

POTENCIAL ANTIBIÓTICO DE EXTRATOS ALCOÓLICOS DE PLANTAS DA REGIÃO DA CAATINGA CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES.

Deyzi Caroline da Silva Barbosa¹; Maria Tereza dos Santos Correia²

¹Graduando do curso de Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: deyzi-caroline@hotmail.com,

²Docente/pesquisador do Departamento de Bioquímica- CCB –UFPE; E-mail: mtscorreia@gmail.com

Sumário: A resistência a agentes antibacterianos têm se tornado um importante problema global. Diante do potencial biotecnológico das plantas da Caatinga, este estudo buscou obter compostos de extratos alcoólicos com ação antimicrobiana contra bactérias multirresistentes. Foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos de oito plantas: *Byrsonima gardineriana*, *Dalbergia ecastophyllum*, *Erythoxylum revolutum*, *Lippia microphylla*, *Pilocarpus spicatus*, *Plyllanthus acuminatus*, *Zanthoxylum rhaifolium* e *Krameria tomentosa*. Frente às espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Na determinação do perfil fitoquímico foram encontrados: flavonoides, triterpenos, esteroides, derivados cinâmicos, saponinas, monoterpênos, sesquiterpenos, proantocianidinas e cumarinas. Para a CMI e CMB de uma maneira geral os melhores resultados foram obtidos para *S. aureus* com 0,39 mg/ml e 1,56 mg/ml, para os extratos *B. gardineriana* e *K. tomentosa*, respectivamente. Para determinação do efeito sinérgico foi utilizado o extrato que apresentou melhor CMI para cada bactéria em combinação com a clindamicina, sendo evidenciado efeito sinérgico e aditivo para a associação do extrato e clindamicina. Dessa forma, os resultados deste trabalho colaboram para obtenção de novos compostos com atividade antimicrobiana, além de sua contribuição para literatura e estimulação de novas pesquisas.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; caatinga; extratos alcoólicos.

INTRODUÇÃO

A caatinga possui uma grande variedade de espécies vegetais que incluem um número expressivo de táxons raros e endêmicos (FORZZA et al., 2014). Metabólitos secundários estão presentes em pequenas concentrações nas plantas e a maioria deles, estão envolvidos nos efeitos benéficos de plantas medicinais (CHATTERJEE, 2015).

As infecções hospitalares são reconhecidamente umas das principais causas de morbidade, mortalidade e aumento nos custos hospitalares. A resistência a agentes antibacterianos têm-se tornado um importante problema global, devido ao seu uso indiscriminado (SANTOS et al., 2015). Estudos têm indicado que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* são os representantes mais prevalentes de bactérias e leveduras, respectivamente (PAUDEL et al., 2014) Diante do potencial biotecnológico das plantas da Caatinga, este estudo buscou obter compostos de extratos alcoólicos com ação antimicrobiana contra bactérias multirresistentes.

MATERIAIS E METODOLOGIAS

Material vegetal e Preparação dos extratos para análise fitoquímica - os extratos (E) etanólicos de partes aéreas de *Byrsonima gardineriana* (EBg), *Dalbergia ecastophyllum* (EDe), *Erythoxylum revolutum* (EEr), *Lippia microphylla* (ELm), *Pilocarpus spicatus* (EPs), *Plyllanthus acuminatus* (EPa), *Zanthoxylum rhaifolium* (EZr) e metanólico de raiz de *Krameria tomentosa* (EKt) foram preparados com a farinha dos tecidos obtidos em

metanol e/ou etanol, 1:1 (p/v). As misturas foram filtradas em papel filtro, centrifugadas, evaporadas e submetidas à análise fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD) em placas de poliamida, empregando diferentes fases móveis e reveladores específicos (HARBONE, 1998; WAGNER; BLADT, 1996).

Atividade Antimicrobiana - avaliada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Mínima Bactericida (CMB), de acordo com Oliveira et al. (2012). Foram utilizados microrganismos pertencentes à coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA). *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414). Foram realizadas diluições seriadas em duplicata dos extratos, variando a concentração de 0,195 a 50 mg/ml. As placas incubadas por 24h a 37 °C. Solução de resazurina 0,01% (p/v) foi usada como indicador de crescimento bacteriano. As culturas foram semeadas em meio MHA para determinar a CMB (NCCLS, 2009).

Efeito Sinérgico - foi determinado pelo método de *Checkerboard* com adaptações. Neste ensaio, as amostras do extrato e antimicrobiano clindamicina (Cli), foram misturadas em diferentes concentrações. As interações foram interpretadas pelo Índice de concentração fracionada inibitória, calculado com a equação: $\Sigma FIC = CMICli/E:CMICli + CMIE/Cli:CMIE$ onde, $CMICli$ é a CMI da clindamicina, $CMIE$ é a CMI do extrato, $CMICli/E$ é a CMI da clindamicina em combinação com a CMI do extrato e $CMIE/Cli$ é a CMI do extrato em combinação com a CMI da clindamicina; cuja interpretação dos dados é: $\Sigma CIF \leq 0.5$: sinérgico; $0.5 < \Sigma CIF \leq 1$: aditivo; $1 < \Sigma CIF < 4$: sem interação e $\Sigma CIF \geq 4$: antagonismo (VAN VUUREN; VILJOEN, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise fitoquímica dos extratos foram encontrados: flavonoides, triterpenos, esteroides, derivados cinâmicos, saponinas, monoterpenos, sesquiterpenos, proantocianidinas e cumarinas. Observou-se que Triterpenos e esteroides foram encontrados em maior quantidade em todos os extratos, com exceção do EKt que apresentou apenas traços para esses dois metabólitos. Nenhum extrato apresentou quinonas.

Para análise da atividade antimicrobiana, verificou-se os extratos apresentaram atividade inibitória e bactericida para pelo menos uma das bactérias testadas com CMI variando de 0,39 mg/ml a 50 mg/ml e CMB variando de 1,56 a 50 mg/ml. Os melhores resultados foram aqueles obtidos com EBg e EKt para *S. aureus* com CMI de 0,39 mg/ml e CMB de 1,56 mg/ml, para ambos os extratos. Para *P. aeruginosa* o melhor resultado foi com o EBg; ELM foi o único extrato que apresentou resultado positivo para *S. enteritidis*; enquanto apenas dois extratos foram positivos para *K. pneumoniae*, (ELm e EPa), e para *E. coli* o extrato que apresentou a melhor CMI e CMB foram o EKt e ELM, respectivamente (Tabela 1).

Os resultados obtidos das CMI para *S. aureus* de todos os extratos, com exceção do extrato de *P. acuminatus* foram promissores uma vez que, foram superiores aos citados na literatura para algumas plantas tais como *Vismia guianensis* e *Symphonia globulifera* cujos extratos apresentaram uma CMI de 31,25 mg/ml (ARAÚJO, 2010). Neste trabalho, o extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* apresentou melhor CMI quando comparado com a obtida para o extrato hidroalcoólico de *Ilex paraguariensis* CMI de 100 mg/ml (BIASI, 2007).

Para o sinérgico determinou-se a CMI de 66,25 µg/ml de Cli para as bactérias *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, porém, não foi possível determinar a CMI de Cli para *K. pneumoniae* e *S. enteritidis*, em concentrações que variaram de 0,06625 a 16,384 mg/ml, portanto estas bactérias não foram utilizadas no teste.

Tabela 1- Atividade antimicrobiana dos extratos de plantas da Caatinga

Extrato	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>E. coli</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
	mg/ml									
EBg	0,39	1,56	3,13	6,25	-	-	-	-	12,50	-
EDe	0,78	3,12	6,25	12,5	-	-	-	-	50,00	-
EEr	1,56	3,13	25,00	-	-	-	-	-	ND	ND
EKt	0,39	1,56	ND	ND	-	-	-	-	6,25	50,00
ELm	1,56	3,13	25,00	-	6,25	6,25	3,13	3,13	12,50	12,50
Eps	6,25	12,50	ND	ND	-	-	-	-	12,50	50,00
EPa	50,00	50,00	25,00	-	-	-	1,56	1,56	50,00	50,00
EZr	12,50	12,50	25,00	-	-	-	-	-	50,00	50,00

Extratos de: *Byrsonima gardineriana* (EBg); *Dalbergia ecastophyllum* (EDe); *Erythroxylum revolutum* (EEr); *Krameria tomentosa* (EKt); *Lippia microphylla* (ELm); *Pilocarpus spicatus* (EPs); *Phyllanthus acuminatus* (EPa) e *Zanthoxylum rhaiifolium* (EZr).

CMI = Concentração Mínima Inibitória, CMB = Concentração Mínima Bactericida.

S. aureus = *Staphylococcus aureus*; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *S. enteritidis* = *Salmonella enteritidis*; *K. pneumoniae* = *Klebsiella pneumoniae*; *E. coli* = *Escherichia coli*.

- = Não houve inibição; ND = Não Determinado.

A combinação do antimicrobiano (Cli) e cada extrato na proporção de 1:2 (v/v) respectivamente, em MHC para um volume final 200 µl, segundo as normas do CLSI (2012). A concentração de Cli em combinação com o extrato foi de 0,00004 a 0,011 mg/ml. O extrato com melhor CMI, foi EBg, para as espécies *S. aureus* e *P. aeruginosa*, cujas concentrações, quando associadas com Cli, variaram de 0,0015 a 0,39 mg/ml e 0,012 a 3,13 mg/ml respectivamente. Para *E. coli* o EKt apresentou a melhor CMI e, suas concentrações variaram de 0,024 a 6,25 mg/ml.

Tabela 2. Índice de concentração inibitória fracionada para espécies bacterianas multiressistentes e interação entre clindamicina e extratos

Bactéria	CIF	Interação
	mg/ml	
<i>S. aureus</i>	0,000041	Sinergismo
<i>P. aeruginosa</i>	0,000123	Sinergismo
<i>E. coli</i>	0,007000	Aditivo

CIF = Índice de Concentração Inibitória Fracionada.

S. aureus = *Staphylococcus aureus*; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*; *E. coli* = *Escherichia coli*.

A associação de antimicrobiano com extratos alcoólicos demonstrou interação sinérgica para *S. aureus* e *P. aeruginosa*, enquanto que, para *E. coli* a interação foi classificada como aditiva (**Tabela 2**). De acordo com a literatura Silva et al. (2013), os extratos de *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* e *Pityrocarpa moniliformis* quando associado à eritromicina apresentaram potencial sinérgico para *S. aureus*, outro estudo com extrato de *Indigofera suffruticosa*, também apresentou efeito sinérgico quando combinado a eritromicina contra *S. aureus* (BEZERRA et al. 2015). Demonstrando que a combinação de antimicrobianos com produtos naturais pode ser uma estratégia terapêutica.

CONCLUSÕES

Em conclusão, o estudo demonstrou que os extratos alcoólicos das plantas avaliadas têm ação antimicrobiana frente às bactérias testadas. A combinação de Cli com EBg e EKt apresentando interação sinérgica e aditiva, respectivamente, demonstra o potencial antimicrobiano destas duas plantas. A pesquisa de produtos naturais com potencial terapêutico é de grande importância e a possibilidade de associação terapêutica, pode sugerir pesquisas futuras.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo investimento e financiamento da bolsa. A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

REFERÊNCIAS

- FORZZA, C.R. et al. **Bromeliaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 26 ago. 2015.
- CHATTERJEE, Shyam Sunder. **From covalent bonds to eco-physiological pharmacology of secondary plant metabolites**. Karlsruhe, Germany: *Biochemical Pharmacology*, 2015. 9 p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.07.037>>. Acesso em: 17 ago. 2015.
- SANTOS, Ana Thereza Bezerra dos et al. **Organic extracts from Indigofera suffruticosa leaves have antimicrobial and synergic actions with erythromycin against Staphylococcus aureus**. 6. ed. Recife, Brazil: *Frontiers In Microbiology*, 2015.
- PAUDEL, Babita et al. **Estimation of antioxidant, antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of plants collected from Oymyakon region of the Republic of Sakha (Yakutia), Russia**. (Yakutia), Russia: *Biological Research*, 2014.
- HARBONE, J.B. **Phytochemical Methods**. 3. ed. Londres: Chapman & Hall, 1998.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis- A thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Munich: Springer, 1996.
- OLIVEIRA, Ygor Lucena Cabral de et al. **Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of Buchenavia tetraphylla (Aubl.) R. A. Howard (Combretaceae: Combretaceae)**. Recife, Brazil: *The Scientific World Journal*, 2012. 6 p.
- NCCLS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard-second edition M27-A2.**, Wayne, USA: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, 2009.
- VAN VUUREN, Sandy; VILJOEN, Alvaro. **Plant-Based Antimicrobial Studies – Methods and Approaches to Study the Interaction between Natural Products**. South Africa: *Planta Medica*, 2011.
- ARAÚJO, Núbia Rafaela Ribeiro. **Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismo relacionados à lesão de mucosite oral**. Belém - PA: Universidade Federal do Pará. Dissertação de mestrado, 2010.
- BIASI, Bruno de; GRAZZIOTIN, Neiva A.; J, Arno E. Hofmann. **Atividade antimicrobiana dos extratos de folhas e ramos de Ilex paraguariensis A. St.-Hil., Aquifoliaceae**. Erechim-rs, Brasil: *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2009.
- CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty- Second Informational Supplement**. USA: *Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S22*, Vol. 32, 2012.
- SILVA, Luís Cláudio Nascimento da et al. **Evaluation of combinatory effects of Anadenanthera colubrina, Libidibia ferrea and Pityrocarpa moniliformis fruits**



extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. 7. ed. Pernambuco, Brazil: Journal Of Medicinal Plants Research, 2013.