

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN / ORIGINAL RESEARCH PAPER

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA E ANTIBACTERIANA DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Sideroxylon obtusifolium***

**Evaluation of the Topical Anti-inflammatory Activity and Antibacterial Activity of Methanol Extract in the *Sideroxylon obtusifolium* Leaves**

**Evaluación de la actividad antiedematogénica tópica y antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *Sideroxylon obtusifolium***

Pedro AQUINO<sup>1</sup>, Fernando GOMES FIGUEREDO<sup>1</sup>, Nara PEREIRA<sup>1</sup>, Eloiza NASCIMENTO<sup>1</sup>, Ana MARTIN<sup>1</sup>, Helenicy VERAS<sup>1</sup>, Cícera OLIVEIRA<sup>2</sup>, Sarah FERREIRA<sup>1</sup>, Livia LEANDRO<sup>1</sup>, Monalisa SILVA<sup>1</sup>, Irwin MENEZES<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratório de Microbiologia, Faculdade Leão Sampaio. Juazeiro do Norte-Ceará, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato, Ceará, Brasil.

**For correspondence.** fgfigueredo@gmail.com

**Received:** 12<sup>th</sup> January 2014, **Returned for revision:** 25<sup>th</sup> May 2015, **Accepted:** 28<sup>th</sup> July 2015.

**Associate Editor:** Francisco José Martínez Pérez.

**Citation / Citar este artículo como:** Aquino P, Gomes Figueredo F, Pereira N, Nascimento E, Martin A, Veras H, Oliveira C, Ferreira S, Leandro L, Silva M, Menezes I. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. Acta biol. Colomb. 2016;21(1):131-140. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1.48170>

**RESUMO**

*Sideroxylon obtusifolium*, conhecida como quixaba, é utilizada para diversos fins medicinais, dentre eles em casos de inflamações e infecções bacterianas, com isso, o estudo teve por objetivo investigar a atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico obtido das folhas de *S. obtusifolium*. A prospecção fitoquímica do extrato revelou a presença de diversas classes, entre eles: Fenóis; Taninos Pirogálicos, Flavonoides, Catequinas e alcaloides. Os polifenóis e flavonóides presentes neste extrato foram quantificados em 150,3 mg equivalentes de ácido gálico/g de extrato e 98,5 mg equivalentes de quercetina/g de extrato, respectivamente. Os resultados obtidos através dos testes de microdiluição e modulação mostraram potencial atividade antibacteriana quando associados a gentamicina e amicacina para cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*. Para cepas de *Escherichia coli*, houve sinergismo frente ao antibiótico amicacina havendo antagonismo para gentamicina, o mesmo efeito foi observado para *Pseudomonas aeruginosas* em ambos antibióticos. Nos testes para inflamação aguda através dos modelos de edema de orelha induzido por óleo de cróton e fenol, o extrato apresentou um potente efeito antiedematogênico significativo ( $p < 0,05$ ). Diante dos resultados, podem-se observar atividades biológicas de *S. obtusifolium*, o que condiz com seu uso na terapia popular.

**Palavras-Chave:** anti-inflamatória, antibacteriana, prospecção fitoquímica, *Sideroxylon obtusifolium*.

**ABSTRACT**

*Sideroxylon obtusifolium*, known as “quixaba”, is used for various medicinal purposes, including in cases of inflammation and bacterial infections, therefore, the study aimed to investigate the topical antibacterial and anti-inflammatory activity of the methanol extract obtained from the leaves of *S. obtusifolium*. The phytochemical screening of the extract revealed the presence of several classes, including Phenols; Tannins, Flavonoids, catechins and alkaloids. Polyphenols and flavonoids present in this extract were quantified in 150.3 mg of gallic acid equivalents / g extract and 98.5 mg of quercetin equivalents / g extract, respectively. The results obtained by the microdilution tests have shown potential and modulation antibacterial activity when associated gentamicin, and amikacin for multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. For *Escherichia coli*, there was synergism for amikacin, gentamicin having antagonism, the same effect was observed for *Pseudomonas aeruginosa* on both antibiotics. In tests for acute models of inflammation by ear edema

induced by croton oil, and phenol, the extract had a potent antiedematogenic significant effect ( $p < 0.05$ ). Therefore, the results can be observed biological activities of *S. obtusifolium*, which is consistent with its use in popular therapy.

**Keywords:** anti-inflammatory, antibacterial, chemical elucidation, *Sideroxylon obtusifolium*.

## RESUMEN

*Sideroxylon obtusifolium* conocida como *quixaba*, se utiliza para diversos fines medicinales, incluso en los casos de infecciones bacterianas y la inflamación, por lo tanto, este estudio tuvo como objetivo investigar la actividad antiinflamatoria tópica y antibacteriana del extracto de metanol obtenido de las hojas de *S. obtusifolium*. El tamizaje fitoquímico del extracto reveló la presencia de varias clases, incluyendo: fenoles; taninos pirogálicos, flavonoides, catequinas y alcaloides. Los polifenoles y flavonoides presentes en este extracto se cuantificaron en 150,3 mg de equivalentes de ácido/g de extracto gálico y 98,5 mg de extracto de quercetina equivalentes/g, respectivamente. Los resultados obtenidos por los ensayos de microdilución han mostrado actividad potencial y la modulación antibacteriana cuando se asocia gentamicina, amikacina y para las cepas resistentes a múltiples fármacos de *Staphylococcus aureus*. Para *Escherichia coli*, solo se obtuvo sinergismo con amikacina, y se observó antagonismo para gentamicina, este mismo efecto fue observado para *Pseudomonas aeruginosa* en ambos antibióticos. En las pruebas de modelos agudos de inflamación por edema de la oreja inducido por aceite de crotón, y el fenol, el extracto tuvo un efecto significativo antiedematogenic potente ( $p < 0,05$ ). Por lo tanto, los resultados muestran actividad biológica de *S. obtusifolium*, que es coherente con su uso en terapia popular.

**Palabras clave:** antiinflamatorio, antibacterial, prospección fitoquímica, *Sideroxylon obtusifolium*.

---

## INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins medicinais é uma prática antiga, com registro desde épocas milenares (Veiga-Júnior, 2008). No Brasil, mesmo com o avanço da indústria farmacêutica, muitos habitantes (principalmente da área rural), ainda se utiliza das plantas, empregando-as para o alívio ou cura de algumas enfermidades (Badke *et al.*, 2011).

As plantas produzem substâncias conhecidas como princípios ativos, que são compostos químicos originados durante o seu metabolismo, e são capazes de provocar algum tipo de atividade biológica quando introduzidos por qualquer via no organismo animal, inclusive no homem (Boscolo e Valle, 2008).

*Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) conhecida como quixabeira, é uma espécie da flora da caatinga (Pedrosa *et al.*, 2012). As folhas e principalmente as cascas são usadas geralmente na forma de chás, na terapia popular para vários fins terapêuticos como adstringente tônica, anti-inflamatória, tratamento de úlcera duodenal, gastrite, azia, lesão genital, cólicas, problemas renais e problemas cardíacos. Estudos farmacológicos comprovam a ação hipoglicemiante e ação contra micro-organismos, fazendo com que *S. obtusifolium* seja considerada uma espécie importante no uso da terapia tradicional (Agra *et al.*, 2007; Beltrão *et al.*, 2008; Araújo-Neto *et al.*, 2010; Pedrosa *et al.*, 2012; Leandro *et al.*, 2013).

As pesquisas sobre esta planta ainda são escassas, principalmente em relação ao estudo das folhas, por isso há um interesse de buscar os compostos presentes nesta parte da planta e comprovar por meio de modelos experimentais, o uso desta para diversos fins na medicina popular. Com isso, o presente trabalho teve por objetivo investigar a atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do

extrato metanólico obtido das folhas de *S. obtusifolium*, bem como fazer uma triagem dos componentes químicos presentes nesta parte da planta.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Universidade Regional do Cariri, Crato-CE, Brasil e no Laboratório de Microbiologia da Faculdade Leão Sampaio, Juazeiro do Norte-CE, Brasil.

### Material vegetal

As folhas de *S. obtusifolium* foram coletadas no município de Jardim-CE, no mês de outubro de 2013. Uma amostra representativa da espécie foi depositada no Herbário Cariense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) do Departamento de Ciências Biológicas (URCA) sobre registro: 10.648.

### Preparação do extrato metanólico

Para preparação dos extratos foram coletadas e pesadas 300 g das folhas de *S. obtusifolium* que permaneceram submersas em metanol separadamente por 72 h. Após esse período, o eluente foi filtrado e concentrado em condensador rotativo a vácuo e banho-maria (Brasileiro *et al.*, 2006). O rendimento do extrato bruto foi de 17 %.

### Ensaio Químicos

#### Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos foram realizados seguindo o método descrito por Matos (1997). Os ensaios se baseiam na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

**Determinação de fenóis totais**

As concentrações para a determinação de fenóis totais foram determinadas a partir da adição de 125 µL de cada uma das soluções do extrato metanólico das folhas de *S. obtusifolium* (EMSO) em que foram inicialmente preparadas, obedecendo a uma ordem decrescente de concentrações (5, 3, 1, 0,5, 0,25 mg/mL), sendo posteriormente adicionado 125 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* à 10 % mais 1,25 mL de carbonato de sódio completando as 2 mL com água destilada. Posteriormente as soluções permaneceram em temperatura ambiente por aproximadamente 45 minutos sem a presença de luminosidade, em seguida foi realizada a leitura dos testes, as absorbâncias mensuradas foram através do espectrofotômetro com filtro em 765 nm. Como padrão para o teste foi utilizado o ácido gálico afim de que seus valores sirvam de comparação para a determinação dos compostos fenólicos presentes nas soluções, expressas a partir da quantidade de ácido gálico presentes em cada miligrama do extrato em estudo (Singleton *et al.*, 1999). A média das leituras dos testes foi utilizada através dos resultados expressos em miligramas de ácido gálico por grama de extrato. A curva de calibração de ácido gálico foi determinada utilizando diferentes concentrações desta substância (400, 300, 200, 100 e 50 µg/mL).

**Determinação de flavonóides**

A determinação de flavonóides seguiu a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998), onde foram pipetados 2 mL do EMSO nas diferentes concentrações (1000, 500, 250, 100, 50 µg/mL) em tubos de ensaios individualmente. Após a adição do extrato, adicionou-se aos tubos 1 mL de cloreto de alumínio 5 % m/v em etanol a 80 % e 2 mL de metanol. Preparou-se o branco utilizando 4 mL de metanol e 1 mL de cloreto de alumínio. Aguardou-se 30 minutos em ambiente escuro e procedeu-se a leitura, sendo que foram utilizadas as concentrações de, 100, 50, 25, 15 e 10 µg/mL para a construção da curva de calibração de quercetina. A partir da equação da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de flavonóides, expresso em quercetina/g do extrato.

**Atividade anti-inflamatória tópica através de modelos de edema de orelha induzidos por agentes irritantes****Animais**

Os animais utilizados foram camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade *Swiss*, machos, pesando entre 20-30 g, provenientes do Biotério da Faculdade Leão Sampaio e da Faculdade Estácio de Medicina de Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil, foram mantidos em caixas de propileno, a temperatura média de 26 ± 2 °C, com ciclos claro/escuro de 12/12 h, recebendo ração (Labina, Purina®) e água a vontade. Não foram observados em nenhuma concentração do extrato testada (25 mg/mL e 50 mg/mL), efeitos colaterais ou morte dos animais, na via de aplicação utilizada. O projeto com protocolos referentes a este estudo foi submetido

à Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Regional do Cariri, com parecer: 00099/2014.1.

**Substâncias, reagentes e soluções**

As substâncias e reagentes utilizados durante os procedimentos experimentais farmacológicos foram: acetona P.A (Dinâmica, Brasil), fenol 99 % (Sigma- EUA), Indometacina (Merck Sharp e Dohme, Brasil), Óleo de Cróton (Sigma, EUA) e Solução Fisiológica de NaCl 0,9 % (Farmace, Brasil).

**Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton**

Este modelo é muito utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória tópica por tratamento agudo. O EMSO foi avaliado neste modelo, sendo que grupos de camundongos *Swiss* (n = 6) tiveram suas orelhas direitas tratadas topicamente, com 20 µL de acetona (controle), indometacina 100 mg/mL (2 mg/orelha), EMSO na concentração (25/50) mg/mL (0,5 mg/1 mg por orelha), esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 µL de óleo de croton 5 % (v/v) em acetona, foram aplicados topicamente na orelha direita e 20 µL do veículo acetona na orelha esquerda. Após quatro horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas através de um *punch* (perfurador de couro metálico) para avaliação do edema (Tubaro *et al.*, 1985).

**Edema de orelha induzido por fenol**

Neste modelo, que se assemelha a uma dermatite de contato, as orelhas direitas dos camundongos (n = 6/grupo) foram tratadas, topicamente, com 20 µL do agente irritante fenol 10 % (v/v), em acetona. Previamente, em torno de quinze minutos antes da aplicação do agente irritante, as orelhas direitas foram tratadas topicamente com 20 µL do EMSO nas concentrações de 25/50 mg/mL (0,5 mg/1 mg por orelha), acetona (controle) e indometacina 100 mg/mL (2 mg/orelha). Após uma hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para avaliação do edema (Young *et al.*, 1984; Crummey *et al.*, 1987).

**Quantificação do edema**

Os discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas direitas e esquerdas dos animais, tratadas respectivamente com o agente irritante e o veículo do mesmo, tiveram suas massas mensuradas com a utilização de uma balança analítica. O edema de orelha foi expresso em percentual, utilizando como cálculo a subtração da massa (em gramas) do disco obtido da orelha direita com a massa (em gramas) do disco obtido da orelha esquerda, dividindo em seguida com a massa (em gramas) do disco obtido da orelha esquerda, multiplicando o resultado por 100.

O cálculo do efeito inibitório médio da inflamação de cada tratamento procedeu-se com a subtração da média do percentual de edema do grupo submetido a tratamento: EMSO e Indometacina com a média do percentual de edema do grupo controle negativo (acetona), dividindo o resultado obtido com a média do grupo controle negativo e multiplicando o resultado por 100.

#### **Análise estatística dos dados**

Os dados apresentados foram expressos em média ± erro padrão da média (EPM). Para os ensaios que possuíram três ou mais grupos e uma única avaliação das amostras, as diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguindo-se do teste de Student-Newman-Keuls utilizando o software *GraphPad Prism* 6.0. Foram consideradas diferenças significativas valores de  $p < 0,05$ .

#### **Atividade antibacteriana e determinação da concentração inibitória mínima**

Os micro-organismos (Tabela 1) utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão de bactérias *Escherichia coli* ATCC 10536; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e multirresistentes da espécie *Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* 358 e *Pseudomonas aeruginosa* 03. Antes dos ensaios, as linhagens foram cultivadas a 37 °C por 24 horas em *Brain Heart Infusionbroth* – BHI (concentração indicada pelo fabricante).

A atividade antibacteriana foi avaliada pela metodologia de microdiluição em caldo, com base no documento M7-A6 (NCCLS 2002) para bactérias. Previamente, as cepas bacterianas foram ativadas em meios *Brain Heart Infusion Broth* (BHI), durante 24 h a 37 °C. Após este pré-cultivo ocorreu à padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em BHI com turvação correspondente a 0,5 da Escala McFarland ( $1 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias/mL). Em seguida essa suspensão

foi diluída até  $1 \times 10^6$  Unidades Formadoras de Colônias/mL em caldo BHI a 10 %, e volumes de 100 µL foram então homogeneizados em placa de microdiluição com 96 poços, acrescido de diferentes concentrações dos extratos (512 – 8 µg/mL), resultando num inóculo final de  $5 \times 10^5$  Unidades Formadoras de Colônias/mL (NCCLS, 2002).

Os extratos foram solubilizados inicialmente em água destilada estéril e dimetil sulfoxido (DMSO) de forma que foi obtido a solução estoque de 1024 µg/mL. Os testes foram efetuados em triplicata. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. Para revelação dos resultados, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada na concentração de 0,01 %. Após a incubação, 25 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente. O controle negativo do teste foi realizado com o caldo BHI (Javadpour *et al.*, 1998).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado a olho nu. A leitura dos resultados para determinação da CIM foi considerada como positiva para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa os que obtiveram coloração vermelha.

#### **Atividade moduladora**

A modulação foi realizada de acordo com a metodologia descrita no teste de microdiluição com BHI a 10 %. Foram acrescidos juntamente com as bactérias, antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina). O teste foi acompanhado de um controle positivo que consistiu na solução do micro-organismos com os antibióticos. Foi realizado um teste somente com os meios sem as bactérias e fungos, para verificação de contaminação (Coutinho *et al.*, 2008).

#### **Análise estatística dos resultados de microbiologia**

Os testes foram feitos em triplicata, e os resultados expressos como a média geométrica. A análise estatística foi aplicada à análise de variância (ANOVA) de duas vias

**Tabela 1.** Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.

Bacteria	Origem	Resistência a antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA 358)	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Ca, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Sensível
<i>Escherichia coli</i> (EC 27)	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob, Gen
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	Sensível
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA 03)	Catéter	Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami, Gen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	Sensível

Ast-Azitromicina; Ax- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicacina; Amox-Amoxicilina, Ca-Cefalexina; Cfc- cefaclor; Cf- Cefalotina; Caz-Ceftazidima; Cip-Ciprofloxacino; Clo -Clorafenicol; Im-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametoxazol, Tet-Tetraciclina; Tob- Tobramicina; Oxa- Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo- Neomicina; Para- Paramomicina; But- Butirosina; Sis-Sisomicina; Net- Netilmicina.

seguido pelo teste de Bonferroni utilizando o software *GraphPad Prism 6.0*.

## RESULTADOS

### Ensaios Químicos

Na prospecção fitoquímica do EMSO foi possível identificar a presença de diversas classes de substâncias (Tabela 2).

Na determinação dos fenóis totais pelo método *Folin-Ciocalteu* foram encontrados no EMSO a quantidade de 150,3 mg/g expressos como equivalentes de ácido gálico por grama de extrato bruto. Com a determinação da curva de calibração, realizada com a leitura da absorbância das diversas concentrações de ácido gálico, foi obtida a seguinte equação:  $y = 1,953x + 0,0899$ ,  $R^2 = 0,9951$ , a qual pode ser aplicada para a determinação dos fenóis totais em equivalentes microlitros de ácido gálico/g de extrato.

A curva de calibração para determinação dos flavonóides foi obtida após a leitura das diversas soluções de quercetina com concentração determinada, gerando a seguinte equação:  $y = 15,348x + 0,2073$  e  $R^2 = 0,9851$ , aplicadas para

determinação dos flavonóides como miligrama equivalente de quercetina/g de extrato. Encontrou-se no EMSO uma quantidade de 98,5 mg/g de flavonóides.

### Atividade antibacteriana

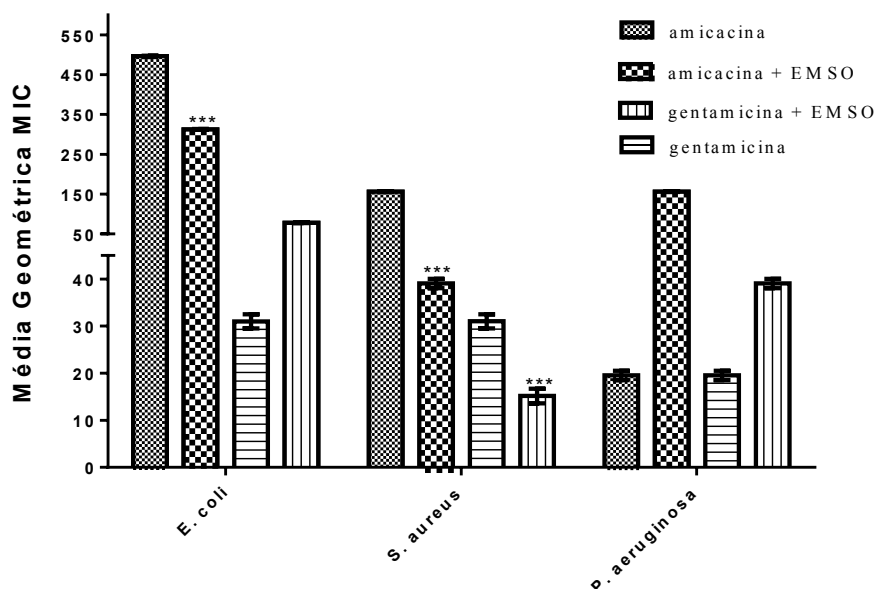
Foi realizado o procedimento para a determinação do CIM (Concentração Inibitória Mínima), com as bactérias de linhagem padrão e multirresistentes (*Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*, e *Pseudomonas aeruginosa*) e foram obtidos resultados  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ , concentração considerada clinicamente irrelevante. Um ensaio piloto utilizando apenas o DMSO foi realizado, mas nenhuma atividade antibacteriana ou moduladora foi verificada, indicando não apresentar toxicidade.

Em relação à avaliação da atividade moduladora do extrato, associadas aos aminoglicosídeos, os resultados demonstraram que o EMSO apresentou sinergismo quando combinado com a gentamicina e amicacina frente à linhagem multirresistente de *Staphylococcus aureus* 358,  $p < 0,001$ . Na linhagem de *Escherichia coli* 27 houve efeito sinérgico apenas na associação do extrato com a amicacina ( $p < 0,001$ )

**Tabela 2.** Prospecção fitoquímica do EMSO.

		METABÓLITOS														
EXTRATO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
EMSO		+	+	-	--	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

1 – Fenóis; 2 – Taninos Pirogálicos; 3 – Taninos Flobabênicos; 4 – Antocianinas; 5 – Antocianidinas; 6 – Flavonas; 7 – Flavonóis; 8 – Xantonas; 9 – Chalconas; 10 – Auronas; 11 – Flavononóis; 12 – Leucoantocianidinas; 13 – Catequinas; 14 – Flavononas; 15 – Alcalóides; (+) presença; (-) ausência. EMSO – Extrato Metanólico *Sideroxylon obtusifolium*



**Figura 1.** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) de aminoglicosídeos na ausência e presença do EMSO, *Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* 03, *Pseudomonas aeruginosa* 31. Two Way ANOVA, seguida do teste Bonferroni \*\*\* =  $p < 0,001$  vs antibiótico.

enquanto que com a gentamicina houve antagonismo, efeito similar com a linhagem da *Pseudomonas aeruginosa* 03 para ambos antibióticos (Fig. 1).

### Atividade anti-inflamatória tópica

Foram realizados dois modelos de inflamação tópica, o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton e o edema de orelha induzido por fenol. A figura 2 mostra o edema induzido pela aplicação única do óleo de cróton; de acordo com a análise estatística o EMSO, em ambas as concentrações, e a indometacina reduziram significativamente o edema,  $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$  respectivamente.

O EMSO 25 e 50 mg/mL aplicado por via tópica demonstrou redução significativa no percentual de edema de orelha após 1 hora da aplicação tópica de fenol 10 % em acetona, comparada com o grupo tratado com o veículo ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ). O grupo tratado com indometacina também demonstrou redução significativa ( $p < 0,001$ ) comparada com o veículo (Fig. 3).

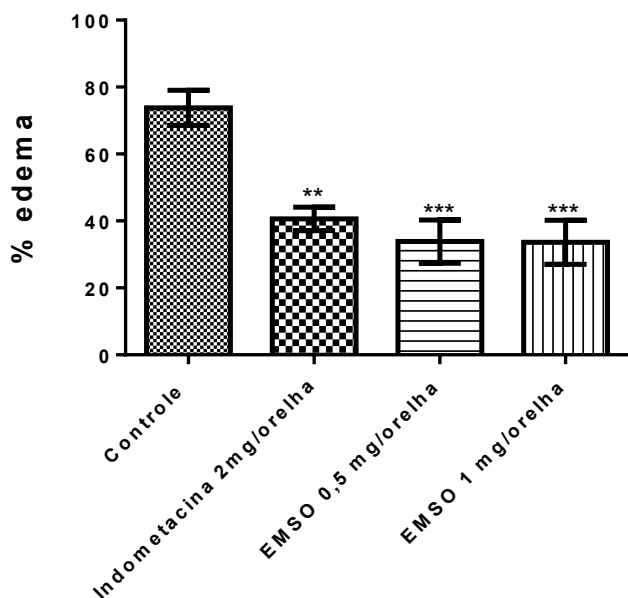
### DISCUSSÃO

Os resultados mostraram elevada quantidade de fenóis totais presentes nas folhas *S. obtusifolium*. Os fenóis totais constituem grupos bastante heterogêneos, e proteger plantas contra fatores externos é uma das suas principais atividades. Estes compostos podem reduzir o risco de várias doenças (Pereira *et al.*, 2009), devido a seu poder

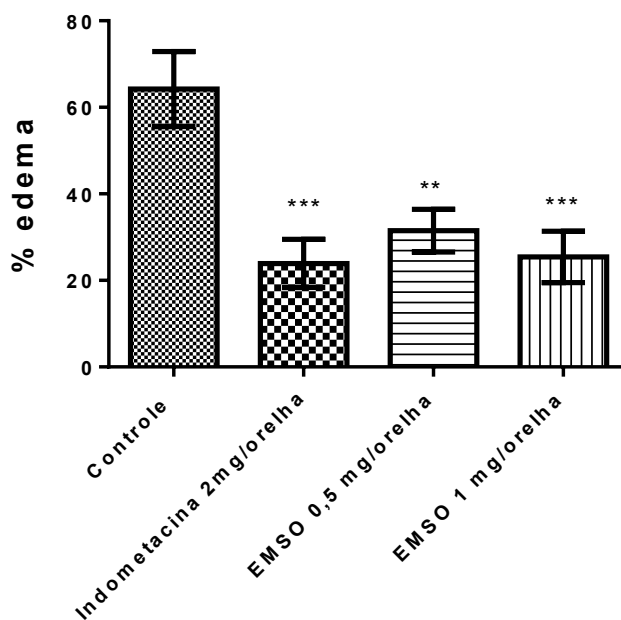
antioxidante principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase (Soares, 2002). Essas informações são úteis para correlacionar esta atividade a atividade anti-inflamatória, visto que já é comprovado na literatura que extratos vegetais ricos em metabólitos secundários reduzem inflamações por eliminar superóxidos que participam da cascata da inflamação (Desmarchelier *et al.*, 1999; Vatten e Shett, 2005).

Os flavonóides formam um grupo muito diversificado entre os produtos de origem natural, são metabólitos polifenólicos secundários com atividades biológicas muito diversas, sendo cada vez mais explorados na indústria farmacêutica (Simões *et al.*, 2004; Werz, 2007). Semelhante a este estudo, Silva (2008) evidenciou compostos flavonóides na casca e folha de *S. obtusifolium*, e um estudo realizado por Araújo-Neto (2010) revelou quantidades altas de flavonóides em frações derivadas do extrato etanólico da casca de *S. obtusifolium*.

Nos testes da atividade moduladora foram evidenciados efeitos sinérgicos e antagônicos, diferindo dos resultados de um trabalho anterior do nosso grupo, no qual analisou-se o extrato metanólico e hexânico da casca de *S. obtusifolium* para atividade antibacteriana. Neste trabalho o extrato metanólico não apresentou grau de modulação clinicamente relevante para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, mostrando efeito somente para cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, quando combinado com amicacina. (Leandro *et al.*, 2013). Os diferentes metabólitos presentes em ambas



**Figura 2.** Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton A indometacina foi utilizado como controle positivo. Análise estatística: One-Way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação o grupo controle negativo.



**Figura 3.** Edema de orelha induzido pelo fenol. A indometacina foi utilizado como controle positivo. Análise estatística: One-Way ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em comparação o grupo controle negativo.

as partes podem ter influenciado nestes resultados (Silva, 2008; Araújo-Neto *et al.*, 2010).

As bactérias Gram-negativas apresentam múltiplos mecanismos de resistência a várias classes de antibióticos. Linhagens multirresistentes expressam enzimas capazes de provocar alterações na estrutura do antibiótico fazendo-o perder a sua funcionalidade através de reações como a acetilação, poliadenilação e fosforilação. Mecanismos como bomba de efluxo expulsa o antibiótico do espaço periplasmático, impedindo-o que atinja o seu local de ação. As porinas, presentes na membrana plasmática das bactérias, são proteínas que formam canais com água; rege a entrada de alguns elementos, incluindo antibióticos, mudanças na conformação pode levar a membrana externa não permite a passagem de esses agentes para o espaço periplasmático (Tafur *et al.*, 2008).

Os antagonismos observados entre os antibióticos e os compostos do EMSO podem ser associados a fatores como a quelação do antibiótico ou de ligação dos compostos a locais específicos dos antibióticos, desse modo reduzindo o seu espectro de atividade. Isto indica que o antagonismo é devido a um efeito sinérgico multi-alvo, pois os constituintes de um extrato podem afetar a atividade destes antibióticos interferindo com vários alvos, cooperando em um efeito antagônico ou sinérgico (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009).

É conhecida a ação sinérgica de produtos naturais junto a antimicrobianos normalmente utilizados no tratamento terapêutico, determinando uma diminuição na sua CIM. Os metabólitos presentes no EMSO bem como em outros extratos dos produtos naturais podem aumentar a absorção de antibióticos devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular, bem como causar interferência no funcionamento das enzimas bacterianas. Este método está associado ao uso de drogas e plantas, utilizando uma abordagem com uma ou várias combinações de extratos, que podem atingir não apenas um único alvo, mas vários ao mesmo tempo, os diferentes componentes terapêuticos cooperam de uma forma sinérgica (Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009; Coutinho *et al.*, 2010; Matias *et al.*, 2010; Figueredo *et al.*, 2013).

Flavonóides são eficazes contra micro-organismos, podem tanto formar complexos de proteínas solúveis que se aderem à parede celular bacteriana como também causar ruptura da membrana plasmática de micro-organismos. Além disso, alguns estudos têm demonstrado sinergismo entre antibióticos convencionais e flavonóides contra cepas bacterianas resistentes (Tsuchiya *et al.*, 1996; Cushnie e Lamb, 2005).

Os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos são parte importante da terapia antibacteriana desde seu descobrimento, na década de 40. Ao se ligarem ao ribossomo bacteriano todos os aminoglicosídeos atuam exercendo seu efeito bactericida pelo mesmo mecanismo de ação, impedindo a síntese de proteínas. Portanto, torna-se

necessário a penetração no interior da célula bacteriana para que possam exercer seu mecanismo de ação. Para que isto ocorra é necessário que o aminoglicosídeo interaja com a superfície celular, seja transportado por meio da membrana e por fim realize o acoplamento com o ribossomo (Oliveira *et al.*, 2006).

A toxicidade celular é comum para todos muitos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos. A nefrotoxicidade e a ototoxicidade são efeitos tóxicos frequentes dos aminoglicosídeos (Oliveira *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2007). A combinação dos extratos com os aminoglicosídeos pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos colaterais dessa classe uma vez que associação acarreta em um efeito sinérgico reduzindo significativamente a CIM destas drogas, diminuindo a dose necessária para que haja sucesso terapêutico (Figueredo *et al.*, 2013).

Modelos de indução de inflamação pelos agentes químicos presentes neste trabalho são muito úteis para verificar o potencial de muitos produtos aplicados por via tópica, além de elucidar propriedades terapêuticas das mesmas nos processos inflamatórios cutâneos devido à aplicação das substâncias diretamente no foco inflamatório (Vane e Warner, 2000).

O agente irritante óleo de cróton, extraído das sementes de *Croton tiglium*, possui como seu maior constituinte o 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA) sendo utilizado em modelos empregados para avaliar a resposta inflamatória, uma vez que este agente induz inflamação cutânea e hiperproliferação celular, assemelhando-se a doenças de pele, como a psoríase. Estudos confirmaram que a inflamação aguda induzida por a administração tópica a partir de óleo de cróton aumenta a permeabilidade vascular, causa vasodilatação pela liberação de histamina, estimulando a migração de neutrófilos e macrófagos (Tubaro *et al.*, 1985; De Young *et al.*, 1989).

Os ésteres de forbol como o TPA ativam a cascata de inflamação do ácido araquidônico, por meio da cicloxigenase e lipoxigenase (COX-2 / LOX). A ativação da via da MAPK pela proteína quinase C, promove a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF- $\kappa$ B e a AP-1, os quais têm um papel central na regulação de diversas proteínas pró-inflamatórias, tais como algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), enzimas pró-inflamatórias, como COX-2 e iNOS, e moléculas de adesão (Pungeró *et al.*, 1998; Chi *et al.*, 2003; Murakawa *et al.*, 2006; Badilla *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2010).

Um modelo animal de inflamação tópica é o edema de orelha induzido pela aplicação tópica do fenol que tem semelhança à dermatite de contato que acontece em humanos, sendo um bom modelo para ser usado com o intuito de simulação da mesma (Lim *et al.*, 2004).

Este modelo induz formação de um intenso edema após 1 hora de aplicação do agente flogístico. Os mecanismos que explicam a irritação da pele causada pelo fenol seriam

o rompimento por efeito direto da membrana plasmática dos queratinócitos, liberando a IL-1 $\alpha$  pré-formada, IL-8, TNF- $\alpha$ , mediadores inflamatórios como os metabólitos do ácido araquidônico e de radicais livres. O fenol difere do óleo de cróton, pois este induz as citocinas inflamatórias envolvendo fatores de transcrição nuclear através de vias que dependem da proteína quinase C. Porém, apesar da inflamação ser desencadeada por vias diferentes, ambos os modelos, compartilham do envolvimento dos metabólitos do Ácido araquidônico e espécies reativas de oxigênio, na resposta inflamatória instalada (Wilmer *et al.*, 1994).

Araújo-Neto *et al.* (2010) demonstraram a atividade anti-inflamatória da entrecasca do extrato etanólico de *S. obtusifolium* utilizando o modelo de edema de pata induzido pela carragenina, muito usado para triagem de compostos com potencial atividade anti-inflamatória. Foi verificada potencial efeito anti-inflamatório desta planta, condizendo com os resultados mostrados neste trabalho.

A triagem química do EMSO mostrou-se rica em flavonoides; vários estudos demonstraram que essa classe age na diminuição da permeabilidade capilar, inibindo a infiltração de leucócitos e nos estágios iniciais do processo inflamatório. Podem atuar inibindo a proliferação de linfócitos e a produção de citocinas como a TNF- $\alpha$  e IL-1 (Biesalski, 2007).

Flavonoides como a santina e ermanina inibiram o desenvolvimento de edema de orelha induzido por PMA em camundongos. Em uma hora de exposição, santina inibiu a inflamação em 80,5 %, ermanina em 95,1 %. (Abad *et al.*, 1995).

Diversos Flavonoides podem interagir na COX, LOX e fosfolipase A<sub>2</sub>, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico (NO) (Cazarolli *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2008), o que pode justificar o efeito redutor de edema observado nos resultados deste trabalho.

## CONCLUSÃO

O estudo revelou o potencial terapêutico do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*, demonstrando ter ação moduladora da atividade antibacteriana, possível atividade antioxidante e anti-inflamatória. Fato este, devido aos metabólitos presentes com reconhecida atividade biológica. No entanto pesquisas adicionais precisam ser realizadas com intuito de verificar as substâncias isoladas presentes no extrato que apresentam estas atividades, servindo esta pesquisa como parâmetro para futuros estudos relacionado à espécie supracitada.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a colaboração e esforço de todos os autores, a Faculdade Leão Sampaio e a Universidade Regional do Cariri que deram apoio e fomento para realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- Abad MJ, Bermejo P, Villar A. Activity of flavonoids extracted from *Tanacetum microphyllum* DC. (Compositae) on soybean lipoxygenase and prostaglandin synthetase. *Gen Pharmacol.* 1995;26(4):815-819. Doi:10.1016/0306-3623(94)00242-F
- Agra MF, Baracho GS, Basílio IJ, Nurit K, Barbosa DA. Sinopse da flora medicinal do cariri paraibano. *Oecol Bras.* 2007;4(3):323-330.
- Araújo-Neto V, Bomfim RR, Oliveira VOB, Passos AMPR, Oliveira JPR, Lima CA, *et al.* Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. *Rev Bras Farmacogn.* 2010;20(6):933-938. Doi:10.1590/S0102-695X2010005000043
- Badilla B, Cambronero J, Cicció JF. Determination of topical antiinflammatory activity of the essential oil and extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), using the model of mouse ear edema induced by TPA and AA. *Pharmacogn Mag.* 2007;3(11):139-144.
- Badke MR, Bodó MLD, Silva FM, Ressel LB. Plantas Medicinais: O saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Esc Anna Nery.* 2011;15(1):132-139. Doi:10.1590/S1414-81452011000100019
- Beltrão AES, Tomaz ACA, Beltrão FAS, Marinho P. In vitro biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:696-698. Doi:10.1590/S0102-695X2008000500010
- Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;1(6):724-8.
- Boscolo OH, Valle LS. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia: Sér Bot.* 2008;63(2):263-277.
- Brasileiro BG. Antimicrobial and cytotoxic activities screen in gof some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Rev Bras Ciên Farm.* 2006;42: 195-202.
- Cazarolli LH, Zanatta L, Alberton EH, Figueiredo MSRB. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini Rev Med Chem.* 2008;8(13):1429-40. Doi:10.2174/138955708786369564
- Chi YS, Lim H, Park H, Kim HP. Effects of wogonin, plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: *in vivo* regulation of inflammation-associated gene expression. *Biochem. Pharmacol.* 2003;66(7):1271-1278. Doi:10.1016/S0006-2952(03)00463-5
- Coutinho HDM, Costa JGM, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18:670-675. Doi:10.1590/S0102-695X2008000500005.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides



- in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Comp Immunol Microbiol Infect.* 2010;33(6):467-471. Doi:10.1016/j.cimid.2009.08.001
- Crummey A, Harper GP, Boyle EA, Mangan FR. Inhibition of arachidonic acid-induced ear edema as a model for assessing topical antiinflammatory compounds. *Agents Actions.* 1987;20:69-76.
- Cushnie TPT, Lamb AJ. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J Ethnopharmacol.* 2005;101(1-3):243-248. Doi:10.1016/j.jep.2005.04.014
- De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions.* 1989;26(3-4):335-341.
- Desmarchelier C, Romão RL, Coussio J, Ciccia G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern. *J Ethnopharmacol.* 1999;67(1):69-77. Doi:10.1016/S0378-8741(98)00200-1
- Ferreira FS, Saraiva BRA, Araruna MKA, Menezes IRA, Costa JGM, Coutinho H DM, *et al.* Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*. *J Ethnopharmacol.* 2010;130(3):514-520. Doi: 10.1016/j.jep.2010.05.041
- Figueredo FG, Ferreira EO, Lucena BFF, Torres CMG, Lucetti DL, Lucetti ECP, *et al.* Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan *Biomed Res Int.* 2013;1:1-5. Doi:10.1155/2013/640682
- Javadpour MM. New antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem.* 1996;39(16):3107-3113. Doi:10.1021/jm9509410
- Leandro LMG, Aquino PEA, Macedo RO, Rodrigues FFG, Guedes TTM, Frutuoso, AD, *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e modulatório de extratos metanólico e hexânico da casca de *Sideroxylon obtusifolium*. *e-ciência.* 2013;1(1):1-10.
- Lim H, Park H, Kim HP. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. *Arch Pharmacol Res.* 2004;27(4):442-448. Doi:10.1007/BF02980087
- López-Posadas R, Ballester I, Abadía-Molina AC, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, *et al.* Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. *Biochem Pharmacol.* 2008;76(4):495-506. Doi:10.1016/j.bcp.2008.06.001
- Matias EEF, Santos KKA, Almeida TS, Costa JGM, Coutinho HDM. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC. *Latin Am J Pharm.* 2010;29(6):1049-1052.
- Matos FJA. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2ª Ed. Fortaleza: Edições UFC; 1997. 141 p.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Coube CS, Leitão SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res.* 2001;15(2):127-30.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, Fukada Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in phorbol ester 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(9):1331-1336. Doi:10.1016/j.bcp.2006.01.005
- NCCLS (National Committee For Clinical Laboratory Standards). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically.* 6ª ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standard M7-A6; 2003. p. 50-62.
- Passos OA, Raith M, Kuster RM, Rocha LM, Hamburger M, Potterat O. Metabolite profiling of the leaves of the Brazilian folk medicine *Sideroxylon obtusifolium*. *Planta Med.* 2012;78:703-710. Doi:10.1055/s-0031-1298269
- Oliveira JFP, Cipullo JP, Burdmann EA. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2006;21(4):444-452. Doi:10.1590/S0102-76382006000400015
- Pedrosa KM, Gomes DS, Lucena CM, Pereira DD, Silvano GS, Lucena RFP. Uso e disponibilidade local de *Sideroxylon obtusifolium* (Roem. & Schult.) T.D. Penn. (Quixabeira) em três regiões da depressão sertaneja da Paraíba, Nordeste do Brasil. *Bio Far.* 2012;12:158-183.
- Pereira AV, Almeida TC, Beltrame FL, Costa ME, Garrido LH. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto-*Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. *Acta Sci.* 2009;31(2):119-124. Doi:10.4025/actascihealthsci.v31i2.6233
- Pungeró V, Turull A, Queralt J. Arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) exert systemic effects when applied topically in the mouse. *Inflammation.* 1998;22(3):307-314. Doi:10.1023/A:1022352200273
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM Flower RJ. *Farmacologia.* 6 ed. São Paulo: Elsevier; 2007. 808 p.
- Silva MD. Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco. Recife. (Dissertação de mestrado). Pernambuco, Brasil: Programa de Pós-Graduação em Botânica-Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2008. p. 17-60.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento.* 5ª ed. Editora da UFSC: Santa Catarina; 2004. p. 1102.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuelaraventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999;299:152-178. Doi:10.1016/S0076-6879(99)99017-1.
- Soares SE. Phenolic acids as antioxidants. *Rev Nutr Campinas.* 2002;15(1):71-81.

- Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infect.* 2008;12(3):217-226.
- Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama, M. Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 1996;50(1):27-34. Doi:10.1111/j.2042-7158.1994.tb05709.x
- Tubaro A, Dri P, Delbello G, Zilli C, Della-Loggia R. The croton oil test revisited. *Agents Actions.* 1985;17:347-349.
- Vane JR, Warner TD. Nomenclature for COX-2 inhibitors. *Lancet.* 2000;356:1373-1374.
- Vattem DA, Shetty K. Biological functionality of ellagic acid: a review. *J Food Biochem.* 2005;29(3):234-266. Doi: 10.1111/j.1745-4514.2005.00031.x
- Veiga-Júnior VF. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn.* 2008;18(2):308-313. Doi:10.1590/S0102-695X2008000200027
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine.* 2009;16(2-3):97-110. Doi: 10.1016/j.fitote.2010.11.016
- Werz O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. *Planta Med.* 2007;73(13):1331-57. Doi:10.1055/s-2007-990242
- Wilmer JL, Burleson FG, Kayama F, Kauno J, Luster MI. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical - induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 1994;102(6):915-922. Doi:10.1111/1523-1747.ep12383512
- Woisky RG, Salatino A. Analysis os propolis: some parameters ond procedures for chemical quality control. *J Apicul Res.* 1998;37(2):99-105.
- Young JM, Spires DA, Bedord CJ, Wagner B, Ballaron S J, De Young LM. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J Invest Dermatol.* 1984;82:367-371.