
Análises toxicológicas e microbiológicas do extrato bruto seco das partes aéreas da *Borreria verticillata* L (vassoura-de-botão)

Toxicological and microbiological analysis of the dry crude extract of the aerial parts of Borreria verticillata L. (button broom)

Sara Batista Vasconcelos¹, Giovanna Gabrielly Alves da Silva Fraga¹, Arquimedes Fernandes Monteiro de Melo¹, Risonildo Pereira Cordeiro¹

¹Centro Universitário Tabosa de Almeida – ASCES / UNITA, Caruaru-PE, Brasil.

Resumo

Objetivo – Realizar um estudo de investigação microbiológica e toxicológica do extrato bruto seco das partes aéreas da *Borreria verticillata*. A *Borreria verticillata*, popularmente conhecida como vassourinha-de-botão, possui em suas partes aéreas uma grande variedade de metabólitos secundários, onde esses geram sua atividade antimicrobiana e toxicológica. **Métodos** – Trata-se de um estudo do tipo exploratório experimental laboratorial, onde obteve-se o EBS das partes aéreas a partir de maceração, sua atividade antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos foi testada através dos métodos de difusão em disco, determinando assim a Concentração Inibitória Mínima e a Concentração Inibitória Mínima de Aderência. Sua toxicidade foi avaliada frente a *Artemia Salina* Leach e através da fragilidade osmótica eritrocitária. **Resultados** – O EBS apresentou pouca toxicidade, além de mostrar ação frente a bactéria *Staphylococcus aureus*. **Conclusões** – Portanto, foi possível analisar que o EBS das partes aéreas da *B. verticillata* pode ser utilizado para a produção de novos medicamentos por exibir sensibilidade à alguns microrganismos e possuir pequena toxicidade, entretanto é necessária a realização de demais ensaios para confirmação dos resultados obtidos.

Descritores: Plantas medicinais; Toxicidade; Fitoterapia; Terapias complementares

Abstract

Objective – To carry out a study of microbiological and toxicological investigation of the dry crude extract of the aerial parts of *Borreria verticillata*. *Borreria verticillata*, popularly known as button-broom, has in its aerial parts a wide variety of secondary metabolites, where these generate their antimicrobial and toxicological activity. **Methods** – This is an exploratory laboratory experimental study, where EBS of aerial parts was obtained from maceration, its antimicrobial activity against pathogenic microorganisms was tested using disk diffusion methods, thus determining the Inhibitory Concentration Minimum and Minimum Inhibitory Adherence Concentration. Its toxicity was assessed against *Artemia Salina* Leach and through erythrocyte osmotic fragility. **Results** – EBS showed little toxicity, in addition to showing action against the bacterium *Staphylococcus aureus*. **Conclusions** – Therefore, it was possible to analyze that the EBS of the aerial parts of *B. verticillata* can be used for the production of new drugs because it exhibits sensitivity to some microorganisms and has little toxicity, however it is necessary to carry out other tests to confirm the results obtained.

Descriptors: Medicinal plants; Toxicity; Phytotherapy; Complementary therapies

Introdução

Desde as primícias da humanidade a serventia de plantas medicinais faz parte da rotina de muitas culturas. O homem primitivo, buscava na natureza, soluções para os males que o afrontava e assim, registros de uso de plantas medicinais foram encontrados nas civilizações mais antigas, por exemplo, registros feitos pelos egípcios e chineses desde 2500 anos a.C, sendo uma das práticas mais remotas utilizadas pelo homem para cura e tratamento de doenças¹.

Mesmo com o interesse das indústrias farmacêuticas e de centros de pesquisa por novas técnicas, os produtos derivados de plantas medicinais ainda permanecem como uma importante fonte para a obtenção de novas drogas e estruturas químicas. A *Borreria verticillata*, pertencente à família *Rubiaceae*, conhecida popularmente como vassourinha-de-botão, possui em suas partes aéreas uma grande variedade de metabólitos secundários, onde esses geram sua atividade antimicrobiana e toxicológica, sendo alvo de inúmeras pesquisas para a produção de novos medicamentos².

Ao contrário das drogas sintéticas, os antimicrobianos de origem vegetal têm um enorme potencial terapêutico, algumas cepas resistentes ou multirresistentes vem aparecendo continuamente, impondo a necessidade de busca permanente e desenvolvimento de novas drogas. Dessa forma, o artigo em questão busca a pesquisa científica sobre plantas medicinais, com a finalidade de realizar um estudo microbiológico e toxicológico do extrato bruto seco das partes aéreas da *Borreria verticillata*. A triagem antibacteriana in vitro, permite a verificação de propriedades potencialmente úteis para ser aplicadas em estudos químicos e farmacológicos adicionais, a partir de uma espécie que atende as necessidades locais, além de confirmar ou questionar os seus efeitos terapêuticos presentes na literatura.

Métodos

O presente estudo foi realizado nos laboratórios do Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita), na cidade de Caruaru-PE, no período de Fevereiro à Dezembro de dois mil e dezenove, apresentando

delineamento do tipo laboratorial experimental. A exsicata foi depositada no Instituto Agrônomo de Pernambuco – Dárdano de Andrade Lima, com número de tomo 92968.

Preparo do extrato bruto seco da *Borreria verticillata* (L.) G.Mey.

A droga vegetal foi colhida entre 7-9 horas da manhã, com a parte vegetal apresentando aspecto saudável. Foi pesada, lavada com água corrente limpa e seca com papel toalha. As partes aéreas da *B. verticillata* foram depositadas a sombra por um período de 24 horas, e em seguida colocada na estufa botânica à 40°C para completa secagem.

Posteriormente, o material seco foi triturado no moinho industrial e encaminhado à maceração com solução hidroalcoólica a 95% v/v durante 7 dias. Passado este período, a solução hidroalcoólica foi filtrada para obtenção do extrato bruto fluido. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo à temperatura de 60°C. Após a evaporação de 95% da solução, o extrato foi armazenado em um dessecador a vácuo e em uma estufa de ar circulante (B.O.D), alcançando a secura total, obtendo-se o extrato bruto seco (EBS) das partes aéreas.

Cálculo de rendimento do extrato bruto seco

O cálculo de rendimento do extrato bruto seco da *Borreria verticillata* será realizado através da equação:

Rendimento do EBS (%) = $\frac{\text{Peso obtido do EBS final}}{\text{Peso da droga vegetal fresca}} \times 100$

Onde, o rendimento do extrato bruto seco será determinado por uma relação entre o peso da droga vegetal fresca e o peso do EBS. Este último será dado em gramas pela subtração do becker contendo o extrato, ao final do processo, pelo peso do becker:

$\text{Peso do EBS (g)} = (\text{Becker} + \text{extrato bruto seco}) - \text{Becker}$

Determinação do material volátil e resíduo seco da droga vegetal

A amostra que será submetida à secagem em estufa aquecida a 40°C até atingir seu peso constante será pesada. Segundo a ANVISA (2008)³, a diferença entre a massa da amostra, antes e depois da secagem, revela a massa dos componentes da formulação que volatilizam ou não naquelas condições. O material remanescente é denominado resíduo seco. Dessa forma, os resultados numéricos expressos em porcentagem serão obtidos das equações:

Cálculo de materiais voláteis:

$\text{MV (\%)} = \frac{\text{Pf} - \text{Ps}}{\text{Pf}} \times 100$

Onde:

MV = materiais voláteis

Pf = peso do material vegetal fresco em gramas

Ps = peso do material vegetal seco em gramas

Cálculo do resíduo seco:

$\text{RS (\%)} = \frac{\text{Ps}}{\text{Pf}} \times 100$

Onde:

RS = resíduo seco

Ps = peso do material vegetal seco em gramas

Pf = peso do material vegetal fresco em gramas

Análise toxicológica: A determinação da CL₅₀ frente a *Artemia salina* Leach seguiu a metodologia descrita por Meyer et al.(1982)⁴. Já o estudo da fragilidade osmótica eritrocitária foi baseado na técnica descrita por Dacie e Lewis (1975)⁵.

Determinação da CL₅₀ frente à *Artemia salina* Leach

Os ovos de *A. salina* Leach foram incubados em solução marinha em um recipiente de plástico, o qual foi mantido sob iluminação artificial (lâmpada de 40W), temperatura constante de 28°C, por um período de 48 horas. Após este procedimento, se obteve o estágio de metanúplio, modelo padrão para testes de toxicidade devido a sua maior sensibilidade. Foram utilizados 50 mg do extrato bruto seco de *Borreria verticillata*, no qual foi utilizado 1 mL de Tween 80 a 5% para ajudar a solubilização do mesmo.

A solução foi homogeneizada e o volume completado para 5 mL com água salinizada a pH = 8,0. Destas soluções retirou-se alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50 e 25 µL que foram transferidas para tubos de ensaio que já continham 5 mL de solução salina, obtendo-se concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL para cada amostra. O teste foi feito em triplicata e as amostra foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas. Após esse período, foi realizada contagem do número de larvas vivas e mortas e os dados tabulados utilizando o programa Microcal Origin 4.1.

Estudo da fragilidade osmótica de eritrócitos

O teste de fragilidade osmótica de eritrócitos tem por objetivo mensurar a resistência dos glóbulos vermelhos à hemólise, frente a extratos de plantas⁶. O sangue de carneiro foi mantido sob refrigeração em recipiente com esferas, para evitar sua coagulação. Utilizou-se 50 mg do extrato bruto seco de *Borreria verticillata* diluídos com soro fisiológico a 0,9%, homogeneizados e o volume completado para 5 mL com soro fisiológico 0,9%. Dessas soluções retirou-se alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50 e 25 µL que foram transferidas para tubos de ensaio que já continham 5 mL de soro fisiológico 0,9%, obtendo-se as concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL e adicionou-se em todos os tubos 25 µL de sangue de carneiro.

Após isso, as amostras foram submetidas à centrifugação 3300 g durante 15 min em temperatura ambiente, após o processo, a absorbância do sobrenadante de cada tubo foi mensurada em espectrofotômetro bioplus 545 nm. A obtenção da curva do percentual de fragilidade osmótica se baseou no valor de absorbância da

hemoglobina do sobrenadante multiplicado pelo percentual total e dividido pelo valor de absorvância médio da hemólise completa dos eritrócitos.

Análise microbiológica: Foram utilizadas as cepas da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e do fungo *Leveduriforme Candida albicans* (ATCC 10231).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM): Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de *Borreria verticillata* foi realizada a técnica de poços, conforme metodologia determinada por Koneman et al. (2008). Foram preparados inóculos das respectivas cepas em solução salina a 0,9%, utilizando a escala Marc-Farland 0,5 para padronizar a turbidez do inóculo na solução. Com o auxílio do swab foi realizado o semeio em tapete por toda a extensão das placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton (para bactérias) e Ágar Sabouraud (para fungos). Em cada placa semeada quatro poços de 6 mm de diâmetro foram confeccionados, para a inserção de 150 µL do extrato em diferentes concentrações, a partir de diluições em 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 com relação à amostra inicial de cada extrato bruto seco da planta, sendo o procedimento realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior mensuração dos halos em milímetros (mm) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo esta entendida como a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA)

A avaliação da ação de menor concentração de extrato, em meio de enriquecimento com adição de dextrose, necessária para inibir a aderência dos microrganismos ao tubo do vidro, é denominada como Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA). A Concentração Inibitória Mínima de Aderência foi determinada usando-se concentrações 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 do extrato bruto seco, onde as cepas foram inoculadas a 37°C em caldo Müller-Hinton (DIFCO), em microaerofilia, por um período de 24 horas, sendo os tubos inclinados a 30°.

Potencial Inibitório (PI): O teste para triagem da atividade antimicrobiana e assim avaliação do potencial antimicrobiano das cepas é utilizado para observar a formação de halos ao redor dos poços contendo extrato da espécie em estudo e foi realizado conforme recomendações do National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS). Os microrganismos obtidos da suspensão realizada em solução salina 0,9% estéril foram semeados pela técnica em tapete nas placas de petri com ágar Mueller-Hinton. Foram feitos poços com 6 mm de diâmetro, os quais preenchidos com 150 µL das concentrações de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 de extrato. Posteriormente, as placas foram acondicionadas em estufa a temperatura de 37°C para crescimento bacteriano, durante 24 horas. O antibiótico controle utilizado

foi Cefalexina e o antifúngico foi o Fluconazol. Após crescimento, foi verificado se houve a formação de halo.

Análise estatística: As informações obtidas foram tratadas estatisticamente com o Microsoft® Office Excel 2013.

Resultados

Em relação a realização do Extrato Bruto Seco (EBS), ao final da técnica se obteve um peso de 8,57 g com um rendimento de 1,26%. Para o cálculo de materiais voláteis o resultado foi de 78,77%, já para a análise de resíduos secos foi de 21,23%. Esses cálculos determinam a diferença entre a massa da amostra antes e depois de algum processo de secagem, determinando a massa dos componentes que volatilizam ou não, e aquele material restante é denominado resíduo seco⁸.

Para a análise toxicológica por *Artemia salina* Leach foi utilizado 50 mg do EBS para determinação da CL₅₀. Foi observado um baixo número de mortes em todas as concentrações testadas da amostra, obtendo-se uma CL₅₀ 629,128 U_g/mL, dessa forma, a Vassoura-de-botão é classificada como pouco tóxica de acordo com a metodologia de Meyer (1982)⁴ reformulada em laboratório. Sobre a natatória das larvas testadas, foi observado que se apresentou lenta em relação às larvas do controle a partir da concentração de 100 µg/ mL.

Na análise toxicológica por meio da fragilidade osmótica eritrocitária foi avaliado uma hemólise de 14,24% na maior concentração, ou seja, de 1000 µg/mL, onde foi expresso em gráfico com o percentual de hemólise do extrato em estudo, apresentando como resultado pouco tóxico.

O extrato da *B. verticillata* apresentou ação inibitória nas concentrações testadas de 100%, 50% e 25% frente a cepas de *S. aureus*, entretanto, nas cepas de *C. albicans* não houve formação de halo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi de 25%, nas cepas de *S. aureus*, conforme tabela 1 e 2 abaixo:

Os resultados da concentração inibitória mínima de aderência indicaram que as cepas de *S. aureus* inibiram a formação de biofilmes, no entanto as cepas de *C. albicans* exibiram resultados inversos, como revela a tabela 3 a seguir:

Discussão

O constituinte majoritário da Vassoura de botão é a emetina e foi comprovado que a dose excessiva de emetina provoca, inicialmente, irritação da mucosa digestiva, náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e, posteriormente, depressão do sistema nervoso central, hipotensão, choque e óbito⁹. Todavia, de acordo com a metodologia de Meyer (1982)⁴, a Vassoura-de-botão foi classificada como pouco tóxica e esse resultado é ratificado em comparação ao estudo de Cherigo (2012)¹⁰, em que foi analisado a toxicidade do extrato da *Borreria verticillata* e foi observado que o valor da CL₅₀ foi de 672 ppm, logo, foi classificada como pouco tóxica.

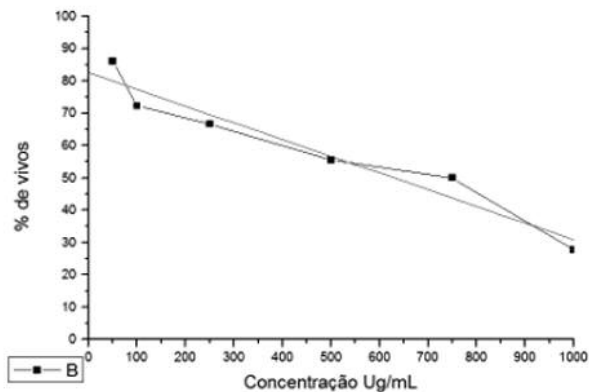


Gráfico 1. Gráfico linear da CL_{50} do EBS das partes aéreas de *Borreria verticillata*.

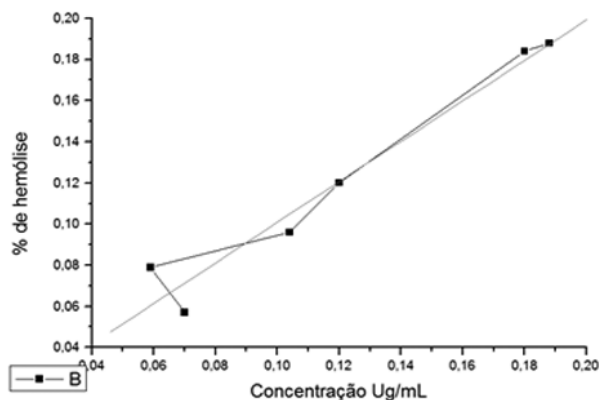


Gráfico 2. Gráfico linear da Fragilidade Osmótica do EBS das Partes aéreas de *Borreria verticillata*.

Tabela 1: Valores do diâmetro dos halos de inibição (mm) em relação ao potencial inibitório

| Fármaco | Diâmetro dos halos de inibição (mm) | | | |
|-------------|-------------------------------------|-----|-----|-------|
| | Concentração do fármaco (mg/mL) | | | |
| | 100% | 50% | 25% | 12,5% |
| Amoxicilina | 33 | 33 | 32 | 32 |
| Fluconazol | 33 | 22 | – | – |

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima do EBS das partes aéreas de *Borreria verticillata*

| Cepas | Diâmetro dos halos de inibição (mm) | | | |
|-------------------|-------------------------------------|-----|-----|-------|
| | Concentração do EBS (mg/mL) | | | |
| | 100% | 50% | 25% | 12,5% |
| <i>S.aureus</i> | 20 | 18 | 15 | – |
| <i>C.albicans</i> | – | – | – | – |

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima de Aderência do EBS das partes aéreas de *Borreria verticillata*

| Cepas | Concentração inibitória mínima de aderências | | | |
|-------------------|--|-----|-----|-------|
| | Concentração do EBS (mg/mL) | | | |
| | 100% | 50% | 25% | 12,5% |
| <i>S.aureus</i> | – | – | – | – |
| <i>C.albicans</i> | + | + | + | + |

* + *formou biofilme*

* – *não formou biofilme*

De acordo com Abdullahi-Gero et al (2014)¹¹ as doses letais medianas intraperitoneais e orais (DL₅₀) do extrato de folha de etanol de *B. verticillata* em ratos foram superiores a 5000 mg/kg de peso corporal. A DL₅₀ oral em camundongos também estava acima de 5000 mg/kg, enquanto que a DL₅₀ intraperitoneal em camundongos era de 3807,88 mg/kg de peso corporal. Isto sugere que o extrato é relativamente não tóxico por via oral e pode ser ligeiramente tóxico quando administrado por via intraperitoneal.

Em um estudo de Olukemi et al. (2002)¹² foi demonstrado a atividade antibacteriana do extrato vegetal de *B. verticillata* em comparação com a gentamicina, que é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos. Todavia, a eficácia deste produto vegetal no tratamento de infecções causadas por organismos suscetíveis em populações humanas ainda deve ser testada.

No estudo presente, a *B. verticillata* apresentou ação inibitória frente às cepas de *S. aureus*, o que corrobora com o estudo de Anele, Amlaby e Yashim (2014), em que o *S. aureus* foi suscetível ao extrato com uma inibição dose-dependente variando de 12,5 mm a 15 mm. Isso está de acordo com estudos que relataram que o extrato da folha de *Borreria verticillata* tem efeito inibitório sobre *S. aureus*, no qual a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato contra a bactéria foi de 25 mg/ml.

Conclusão

Os resultados obtidos expressam que o EBS da *Borreria verticillata* pode ser utilizado para a produção de novas formas farmacêuticas por apresentar baixa toxicidade e um bom espectro de ação frente alguns microrganismos, entretanto é necessário a realização de demais testes para o avanço no conhecimento do produto vegetal.

Agradecimentos

Agradecemos ao Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita) por disponibilizar as instalações e materiais necessários para a realização da pesquisa, assim como por proporcionar o apoio financeiro de Iniciação Científica ao projeto das graduandas Sara Batista Vasconcelos e Giovanna Gabrielly Alves da Silva Fraga. Gostaríamos de agradecer também a equipe do laboratório do Grupo de Pesquisa em Fitoterapia (GPFITO) que possibilitou que os resultados fossem alcançados.

Referências

1. Andrade SF, Cardoso LGV, Carvalho JCT, Bastos JK. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *J Ethnopharmacol.* 2007;109: 464-71.
2. Tenório-Souza F. H. Fitoquímica de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., *Borreria ocymoides* (Burm. f.) D.C. e *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) [tese de doutorado]. João Pessoa: Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Farmacoquímica do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba; 2013.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 2ª ed. Brasília; AN-VISA; 2008.
4. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982;45[s.n.]:31.
5. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Hematology*. 5th ed. London: Churchill Livingstone; 1975.
6. Rodrigues HG, Fonseca LC, Batista MTA, Aversi-Ferreira TA. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. *Biotemas.* 2009; 22(1).
7. Koneman EW, Allen S. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto e atlas, diagnóstico microbiológico*. São Paulo: Médica Panamericana; 2008.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos – Brasília: Anvisa; 2007.
9. Tokarnia CH, Dobereiner J, Peixoto PV. *Plantas Tóxicas de Interesse Pecuário*. In: *Plantas Tóxicas do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Helianthus; 2000.
10. Cherigo L, Lezcano J, Spadafora C, Martínez-Luis S.. Evaluation of phytotoxic, cytotoxic and antiparasitic *in vitro* activities of *Borreria verticillata*, a weed of Panamanian coffee crops. *Biosci Res.* 2012; 9(2): 82-6.
11. Abdullahi-Gero H, Ahmed A, Zezi A, Hussaini IM. Preliminary evaluation of ethanol leaf extract of *Borreria verticillata* Linn (Rubiaceae) for analgesic and anti-inflammatory effects. *J. Med. Plants Res.* 2014.
12. Olukemi MA, Kandakai-Olukem YT, Mawak JD. The Antibacterial activity of *Borreria verticillata*. *Nig. J Exptl. Appl.* 2002; 3(2): 153-7.
13. Anele EU, Amlabu WE, Yashim EY. Phytochemical screening and bacteriocidal activity of ethano flower extracts of *Borreria verticillata* and *Vocanga africana*. *Nigerian J Scient Res.* 2014;13(2).

Endereço para correspondência:

Sara Batista Vasconcelos
Rua Tracunhaém, 205 – Boa Vista
Caruaru-PE, CEP 55038-550
Brasil

E-mail: sarabatistav@gmail.com

Recebido em 5 de maio de 2020
Aceito em 12 de agosto de 2020