
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Anacardium occidentale* Linn

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF *Anacardium occidentale* Linn

GALVÃO¹, Joab Nunes; ARAÚJO, Ana Carolina Justino de; MANGUEIRA, Carlos Everton Alves; PEREIRA, Erick Alves; RODRIGUES, Jéssica Tavares; PEREIRA, José Henrique Alves; CAVALCANTE, Monalisa Lima; BITU, Vanessa de Carvalho Nilo.

Centro Universitário Doutor Leão Sampaio - UNILEÃO

Recebido: 18/12/2017; Aceito: 10/01/2018; Publicado: 09/07/2018

RESUMO

O presente estudo buscou determinar a concentração inibitória mínima do extrato etanólico das folhas de *Anacardium occidentale* Linn e o seu efeito modulatório dos antibióticos aminoglicosídeos Amicacina e Gentamicina frente a cepas multirresistentes. O extrato etanólico foi obtido por maceração em etanol a 99% por 72 horas. Linhagens padrão e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* foram utilizados e a atividade antibacteriana foi estabelecida pelo método da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microplacas estéreis. A ação modulatória foi avaliada pelo método de contato direto utilizando os antibióticos amicacina e gentamicina e cepas multirresistentes das bactérias citadas anteriormente. Observou-se que apenas *Escherichia coli* ATCC 25922 foi sensível a ação do extrato na concentração inibitória mínima de 512 µg/mL, a concentração inibitória mínima dos antibióticos não foi modificada na presença do extrato etanólico frente às bactérias testadas. Portanto, o extrato das folhas de *Anacardium occidentale* Linn não possui atividade antibacteriana clinicamente relevante, visto que obteve-se um valor elevado de concentração inibitória mínima. O extrato também foi ineficaz em modular a ação dos antibióticos frente as cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Palavras-chave: *Anacardium occidentale* Linn. Plantas medicinais. Atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the minimum inhibitory concentration of the ethanolic extract of the leaves of *Anacardium occidentale* Linn and its modulatory effect of the aminoglycoside antibiotics Amicacin and Gentamicin against multiresistant strains. The ethanolic extract was obtained by maceration in 99% ethanol for 72 hours. Standard strains and clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* were used and antibacterial activity was established by the method of determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by sterile microplates. The modulatory action was evaluated by the direct contact method using the antibiotics amicacin and gentamicin and multiresistant strains of the bacteria previously mentioned. It was observed that only *Escherichia coli* ATCC 25922 was sensitive to the action of the extract at the minimum inhibitory concentration of 512 µg / mL, the minimum inhibitory concentration of the antibiotics was not modified in the presence of the ethanolic extract against the bacteria tested. Therefore, the extract of the leaves of *Anacardium occidentale* Linn does not have clinically relevant antibacterial activity, since a high value of minimum inhibitory concentration was obtained. The extract was also ineffective in modulating the action of antibiotics against the multiresistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*.

Keywords: *Anacardium occidentale* Linn. Medicinal plants. Antibacterial activity.

¹ Rua Rodrião Ferreira de Souza, 26 – Bairro Tiradentes – Juazeiro do Norte – CE, Email: joabnunesgalvao@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Anacardium occidentale Linn (*AnO*), é o nome científico dado ao cajueiro, sendo pertencente a família Anacardiaceae. Esse vegetal tem sido descrito há séculos como uma excelente fonte de propriedades medicinais. No Brasil, a ele tem sido associadas aplicações como analgésico, diurético, líquido para higiene bucal, tratamento de fraqueza orgânica, distúrbios respiratórios, gripe, bronquite, tosse, escorbuto infantil, eczema, infecções genitais, sarna, doenças de pele, verrugas e feridas.^{1 2} O mesmo é rico em vitamina C, como também em fibras, por isso é utilizado para o aumento da motilidade do trato gastrointestinal.³

Vendedores de plantas no Cariri Cearense comercializam o caju para fins medicinais, sendo o seu uso etnofarmacológico associado à retenção urinária, edema, inflamação, constipação, reumatismo, diabetes, cicatrização de feridas e hemorragias.⁴

O destaque de *AnO* como planta medicinal é devido principalmente à sua potente atividade antibacteriana e antiinflamatória dos seus metabólitos, principalmente os polifenóis tanino e flavonoides³, duas classes principais de metabólitos secundários responsáveis pelas ações farmacológicas do caju, planta esta que num estudo realizado por Santos (2011) foi observada a presença de taninos hidrolizáveis, fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, catequinas e alcaloides em Extrato Etanólico das folhas de *AnO* e taninos flobabênicos, fenóis, catequinas e alcaloides em extrato etanólico da casca de *AnO*.

Nesse aspecto, a análise das atividades antibacterianas baseadas nas práticas da medicina popular, tem sido o objeto de estudo de inúmeros trabalhos nos últimos tempos os de Gonçalves, Gobbo (2012); Hassan et al., (2016) e Araujo et al., (2016), principalmente como uma alternativa no que diz respeito ao controle da resistência bacteriana, dado que as plantas medicinais possuem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos.⁵

Diante disso, devido ao uso do cajueiro na medicina popular e a sua importância na economia do Brasil assim como mostra o estudo de Camilo (2015), em levantamento ao ITC - International Trade Centre - como um dos dez maiores exportadores da castanha do cajueiro no mundo. o estudo sobre suas atividades microbiológicas e o efeito modulador frente a antibióticos é cientificamente relevante, tendo em vista que atravessamos uma época em que a resistência bacteriana surge como uma grande ameaça ao futuro da humanidade. Que pode ter como causa o uso indiscriminado de antibióticos ou por causa natural pela habilidade da população bacteriana de se adaptar.

Desse modo, esse estudo observou o efeito antibacteriano do extrato etanólico de *Anacardium occidentale* Linn obtido a partir de suas folhas, frente a linhagens padrão e multirresistente de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, como também o efeito modulatório sobre antibióticos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina.

METODOLOGIA

COLETA DO MATERIAL

100 gramas de folhas de *Anacardium occidentale* Linn foram coletadas no município de Juazeiro do Norte - CE na latitude -7.2389499 e longitude -39.3000378 por volta das 08:00 do dia 15 de Setembro de 2016. Após a coleta, o material foi

encaminhado para identificação e classificação botânica e uma amostra foi utilizada para a preparação da exsiccata que ficou depositada no herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA) sob o número de tombo 12.156.

OBTENÇÃO DO EXTRATO

Para o presente estudo foi obtido o extrato etanólico das folhas de *Anacardium occidentale* (EEFAo), Essas folhas foram secadas e em seguida o produto adquirido foi pesado e colocado em 1000 mL de etanol a 99% por 72 horas. Em seguida o extrato obtido foi filtrado em gaze dobrada em quatro partes e processado no rota- evaporador a uma temperatura de 80 °C e rotação constante de 30 rpm. O extrato foi colocado em banho-maria para sua secagem total e a medida do peso bruto e rendimento que foi de 10,8%. Ao final desse processo, foram preparadas as soluções para o teste em concentrações de 10 mg/mL sendo dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e então foi realizado uma diluição em água destilada até a obtenção de uma concentração inicial de 1024 µg/mL.¹⁴

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico de *Anacardium occidentale* Linn, foi utilizado o método de microdiluição em caldo Brain Infusion Heart (BHI) usando um intervalo de concentrações 512 a 8 µg/mL com base no documento M7-A6 para bactérias.¹⁵

Na preparação do inóculo bacteriano, as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e multirresistentes *Staphylococcus aureus* 35, *Pseudomonas aeruginosa* 31 e *Escherichia coli* 27 foram primeiramente reavivadas em caldo BHI 3,8% durante 24 horas a 35° C ± 2° C. Em seguida, foi preparada uma suspensão bacteriana em BHI, observando-se a turvação similar ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland (1 x 10⁸ UFC/mL) em caldo BHI a 10%.

A solução do extrato preparada em concentração dobrada (1.024 µg/ mL)(I) em relação à concentração inicial definida em volumes de 100 µL foi diluída seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. A partir dessa preparação, foram utilizados 100 µL do meio distribuídos em cavidade de microplacas estéreis. Em cada cavidade contendo 100 µL do meio foi colocada uma amostra da suspensão bacteriana diluída na proporção de 1:10 resultando no inóculo final de 1 x 10⁵ UFC/mL.

Como controle negativo foi utilizado o caldo BHI, e para o controle positivo, o caldo BHI acrescido do inóculo bacteriano, pois para esse tipo de controle, depreende-se que deve haver crescimento bacteriano, dessa forma não foi utilizada nenhuma substância que pudesse inibir tal crescimento. Após todo esse procedimento feito em triplicata, as placas foram incubadas por 24 horas à 37 ± 2 °C.⁸ Posteriormente foi realizada a análise utilizando-se como revelador a resazurina sódica (SIGMA) que de acordo com a coloração indicou crescimento negativo os poços que permaneceram azuis e crescimento positivo indicado pela cor vermelha.⁹

AVALIAÇÃO DO EFEITO MODULADOR POR CONTATO DIRETO

Para a realização desse teste, foram utilizados os antibióticos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina. O mesmo método de microdiluição descrito acima foi empregado, utilizando concentrações subinibitórias de 512 a 8 µg/mL em BHI a 10%.

Foram utilizados 3 isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* 35, *Pseudomonas aeruginosa* 31 e *Escherichia coli* 27.

Na análise do EEFAo foi adicionado nos poços de microdiluição, os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina nas concentrações de 1024 µg/mL, pela sua especificidade na atuação da morte bacteriana de microrganismos Gram positivos ou negativos. As bactérias acima citadas e a solução contendo o extrato etanólico. Como controle negativo para o teste, foi adicionado em um dos poços de microdiluição, a solução contendo as cepas bacterianas e os antibióticos citados anteriormente. Ao final do processo as placas foram incubadas à 37 °C permanecendo por 24 horas, em seguida foram lidas utilizando-se o revelador resazurina sódica, semelhante à técnica descrita anteriormente para a leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na determinação da concentração inibitória mínima (CIM), o EEFAo, mostrou-se ineficaz para a maior parte das bactérias testadas.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (µg/mL) do extrato etanólico de *Anacardium occidentale* L.

Bactérias	CIM (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	512
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	≥ 1024
<i>Escherichia coli</i> 27	≥ 1024
<i>Staphylococcus aureus</i> 35	≥ 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 31	≥ 1024

Fonte: do autor (2016).

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (µg/mL) da amicacina e gentamicina na ausência e na presença do extrato etanólico de *Anacardium occidentale* Linn (EEAL).

	EC 27		SA 35		PA 31	
Antibióticos	CIM (µg/mL)	EEAL (1024 µg/mL)	CIM (µg/mL)	EEA L (1024 µg/mL)	CIM (µg/mL)	EEAL (1024 µg/mL)
Amicacina	256	256	128	128	≥ 1024	≥ 1024
Gentamicina	32	32	64	64	≥ 1024	≥ 1024

EC – *Escherichia coli*; SA – *Staphylococcus aureus*; PA – *Pseudomonas aeruginosa*.

Fonte: do autor (2016).

Conforme demonstrado na tabela 1, a ação do extrato etanólico das folhas de *Anacardium occidentale* Linn só pode ser observada frente a *Escherichia coli* ATCC 10536, onde houve inibição do crescimento bacteriano na concentração de 512 µg/mL. Diante desses resultados o extrato das folhas do cajueiro não possui uma atividade antibacteriana clinicamente significativa (128 µg/mL).

Na comparação com a atividade antibacteriana do extrato da castanha, estudado por Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) o respectivo produto mostrou uma atividade antibacteriana mais ampla, sendo eficaz contra *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e outros *Staphylococcus* spp. Coagulase negativo, porém *Escherichia coli* não apresentou sensibilidade.²¹

No entanto os resultados obtidos, se assemelham com o estudo realizado por Santos (2011) onde foram testados 6 cepas bacterianas onde ambos os trabalhos só apresentaram resultado para *Escherichia coli*, onde o extrato inibiu o crescimento da mesma na concentração de 512 µg/mL.¹¹ O microrganismo em questão trata-se de uma bactéria gram-negativa presente no trato gastrointestinal de animais de sangue quente. Dado também que é um dos principais agentes etiológicos que podem causar diarreia tanto em animais como em humanos. São comumente isoladas de fezes e são comensais, não causando doença em seus hospedeiros na maioria dos casos. Entretanto, cepas de *E. coli* não patogênicas presentes no intestino podem causar infecção, a depender do estado imunológico e das barreiras de proteção natural daquele que o microrganismo habita.¹²

Essa ação antibacteriana do EEFAo para *Escherichia coli*, provavelmente seja devido a presença de metabólitos secundários principalmente fenóis e taninos, pois num estudo fitoquímico realizado por Santos (2011) foram encontrados na folha do cajueiro a presença de taninos, fenóis, flavonoides, catequinas, flavononas, flavonóis, flavononóis, xantonas e alcaloides.¹¹

De acordo com Rodrigues et al., (2010); Silva et al., (2012) os taninos são empregados na medicina tradicional no tratamento de hipertensão arterial, reumatismo, feridas, antioxidante, anti-hemorragico, cicatrizante e anti-inflamatória.^{13,14} Já os fenóis, esses sim possuem segundo Brum et al. (2011); Costa (2012), um potencial de complexar as proteínas extracelulares da membrana bacteriana, sendo assim, esse último composto presente em vários estudo da literatura pode ser o responsável pela ação encontrada neste estudo.^{15,16}

No estudo da modulação com antibióticos aminoglicosídeos, o EEFAo não demonstrou nenhuma modificação na concentração inibitória mínima dos antibióticos frente as cepas bacterianas multiresistente de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, foi possível verificar que o extrato das folhas de EEFAo não possui atividade antibacteriana com relevância clínica. Haja vista que foi obtido um valor elevado na concentração inibitória mínima, não sendo este valor possível de se obter em modelos *in vivo*. Também foi observado a ineficácia do extrato em modular a ação dos antibióticos aminoglicosídeos, permanecendo estes com os mesmos valores de concentração inibitória mínima mesmo após a adição do extrato.

REFERÊNCIAS

1. GOIS, MAF et al. Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v. 18, n. 2, p. 547-557, 2016.
2. SILVA, J. G. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* L. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.4, p.572-577, 2007.
3. MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 732-741, 2009.
4. BITU, V. C. N. et al. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 265-272, 2015.
5. SANTOS, F. O. **Atividades biológicas de *Anacardium occidentale* (Linn)**. 2011. 57 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.
6. SOBRAL, J. F. et al. Estudo de toxicologia clínica de um fitoterápico obtido a partir do extrato etanólico bruto da casca de *Anacardium Occidentale* Linn, em voluntários saudáveis. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 65-74, 2010.
7. SANTOS, F. O. **Antibacterial Evaluation of *Anacardium occidentale* (Linn)**. Patos, PB: UFCG, 2011. 17 p. (Dissertation –Magister Science in Animal Science - Agroforestry systems in Semiarid).
8. ARAUJO, E. R. D. et al. Antimicrobial potential evaluation of hydroethanolic extracts of the species *Anacardium occidentale* Linn. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 28, p. 579-583, 2016.
9. HASSAN, Nor Ayshah Alia Ali et al. Antimicrobial potency of essential oil from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) clones. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 44, n. 1, p. 73-80, 2016.
10. GONÇALVES, G. M. S.; GOBBO, J. Antimicrobial effect of *Anacardium occidentale* extract and cosmetic formulation development. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 6, p. 843-850, 2012.
11. RISSATO, S.; ALMEIDA, M. V.; SILVA, L. C. Estudo do Óleo Essencial de *Eugenia uniflora* como Subsídio para Aplicação como Fitofármaco. **Salusvita**, v. 23, n. 2, p. 209-222, 2004.
12. CAMELO, Caeverton de Oliveira. Mercado internacional da amêndoa da castanha de caju: Um panorama de 2003 a 2012. 2015. Trabalho de conclusão de curso. Universidade de Brasília, curso de Agronomia e medicina veterinária Disponível em: <<http://bdm.unb.br/handle/10483/9620>> acessado em 26 de abril de 2018.
13. SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 13, p. 64-70, 2004.
14. FERRI, P.H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DISTASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996. p.129-56.
15. NCCLS- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically**. 6 ed. Wayne, PA: NCCLS Approved Standart M7-A6, 2003.
16. ANVISA, Metodologia dos Testes de Sensibilidade. a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada-Sexta Edição. 2003.
17. BRUNTON, Laurence L. et al. Goodman & Gilman: Manual de Farmacologia e Terapêutica: O Manual Portável do Melhor **Livro-Texto de Farmacologia do Mundo**. McGraw Hill Brasil, 2010.
18. BRUM, s. s.; et al. esterificação de ácidos graxos utilizando zircônia sulfatada e compósitos carvão ativado/zircônia sulfatada como catalisadores. **Química nova**. v. 34, p. 1511-1516, 2011.
19. DINIZ, A.M.M.; SANTOS, R.M.C. Escherichia Coli Resistente a Ciprofloxacina em Pacientes Internados em Hospital Universitário de Manaus. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Manaus, 2017.
20. COUTINHO, H. D. M. **Avaliação da Atividade Antibacteriana e Fotossensibilizante de Produtos Naturais da Região do Cariri Cearense**. 2008. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2008.
21. GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.
22. Brum, s. s.; et al. esterificação de ácidos graxos utilizando zircônia sulfatada e compósitos carvão ativado/zircônia sulfatada como catalisadores. **Química nova**. v. 34, p. 1511-1516, 2011.
23. Costa, c. s. comparative in vitro initial development of arundina graminifolia in three diferente culture medial. **Communications in plant sciences**, v. 2, p. 125-127, 2012.