

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM SINERGISMO DE EXTRATOS OBTIDOS DE PLANTAS E CASCAS, FRENTE À *Pseudomonas aeruginosa*

Angêlica Pereira Ribeiro; René Monteiro Araújo; Ana Cláudia Dantas de Medeiros; Paloma Nascimento Lima; Francinalva Dantas de Medeiros.

LABDEM/UEPB - Laboratório de Desenvolvimento e Ensaios em Medicamentos, Departamento de Farmácia -  
Universidade Estadual da Paraíba

angelyca.p07@hotmail.com

**Resumo:** A resistência microbiana aos antibióticos é considerada como um problema que afeta toda a sociedade, muitas vezes são causadas pelo uso irracional de antimicrobianos, por isso a relevância da busca por novas alternativas terapêuticas. Dessa forma, plantas medicinais se tornou um importante alvo nas pesquisas científicas. Como exemplos de plantas com potenciais terapêuticos têm-se *Spondias mombin*, *Ximenia americana* L., *Spondias purpúrea*, *Mormodica charantia* L., *Aspidosperma pyrifolium* Mart., *Schinopsis brasiliensis* ENGL., *Poincianella pyramidalis* e *Jatropha gossypifolia* L. ambas apresentam-se como forte candidata a investigação de seus potenciais farmacológicos. Portanto, esse trabalho objetiva avaliar a atividade antimicrobiana de associações de extratos nebulizados de plantas do semiárido nordestino frente à cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Para isso, inicialmente executou as coletas das folhas e casca das plantas, em seguida, realizou-se a secagem e pulverização, individualmente para cada planta. Logo após, foi realizada a extração utilizando como solvente o etanol em diferentes concentrações, em seguida foi reduzido o teor alcoólico por rotoevaporação a 40 °C, e posteriormente, os extratos foram secos em aparelho de *spray dryer*, obtendo extratos nebulizados para cada espécie analisada. A verificação da atividade antibacteriana foi realizada, *in vitro*, pelo método de microdiluição em caldo, determinando-se a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos frente ao microrganismo estudado. Como resultado, verificou-se que as interações entre extratos apresentaram atividade significativa, mostrando-se eficaz na inibição do patógeno. Tais resultados mostram a capacidade de extratos vegetais em apresentar eficácia na inibição de microrganismos, validando cientificamente seu potencial antimicrobiano.

**Palavras chaves:** Potencial antibacteriano, Fitoterapia, *Pseudomonas aeruginosa*.

## Introdução

As plantas medicinais têm sido utilizadas desde os primórdios da civilização pelo ser humano com o objetivo na prevenção ou cura de doenças, e conseqüentemente esse hábito foi transmitido de geração em geração até os dias atuais, hoje sendo utilizada para aprimorar o desenvolvimento de fitoterápicos com efeito de inibir o crescimento do microrganismo, sejam bacterianos ou fúngicos (Lopes, et al., 2010; Santos, et al., 2012; Feijó, et al., 2012).

Atualmente, as plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população como um recurso de alternativa terapêutica na forma de fitoterápico devido ao aumento da incidência de resistência bacteriana aos fármacos, visto que as infecções e outras patologias oportunistas tem se tornado constantes em meio ao uso inadequado dos antibióticos (Lu, Zhao, Wang Chen, & Fu, 2007).

Devido ao aumento das resistências bacterianas pode-se observar que nas últimas décadas linhas de pesquisas relacionadas a essa área vem se fortalecendo, principalmente ao estudo de componentes isolados de plantas, extratos brutos, frações purificadas e metabólitos

secundários presente nas mesmas (Morais, et al., 2013).

Os compostos presentes nas diversas partes das plantas medicinais (folhas, caules, raízes, sementes, flores) são capazes de inibir o crescimento dos patógenos ou matá-los, além de apresentar toxicidade mínima para as células hospedeiras, e são considerados eficazes para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Askary, et al., 2012).

A terapia para o tratamento de infecções bacterianas ou fúngicas em pacientes imunocomprometidos, é a grande barreira para os pesquisadores e para os clínicos (Rúbia, et al., 2005).

Os biomas brasileiros são ricos em diversidade biológica, porém encontram-se ameaçados. O bioma Caatinga é o tipo de vegetação mais característico do semiárido, apresentando aspectos especiais, e é considerado exclusivamente brasileiro e o mais expressivo e presente da região nordeste (Costa, et al., 2012). O acervo de espécies desse bioma é bastante rico, sendo caracterizado por apresentar uma grande variedade de plantas, muitas dessas apresentando atividades terapêuticas significativas.

Dentre as espécies vegetais da região do semiárido com potencial terapêutico têm-se *Spondias mombin* (Cajazeiras),

*Ximenia americana* L. (Ameixa do mato), *Spondias purpúrea* (Seriguela), *Mormodica charantia* L. (Melão São Caetano), *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (Pereiro), *Schinopsis brasiliensis* ENGL. (Braúna), *Poincianella pyramidalis* (Catingueira) e *Jatropha gossypifolia* L. (Pinhão-rocho).

As folhas, flores e casca de *S. mombin* são usadas na medicina popular para o tratamento de doenças do aparelho digestivo, dor de garganta, febre, diarreia e como contraceptivo (Silva, et al, 2012). As folhas de *S. purpurea* são usadas popularmente, devido ao seu potencial antimicrobiano (Ceva-Antunes et al, 2006). *M. charantia* L., é utilizada na medicina popular por apresentar propriedades antibacterianas, antidiabética, antifúngica e anti-hiperglicêmica.

Ademais, tem-se a *Jatropha gossypifolia* L, utilizada na medicina popular como analgésica, anti-inflamatório, antimicrobiano, antidiarreico, antiofídico, anticonvulsante, antisséptico, anti-hipertensivo, tratamento da malária entre outras finalidades (Felix-Silva, et al., 2014; Misra e Misra, 2010). *X. americana* L., conhecida popularmente por ameixa do mato, tem grande ocorrência no nordeste brasileiro, é utilizada na medicina popular, principalmente, para o tratamento de

dor de estomago, sífilis, reumatismo, câncer e infecções bacterianas.

Conforme Veras e colaboradores, a casca da *X. americana* apresenta diversas atividades que vem sendo utilizada para diversos fins tais como: tratamento da lepra, malária, dor de cabeça, e grande ação cicatrizante. Nesse contexto, reconhecendo o potencial terapêutico das plantas medicinais citadas, esse trabalho visa avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos nebulizados de *M. charantia* L., *S. mombin*, *A. pyrifolium* Mart., *S. purpúrea*, *S. brasiliensis* ENGL, *P. pyramidalis* e *J. gossypifolia* L., frente a cepa *Pseudomonas aeruginosa*.

## Metodologia

Inicialmente foi realizado um estudo etnofarmacológico das plantas medicinais, espontâneas do semiárido Brasileiro, com indicação popular para o tratamento de infecções bacterianas. A seguir, as plantas foram coletadas na região do compartimento da microrregião dos Cariris Velhos nos municípios de Boqueirão, Barra de Santana, Caturité e Cabaceiras, localizados no semiárido paraibano, obedecendo a época e o horário de coleta das mesmas.

As amostras foram secadas, individualmente, em estufa de circulação de ar a 40 °C e, em seguida, pulverizadas

utilizando moinho de facas com malha de 10 *mesh*, no Campus II da UEPB, localizado no município de Lagoa Seca.

A seguir as partes selecionadas das plantas, cascas ou folhas, foram trituradas, individualmente em moinho de rotor vertical, com granulometria definida em torno de 10 *mesh*, então a planta pulverizada foi submetida ao processo de extração por maceração, ultrassom e turbólise, utilizando 20 g da droga vegetal, na qual foram extraídas utilizando álcool como solvente extrator, nas concentrações de 30, 50 e 70%, respectivamente, e filtrados após 48 horas. Os processos de extração para o método de maceração, o resíduo da planta foi submetido novamente à outra extração, adicionando o solvente e sendo filtrado após 48 h. Esse procedimento foi repetido a cada 72 h até uma completa extração dos constituintes das amostras e completando três processos de filtração, sendo realizado para cada tipo de concentração.

Para o método de extração por esgotamento em ultrassom, foram utilizados os mesmos solventes nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente, a seguir as folhas foram pesadas e transferidas para frascos, em que foi acrescentado o solvente numa razão de 20 g para 100 mL do solvente. Os frascos

foram colocados no ultrassom por 60 minutos em temperatura ambiente, e em seguida filtrados. O material vegetal foi colocado novamente em um frasco e acrescentado mais solvente e submetido à nova extração, esse processo foi repetido até uma completa extração de seus constituintes, observada pela limpidez do solvente.

No método de extração por turbólise, foi usada a mesma quantidade da planta, em agitação por 15 minutos em aparelho ultraturax a 3000 rpm utilizando as mesmas concentrações do solvente.

Finalizado o processo de extração os extratos foram submetidos ao processo de concentração utilizando rotoevaporador, obtendo a concentração desejada de solvente, em seguida os mesmos foram nebulizados utilizando aparelho de *spray dryer*, da marca LabPlant.

Dessa forma, foram obtidos os extratos nebulizados de *M. charantia* L., *S. mombin*, *A. pyrifolium* Mart., *S. purpúrea*, *S. brasiliensis* ENGL, *P. pyramidalis* e *J. gossypifolia* L., frente a cepa *Pseudomonas aeruginosa*.

Os métodos de diluição *in vitro* são de grande relevância para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), eles detectam possíveis atividades antimicrobianas de compostos, utilizando

métodos celulares sem ter obrigatoriamente um alvo específico.

O ensaio para a determinação da CIM é obtido a partir do método de microdiluição em meios de cultura líquidos, que após incubação é possível verificar a menor concentração inibitória que foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi utilizada a cepa padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27563), disponibilizada pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – RJ).

Para a realização dos testes de sensibilidade do microrganismo aos extratos vegetais produzidos, foi utilizado o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), no qual as bactérias foram ativadas em tubo contendo o BHI, seguido de incubação a 35 °C por 24 horas, com o objetivo de obter colônias jovens. Em seguida, a cepa foi cultivada, através de alíquotas em placas de Petri com agar Mueller Hinton e incubada novamente por 24 horas a 35 °C. Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 cavidades, de acordo como preconizado pelo *Clinical and Laboratorial Standards Institute* (CLSI, 2010).

Os inóculos foram normalizados em tubos contendo 5 mL de solução salina estéril a 0,9%, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). A suspensão foi ajustada espectrofotometricamente a 630 nm, que é equivalente a 106 UFC.mL<sup>-1</sup>. Então, 100 µL de extrato (concentração inicial de 2 mg.mL<sup>-1</sup> em água destilada) foram diluídos em série no caldo BHI numa microplaca de 96 poços, para o estirpe de microrganismo estudado. 10 µL de cada cultura de microrganismos foram adicionados a cada poço.

O controle positivo utilizado foi a nistatina e o controle negativo as soluções hidroalcoólicas utilizadas nas produções dos extratos. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 35 °C ± 0,5 °C durante 24 horas. O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µL de solução aquosa de resazurina (Sigma-Aldrich) a 0,01%, com uma incubação adicional a 35 °C ± 0,5 °C durante 2 horas. Microrganismos viáveis foram responsáveis pela mudança de cor do corante, de azul para cor-de-rosa.

## Resultados e discussão

A tabela 1 mostra o resultado da análise microbiológica, obtida através do método de microdiluição em caldo, no qual

foram realizadas diluições seriadas. Em que A, B, C, D, E e F, correspondem as concentrações do extrato, que são equivalentes a 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 e 0,031 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Vale salientar que, NA indica que não houve atividade, ou seja, aquela determinada mistura de extrato não foi capaz de inibir o crescimento do microrganismo. De acordo com os dados obtidos, observa-se que as interações dos extratos das plantas medicinais, apresentaram uma ótima eficácia na inibição do crescimento bacteriano.

Após a leitura, verificou-se que o sinergismo entre os extratos das cascas de *S. mombin* (Cajazeira), e *P. pyramidalis* (Catingueira), mostraram-se aptos, inibindo o crescimento bacteriano em menor concentração, equivalente a 0,031 mg.mL<sup>-1</sup>.

Entretanto, a ação sinérgica, entre extratos da casca de *S. mombin* e *S. purpúrea*, não apresentaram atividade, ou seja, não foram capazes de inibir o crescimento frente à cepa testada, o mesmo ocorreu com a interação entre os extratos das folhas de *S. mombin* e *S. brasiliensis* ENGL.

Tabela 01: Atividade microbiológica das misturas dos extratos frente à *Pseudomonas aeruginosa*.

Amostras	CIM(g.mL <sup>-1</sup> )
MSCC + CJC	1.0000
MSCC+ CF	0.1250
MSCC+ CC	0.1250
MSCC + AC	0.2500
MSCC + SC	0.5000
MSCC + BF	1.0000
MSCC + BC	0.5000
MSCC + PF	0.2500
CJC + CF	0.0625
CJC + CC	0.0312
CJC + AC	0.1250
CJC + SC	NA
CJC + BF	NA
CJC + BC	0.5000
CJC + PF	1.0000
CF + CC	0.1250
CF + AC	0.1250

MSCC: Melão de São Caetano Casca; CJC: Cajazeira Casca; CF: Catingueira folha; CC: Catingueira casca; AC: Ameixa casca; SC: Seriguela casca; BF: Braúna folha; BC: Braúna casca; PF: Pereiro folha; NA: não apresentou atividade.

## Conclusões

Os resultados do presente estudo indicam que a combinação dos extratos das oito plantas avaliadas, comumente utilizadas na medicina popular brasileira, apresentaram uma maior eficácia com relação à inibição do patógeno, caracterizado por apresentar uma ação bacteriana significativa frente à *Pseudomonas aeruginosa*.

Dessa forma, esse trabalho corrobora a atividade antimicrobiana das combinações de extrato, frente à estirpe de microrganismo estudado, apontando para a importância de se aprofundar essa investigação, a fim de desenvolver um fitoterápico que atue como agente antimicrobiano do patógeno *P aeruginosa*, que é considerado o principal causador de infecções tipicamente oportunistas.

## Referências Bibliográficas

- ASKARI, G.A. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanollic Extracts of Leaves of *Vitis vinifera* Collected from Different Regions in Morocco. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences** . v.12, n.1, p.85-90, 2012.
- COSTA, J. A. S.; NUNES, T. S.; FERREIRA, A. P. L.; STRADMAN, M. T. S; QUEIROZ, L. P. Leguminosas forrageiras da Caatinga: espécies importantes para comunidades rurais do sertão da Bahia. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, SASOP, 2002.
- FEIJÓ, A.M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de Diabetes mellitus no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai** s, v.14, n.1, p.50-56, 2012.
- Félix-Silva J, Gomes JAS, Barbosa LMQ, Pinheiro ITMG, Soares LAL, et al. (2014) Systemic and local anti-inflammatory activity of aqueous leaf extract from *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae). *Int J Pharm Pharm Sci* 6: 142–145.
- GROVER, J.K., Yadav, S.P. 2004. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 123–132.
- LOPES, G.A.D. et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão** , v.6, n.2, p.143-55, 2010.
- Lu Y, Zhao YP, Wang ZC, Chen SY, Fu CX: antimicrobial activity of the essential oil of *sperma* from China. *Nat Prod Res* 2007;21:22.

RUBIA, K.S.M. Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* SPRENG (Wedelia paludosa) (ASTERACEAE).

SANTOS, A.P.B. A beleza, a popularidade, a toxicidade e a importância econômica de espécies de Aráceas. **Revista Virtual de Química**, v.3, p.181-95, 2011.

S.M.Morais,K.S.B.Lima,S.M.C.Siqueira et al.,“Correlação entre as atividades antirradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas,”*Revista Brasileira de Plantas Medicinais*,vol.15,no.4,pp. 575–582,2013.

Veras, A.O.M.; Moraes, S.M. Análise dos constituintes químicos de *Ximenia americana* Linn. 2004. In IX Semana Universitaria e XIII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Ceará.