

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS METANÓLICOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Erythroxyllum*, PROVENIENTES DO BIOMA CAATINGA

Darlyson Tavares Guimarães¹; Luana Camilla Cordeiro Braz²; Franklin Ferreira de Farias Nóbrega³

¹*Universidade Federal de Campina Grande, CDSA. Email: darlysonguimaraes@outlook.com*

²*Universidade Federal de Campina Grande, CDSA. Email: luana.camilla.braz@gmail.com*

³*Universidade Federal de Campina Grande, CDSA. Email: franklinnobrega@yahoo.com.br*

Resumo: A combinação de avanços no estudo químico e farmacológico das plantas fez aumentar o interesse mundial pelos fitoterápicos. Nesta perspectiva, observa-se uma importância crescente do estudo de plantas, objetivando fins terapêuticos, aliados a uma boa aceitabilidade destes produtos no mercado farmacêutico. O estudo das plantas medicinais com finalidade terapêutica tem contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos importantes. Portanto, percebendo o potencial farmacológico e a ocorrência de muitas espécies do gênero *Erythroxyllum* sendo cultivadas na Paraíba, optou-se pelo estudo farmacológico de algumas dessas, cujos potenciais farmacocômicos ainda não são conhecidos, fato que poderá conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas. A integração da bioprospecção e da farmacologia é uma importante estratégia para a inovação biotecnológica. Nesse contexto, esta pesquisa avaliou a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de espécies do gênero *Erythroxyllum*, através da técnica de diluição em microplacas. Os resultados mostraram que os extratos utilizados possuem potencial farmacológico antibacteriano e antifúngico, contribuindo, dessa forma, para o surgimento de uma opção terapêutica frente a linhagens de micro-organismos de importância clínica, um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento.

Palavras-chave: Antibióticos, Bioprospecção, Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

As plantas são mundialmente empregadas na medicina popular e apesar do uso indiscriminado das mesmas, até hoje são escassos os estudos sobre as suas constituições químicas e atividades biológicas (MORAES, 2006).

A região brasileira que apresenta clima semiárido tem como vegetação predominante a Caatinga, e nesta são encontradas inúmeras espécies vegetais com grandes potenciais bioquímicos e farmacológicos. Diante dessa vasta biodiversidade e da necessidade da descoberta de novas moléculas bioativas, é de fundamental importância o estudo farmacológico da flora dessa região, ainda pouco estudada sob esse aspecto.

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem as agressões do meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais que agem como antioxidantes e coenzimas, além de muitas outras (WILLIAMS, 2001).

Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresentam grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de micro-organismos. Estes agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática, seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (GONÇALVES et al., 2005).

Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química, entre outras. A atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos vegetais, dada a importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem o homem (MORAES, 2006).

Nos últimos anos, a resistência de micro-organismos patogênicos a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, comumente comercializados e usados no tratamento de doenças infecciosas. Essa situação tem forçado os cientistas à busca de novas drogas. Os vegetais são uma excelente fonte de busca de novas drogas antimicrobianas, tendo em vista que a diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese química (NOVAIS et al., 2003).

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre diversos micro-organismos patogênicos, estudos buscam pelo ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor índice de resistência bacteriana, haja vista que já existe resistência bacteriana a alguns produtos antimicrobianos (LÔBO et al., 2010). A atividade antimicrobiana desejada pode ser encontrada em espécies de plantas da Caatinga, já que esta se apresenta altamente diversificada em espécies que na maioria ainda não foi pesquisada cientificamente quanto à ação antimicrobiana.

Nesse cenário, temos as espécies do gênero *Erythroxylum*, que caracterizam-se pela presença de alcaloides do grupo tropano, dentre os quais se destaca a cocaína, um alcaloide natural produzido por *E. coca* Lam, que foi empregado como anestésico local em pequenas cirurgias (GRIFFIN; LIN, 2000). Estas espécies podem ser empregadas no estudo e pesquisa de fármacos com atividade antitumoral. Uma vez que, nove alcaloides tropanos foram isolados a partir das raízes de *Erythroxylum pervillei*, em seguida, avaliados quanto a atividade antitumoral, com os resultados, observou que seis destes alcaloides apresentaram atividade em células tumorais do tipo KB-V1 (SILVA et al., 2001).

Estudos realizados com outras espécies de *Erythroxylum* coletadas na Paraíba mostraram a presença de substâncias isoladas e de extratos com potencial farmacológico. O estudo fitoquímico do caule de *Erythroxylum caatingae*, espécie exclusiva da região nordeste, resultou no isolamento e identificação estrutural de três alcaloides tropanos (OLIVEIRA, 2008). Outra espécie presente na região da Paraíba, a *Erythroxylum pungens*, rico em alcaloides tropanos, apresentou atividade anti-hipertensiva, pois provocou relaxamento de vasos, reduzindo a concentração de cálcio intracelular em células vasculares do músculo liso de ratos (OLIVEIRA, 2012).

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Percebendo-se o potencial farmacológico e a importância do gênero, bem como, a ocorrência de muitas espécies de *Erythroxylum* encontradas na Paraíba, optou-se pelo estudo de algumas espécies desse gênero, cujos estudos químicos e farmacológicos ainda não são conhecidos, fato que poderá conduzir à descoberta de novas fontes de substâncias naturais ativas.

Assim, tendo em vista que a resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana e que, por este motivo, é preciso sempre a busca de novas fontes terapêuticas que sejam mais eficientes para o tratamento de infecções, o objetivo deste trabalho é contribuir para o desenvolvimento de um novo biofármaco de

origem vegetal através do estudo farmacológico de espécies do gênero *Erythroxylum* da Paraíba, fazendo uso de metodologias específicas, e avaliar a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos de espécies do gênero *Erythroxylum* frente a linhagens de micro-organismos de importância clínica, incluindo bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas que representam bactérias ácido resistente.

METODOLOGIA

Material vegetal

Foram preparados e fornecidos pelo Laboratório de Fitoquímica Experimental do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, que tem como Coordenador o Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, os extratos das espécies: *Erythroxylum caatinagae* (ECAA), *Erythroxylum revolutum* (EREV), *Erythroxylum simonis* (ESIM), *Erythroxylum paufferrense* (EPAU) e *Erythroxylum pulchrum* (EPUL). Esses extratos foram obtidos a partir do pó do caule seco e pulverizado, submetido à maceração exaustiva com metano (MeOH) durante 72 horas. O processo foi repetido 4 vezes e a solução extraída e concentrada em rotavapor sob pressão reduzida a temperatura de 35°C, assim obtendo-se o extrato metanólico bruto.

Linhagens de micro-organismos

As dez linhagens bacterianas utilizadas foram: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 18739, *Escherichia coli* ATCC 9097, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Streptococcus*. Todas são CEPAS selvagens e provenientes do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Padronização da suspensão bacteriana

As cepas bacterianas foram repicadas do estoque para tubos contendo meio Mueller Hinton (MH) e incubadas durante 24 horas a 37 °C. Foram retiradas de 3 a 5 colônias dessa cultura e transferidas para tubos de ensaio contendo solução salina estéril até obter-se

turvação equivalente ao valor 0,5 da escala de McFarland, o que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mL).

Preparo das soluções contendo substâncias de referência para os controles negativo e positivo

O controle negativo é a solução contendo DMSO e meio BHI, onde se espera que seja observado a presença de células bacterianas vivas. O DMSO (Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo) é um composto muito usado como solvente aprótico e polar em laboratório e na indústria. O caldo BHI (brain heart infusion) é um meio de cultura utilizado para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos. De coloração original amarela e límpida a turvação do BHI é indicativo de crescimento bacteriano. É composto por nutrientes de cérebro e coração de gado, peptona e dextrose.

O controle positivo é a solução contendo antibiótico e água destilada, onde espera-se que seja observado a ausência de células bacterianas vivas. Utilizou-se a tetraciclina (500 mg), a ciprofloxacina (500 mg) e cetoconazol (200 mg), pois são antibióticos ativos contra um grande número de bactérias Gram positivas ou Gram Negativas e fungos.

A tetraciclina foi utilizada como controle para: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538e *Streptococcus*. Preparou-se uma solução de 125mg em 5mL (Solução A: 125mg de tetraciclina em 5mL de água destilada), e em seguida esta solução foi diluída 1/100 em água destilada (Solução B: 0,1 mL da solução A em 10mL de água destilada), e por fim a solução B foi diluída 1/10 em caldo Brain Heart Infusion (BHI), obtendo-se um valor final de 0,5 mL da solução B para 4,5mL de caldo BHI, totalizando uma solução final de 5mL, a ser utilizada a cada duas microplacas.

A ciprofloxacina foi utilizada como controle para: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 18739 e *Escherichia coli* ATCC 9097. Preparou-se uma solução de 250 mg em 5 mL (Solução A: 250mg de ciprofloxacina em 5 mL de água destilada), e em seguida esta solução foi diluída 1/100 em água destilada (Solução B: 0,1 mL da solução A em 10mL de água destilada), e por fim a solução B foi diluída 1/10 em caldo Brain Heart Infusion (BHI), obtendo-se um valor final de 0,5 mL da solução B para 4,5mL de caldo BHI. Todo esse procedimento foi realizado para utilização a cada duas microplacas.

Técnica de Microdiluição

Os extratos vegetais foram preparados em solução-estoque de 1000µg/mL em Caldo BHI e adicionado 5% de DMSO. Aos orifícios das microplacas das linhas de B a F das colunas de 1 a 10 foram adicionados 100µL de BHI. A seguir, aos orifícios da linha A da coluna 1 a 10 serão adicionados 200µL da solução estoque dos extratos vegetais, sendo esse processo realizado em duplicata, da seguinte forma: aos orifícios A1 e A2 adicionou-se extrato de ECAA, aos orifícios A3 e A4 adicionou-se extrato de EREV, aos orifícios A5 e A6 adicionou-se extrato de EPAU, aos A7 e A8 adicionou-se extrato de ESIM e aos orifícios A9 e A10 adicionou-se extrato de EPUL. Após a homogeneização, 100µL das misturas contidas nos orifícios da linha A, das colunas de 1 a 10, serão transferidos para a linha B nas colunas de 1 a 10, respectivamente, e assim sucessivamente até a linha F, que após homogeneização serão retirados e desprezados 100µL. Dessa maneira será obtido um volume final de 100µL nesses orifícios da microplaca com as concentrações finais dos extratos vegetais de 1000; 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 µg/mL (orifícios controle dos extratos).

Nos orifícios da linha G de 1 a 10 foram adicionados 100µL da solução de DMSO e caldo BHI (controle negativo), e aos orifícios da linha H de 1 a 10 serão adicionados 100µL da solução contendo o antibiótico(controle positivo). Posteriormente, serão adicionados 10µL da suspensão bacteriana ou fúngica de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em cada orifício da microplaca. Em seguida as microplacas referente as bactérias foram incubadas a 37° C por 24 horas, e as referentes a fungos a 37°C por 72 horas.

Após este período de incubação, a cada orifício da microplaca adicionou-se 20µL de resazurina, um corante (fenoxazin-3-ona) indicador de oxido-redução, que tem sido utilizado para avaliar a viabilidade e contaminação bacteriana e para testar a atividade antimicrobiana. (PALOMINO et al., 2002 e MONTEJANO, 2005 apud MORAES, 2006). Em seguida, as microplacas foram colocadas em agitação orbital por 1 hora para posterior avaliação dos resultados.

Todo esse procedimento foi realizado, igualmente, para dez microplacas distintas, sendo cinco delas para bactérias gram-negativas e cinco para bactérias gram-positivas. Cada extrato foi testado em duplicata na mesma microplaca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inibição do crescimento bacteriano é evidenciada pela ausência de crescimento no meio. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rosa como presença de crescimento bacteriano. A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi definida como a menor concentração de extrato vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas, ou seja, a menor concentração de extrato vegetal capaz de impedir a mudança de cor de azul para rosa.

Em todas as microplacas, as colunas 1 e 2 representam os extratos da espécie ECAA, 3 e 4 representam os extratos de EREV, 5 e 6 representam EPAU, 7 e 8 representam ESIM e 9 e 10 representam os extratos de EPUL. Após todo o processo de microdiluição e adição do corante resazurina, tivemos os resultados abaixo:

Para bactérias gram-positivas

Na figura 1A podemos observar que a espécie ECAA (colunas 1 e 2) inibiu o crescimento bacteriano em todas as concentrações utilizadas, logo foi o extrato que apresentou melhor potencial antibacteriano, tendo uma CIM de 31,25 µg/mL. As espécies EREV (colunas 3 e 4), EPAU (colunas 5 e 6) e ESIM (colunas 7 e 8), apresentaram potencial antibacteriano apenas para a concentração inicial, tendo uma CIM de 1000 µg/mL. Já os extratos da espécie EPUL (colunas 9 e 10) apresentaram potencial antibacteriano para as duas primeiras concentrações, logo sua CIM é 500 µg/mL, respectivamente. Com relação aos controles negativo (linha G) e positivo (linha H), os resultados foram os esperados, já que para o negativo, contendo DMSO e BHI, as células bacterianas cresceram, evidenciando a cor rosa, e para o positivo, contendo o antibiótico tetraciclina, as células não cresceram, evidenciando a cor azul.

Na figura 1B observa-se que o extrato de ECAA inibiu o crescimento bacteriano nas duas primeiras concentrações, apresentando uma CIM de 500 µg/mL. A espécie EREV impediu o crescimento celular para três concentrações, sendo o extrato com melhor resultado para esta bactéria, com uma CIM de 250 µg/mL. Os demais extratos não apresentaram CIM. Os controles negativo e positivo foram os esperados.

Na figura 1C os extratos vegetais de ECAA e EREV apresentaram CIM de 1000 µg/mL, já que inibiram o crescimento apenas para a primeira concentração. Já os extratos de EPAU, ESIM e EPUL não apresentaram CIM. No controle positivo, contendo a tetraciclina, observou-se o resultado esperado.

Na figura 1D o único extrato que inibiu o crescimento bacteriano foi o de EREV, com uma CIM de 1000 µg/mL. O controle positivo apresentou o resultado esperado e o negativo não mudou para a coloração rosa.

Na figura 1E nenhum dos extratos vegetais utilizados apresentou CIM para a bactéria. O controle negativo obteve o resultado esperado, enquanto o positivo não permaneceu na coloração azul, evidenciando o crescimento bacteriano, possivelmente devido ao microorganismo em questão (*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), já que ainda na década de 50 foram isolados *S. aureus* resistentes a eritromicina, tetraciclina e estreptomicina, dificultando assim o tratamento de infecções. (TONDO et al, 2008).

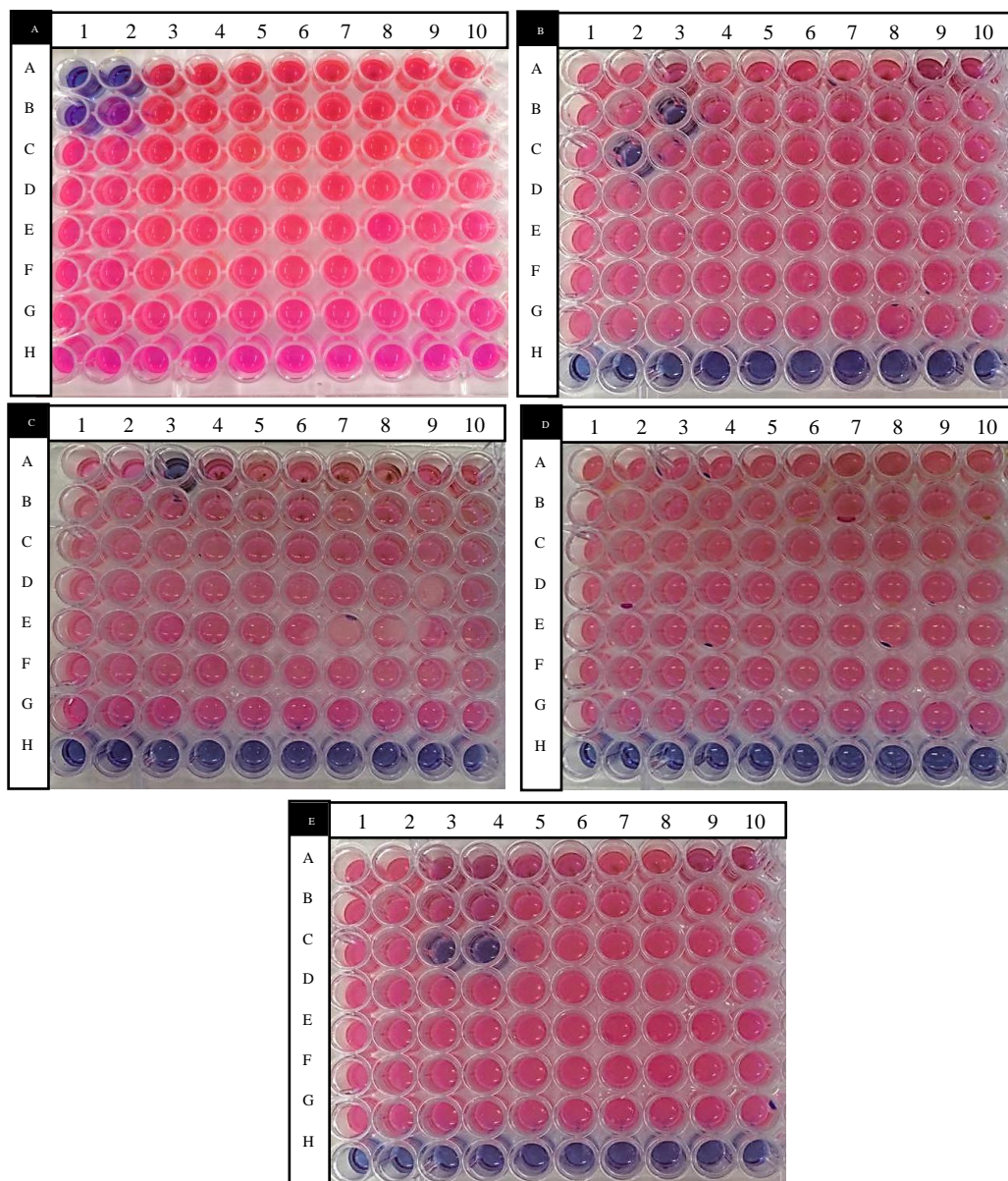


Figura 1 - Resultados das colorações obtidas após adição de resazurina na microplaca contendo o microorganismo: A) *Staphylococcus aureus*. B) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. C) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. D) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. E) *Streptococcus*.

Para bactérias gram-negativas

Na figura 6, observamos que o único extrato que apresentou potencial inibitório foi o de ECAA (colunas 1 e 2), para as duas primeiras concentrações, tendo assim uma CIM de 500 µg/mL. Com relação ao controle negativo (linha G) e positivo (linha H), os resultados foram os esperados, devido a *Pseudomonas aeruginosa* ter como característica marcante e preocupante a resistência cruzada aos antimicrobianos, que resulta da co-resistência, ou seja, da presença de múltiplos mecanismos de resistência num único hospedeiro levando à resistência a múltiplos fármacos. (FIGUEIREDO et al, 2007). Sendo assim, percebemos que os extratos de ECAA apresentaram potencial antibacteriano mais elevado que a própria tetraciclina.

Na figura 7 podemos perceber que nenhum dos extratos vegetais apresentou CIM para a bactéria utilizada. Apenas dois orifícios da microplaca (um de ECAA e outro de EREV) permaneceram na cor azul, possivelmente por algum erro durante o experimento. Quanto aos controles positivo e negativo, estes apresentaram os resultados que eram esperados.

Na figura 8 apenas uma coluna do extrato vegetal EREV apresentou CIM de 1000 µg/mL, o que pode ser levado em consideração, apesar da outra coluna não ter mostrado o mesmo efeito na mudança de cor. Os demais extratos não apresentaram potencial inibitório para as células bacterianas utilizadas. Os controles positivo e negativo também apresentaram os resultados desejados.

Na figura 9 nenhum dos extratos apresentou CIM e os controles também demonstraram os resultados esperados.

Na figura 10, apesar da terceira linha do extrato EREV, que corresponde a concentração de 250 µg/mL, ter indicado a ausência de células bacterianas vivas, deve ser desconsiderado, já que para as maiores concentrações desse mesmo extrato os resultados foram diferentes. Assim, nenhum dos extratos apresentou CIM. Os controles demonstraram os resultados esperados.

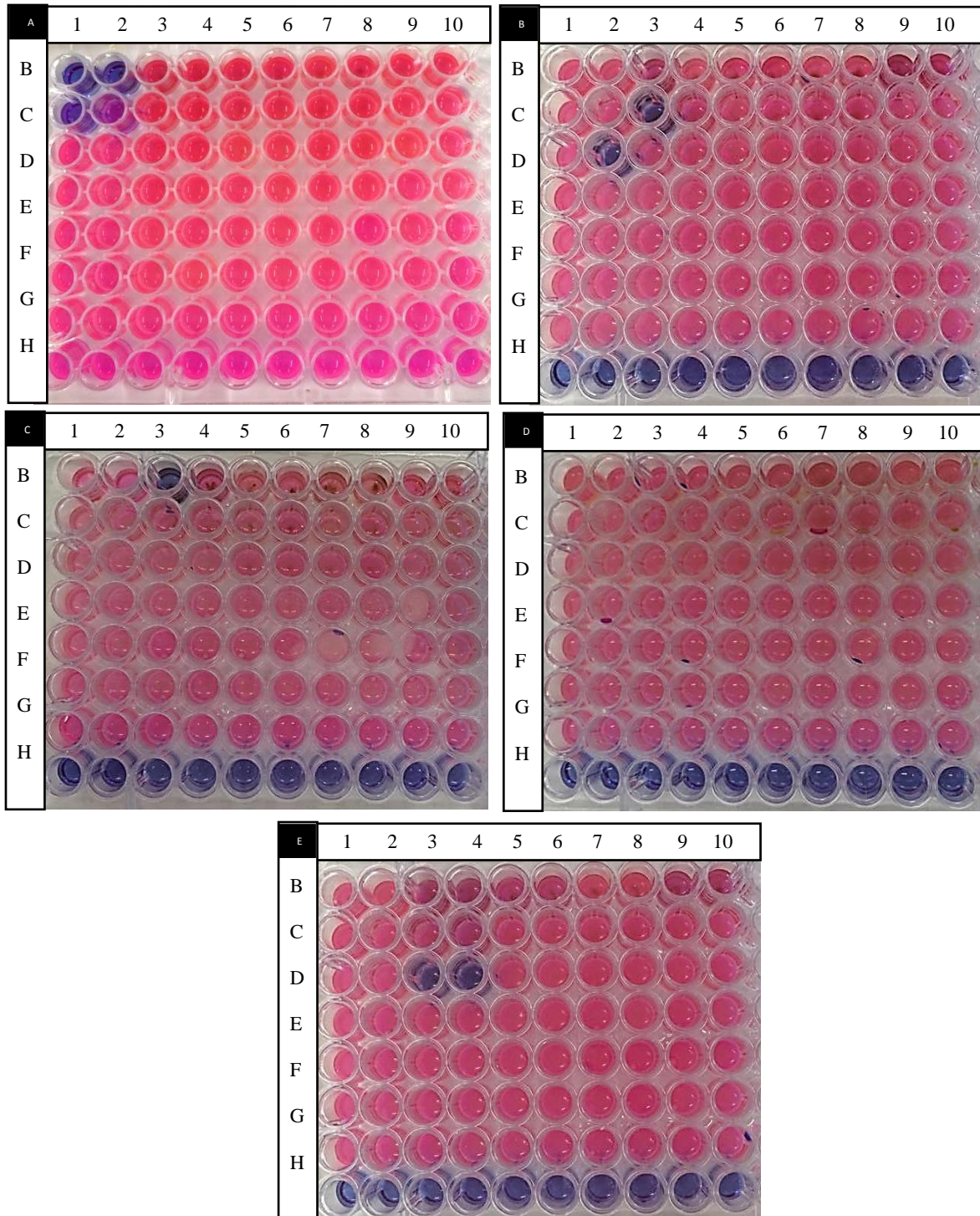


Figura 2 - Resultados das colorações obtidas após adição de resazurina na microplaca contendo o micro-organismo: A) *Pseudomonas aeruginosa*. B) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6538. C) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853. D) *Escherichia coli* ATCC 18739. E) *Escherichia coli* ATCC 9097.

CONCLUSÃO

A técnica de diluição em microplacas utilizando a resazurina mostrou-se reprodutível, de fácil interpretação dos resultados e de fácil execução, podendo, portanto, ser utilizada para diferentes micro-organismos, como, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e fungos.

Os resultados mostraram que os extratos metanólicos vegetais de espécies do gênero *Erythroxylum* utilizados possuem potencial farmacológico antibacteriano e antifúngico, sendo mais potente contra bactérias gram-positivas e fungos, podendo assim ser empregados em técnicas biotecnológicas para descoberta de novos antibióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FIGUEIREDO, E. A. P.; RAMOS, H.; MACIEL, M. A. V.; VILAR, M. C. M.; LOUREIRO, N. G.; PEREIRA, R. G.; *Pseudomonas aeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Rev. bras. ter. intensiva** vol.19 no.4 São Paulo Oct./Dec. 2007.

GONÇALVES, A. L.; ALVES, A. FILHO; MENEZES, H. **Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas.** *Arq. Inst. Biol.*, SP, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GRIFFIN, W.J. & LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. **Phytochemistry**, v. 53, n 8, p. 623-637, 2000.

LÔBO, K. M. S.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. E *Operculinahamiltonii*(G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.2, p.227-233, 2010.

MORAES, H. P. de; **Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana de extratos de *Byrsonimaspp* e *Alchorneaspp*:** Estudo comparativo entre as técnicas de diluição em tubos e microplacas. UNESP: Araraquara, 2006.

NOVAIS, T.S. et al. **Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro.** FIOCRUZ: Salvador, 2003.

OLIVEIRA, S. L. **Alcaloides tropânicos de *Erythroxulum caatingae***. 2008. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa, 2008.

OLIVEIRA, S.L. **Fitoquímica de espécies de *Erythroxylum* do semiárido: isolamento e determinação estrutural de alcaloides tropânicos, flavonoides e diterpenos**. Dissertação (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – LTF/CCS/UFPB, João Pessoa, 2012.

SILVA, G.L., et al; Modulation of the multidrug-resistance phenotype by new tropane alkaloid aromatic esters from *Erythroxylum pervillei*. **J Nat Prod.**, v. 64, n 12, p. 1514-1520, 2001.

TONDO, E. C; ROSSI, E. M; MALHEIROS, P. da S; SCAPIN, D; GRANDO, W. F; Suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus Aureus* isolados de manipuladores de indústria de laticínios. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.4, p. 467-471, out./dez. 2008.

WILLIAMS, J. E. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Unã de Gato and Sangre de Gatro. **Altern. Med. Rev.**, Saindpoint, v. 6, n 6, p. 567-579, 2001.