA, Cãnigueral S. A first survey on the medicinal plants of the *Chazuta valley* (Peruvian Amazon). J Ethnopharmacol. 2009; 122:333-62.

Schneider G. Arzneidrogen-ein kompendium für pharmazeuten, biologen und chemiker**.** Mannheim: Wissenschaftsverlag; 1990.

Silva CV, Reis ALV, Ferrer SR, Guerreiro HMN, Barros TF, Velozo ES. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de Rutaceae do Nordeste Brasileiro. Rev Bras Farmacogn. 2010; 20(3):355-60.

Simões CMO, Schemkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento**.** 5. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS; 2006.

Sukanya SL, Sudisha J, Hariprasad P, Niranjana SR, Prakash HS, Fathima SK. Antimicrobial activity of leaf extracts of Indian medicinal plants against clinical and phytopathogenic bacteria. Afric J Biotechnol. 2009; 8(23):6677-82.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: Artmed; 2011:827.

Wagner H, Bladt S, Zgainsky E. Plant Drug Analysis. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 2009.

Yamaguti-Sasaki E, Ito LA, Canteli VCD, Ushirobira TMA, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Nakamura CV, Mello JCP. Antioxidant capacity and *In Vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana.* Molecules. 2007; 12:1950-63.

Recebido em 10 de maio de 2012.

Aceito para publicação em 13 de junho de 2012.