

Busca de novas drogas antimicrobianas a partir de vegetais.

Maria Lúcia Morcef Bouzada^a, Rodrigo Luiz Fabri^a, Gizele Garcia Duarte^b, Elita Scio^a

^a Departamento de Bioquímica – ICB – Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Martelos, Juiz de Fora, MG 36036 900, Brasil

^b Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – ICB – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Abstract: *Searching for new antimicrobial drugs from plants.* As part of a program oriented towards the discovery of bioactive natural products, 48 methanolic extracts from 41 Brazilian traditional medicinal plants, most of them commonly used for treating conditions likely to be associated with microorganisms, were evaluated for their antibacterial activity. The agar diffusion method was used against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*. Phytochemical analysis of the plant extracts for their major groups of phytoconstituents is also reported. All extracts showed antibacterial activity against at least *B.cereus* and *P. aeruginosa*. The highest inhibitory zones were observed for *Mitracarpus frigidus*. Phytochemical analysis of the extracts demonstrated the presence of common phytoconstituents like tannins, coumarins, flavonoids, saponins and alkaloids. The results were encouraging, as all the selected plants appeared to contain antibacterial substances. This reinforces the concept that the investigation of ethnobotanically used plants will reveal a substantial number of positive responses to *in vitro* screens.

Keywords: medicinal plants; antibacterial activity; natural products; plant extracts.

Resumo: Como parte de um programa que visa o descobrimento de produtos naturais bioativos, 48 extratos metanólicos provenientes de 41 plantas medicinais utilizadas tradicionalmente no Brasil, a maioria delas para o tratamento de doenças associadas a microorganismos, foram avaliadas quanto a sua atividade antibacteriana. O método de difusão em ágar foi utilizado para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*. Análise fitoquímica dos extratos para a identificação dos principais grupos de fitoconstituintes também foi relatada. Todos os extratos apresentaram atividade antibacteriana contra *B.cereus* e *P. aeruginosa*. A maior zona de inibição foi observada para *Mitracarpus frigidus*. A análise fitoquímica dos extratos demonstrou a presença de fitoconstituintes como taninos, cumarinas, flavonóides, saponinas e alcalóides. Os resultados são promissores visto que todas as plantas selecionadas parecem possuir substâncias antibacterianas. Isto reforça o conceito de que a investigação etnobotânica de plantas pode revelar um número substancial de respostas positivas em ensaios de triagem realizados *in vitro*.

Palavras chaves: plantas medicinais; atividade antibacteriana; produtos naturais; extratos vegetais.

1- Introdução:

Nos últimos anos, a frequência de resistência microbiana e a associação desta resistência com doenças infecciosas graves têm aumentado de forma progressiva (JONES, 2001, p.397-243). Muitos organismos têm desenvolvido resistência tanto contra os já bem estabelecidos antibióticos de uso convencional, quanto contra os antibióticos de última geração, causando graves problemas de saúde pública e prejuízos econômicos (AUSTIN *et al.*, 1999, p.1152-1156; PRATES e BLOCH-JÚNIOR, 2001, p.30-36; JONES, 2001, p.397-243). Esse fato torna imperativo o desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de lidar efetivamente com as estratégias de adaptação que esses organismos elaboram, em face de todo o tipo de situação adversa.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana e caracterizar o perfil fitoquímico de extratos vegetais provenientes de plantas utilizadas popularmente para o tratamento de doenças infecciosas.

2- Metodologia:

2.1- Coleta do material vegetal:

Quarenta e oito amostras vegetais (folha, inflorescência, caule, raiz, parte aérea) foram coletadas em Juiz de Fora entre 2004 e 2005. As exsiccatas foram depositadas no Herbário Leopoldo Krieger/UFJF (CESJ).

2.2- Preparação dos extratos:

As partes secas das plantas (50g cada) foram pulverizadas e maceradas com metanol (3 x 200 ml) por cinco dias a temperatura ambiente. O solvente foi evaporado por pressão reduzida em

evaporador rotatório para obtenção dos extratos metanólicos.

2.3- Estudo fitoquímico preliminar:

Os extratos foram submetidos às análises fitoquímicas preliminares para a determinação das classes químicas de metabólitos especiais existentes: compostos esteroidais/terpenos, flavonóides, antraquinonas, cumarinas, taninos, saponinas e alcalóides (MATOS, 1997).

2.5- Atividade antibacteriana pelo método de difusão em agar:

As cepas padrão de bactérias usadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* (ATCC 13311), *Shigella sonnei* (ATCC 11060), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13866), *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Micrococcus luteus* (ATCC 10054), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299), *Enterobacter cloacae* (ATCC 10699) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 10096). A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada de acordo com procedimentos descritos na literatura (PEREZ *et al.*, 1990, p.113-115; AHMAD *et al.*, 1998, p.183-193). Todos os testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos como diâmetro da zona de inibição em mm. Cloranfenicol (30 µg) foi usado como controle positivo.

3- Resultados e Discussão:

Os resultados da triagem biológica e fitoquímica dos 48 extratos metanólicos estão resumidos na Tabela 1.

Todos os extratos apresentaram atividade contra pelo menos uma das sete cepas de bactérias testadas. *S. aureus* é uma das mais importantes bactérias patogênicas e por essa razão é utilizada em bioensaios

primários. 44% dos extratos apresentaram atividade contra essa bactéria. *B. cereus* e *P. aeruginosa* foram as mais sensíveis aos extratos testados enquanto *E. coli* foi a mais resistente. Os extratos de inflorescências de *P. venusta* e *O. gratissimum*, de folhas de *R. officinalis*, *P. lanceolata* e *P. hydropiperoides* e de partes aéreas de *M. frigidus* foram ativos para todas as cepas de bactérias. É importante ressaltar que a maioria das espécies vegetais avaliadas são utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento de algum tipo de doença infecciosa.

A atividade biológica apresentada pelos extratos parece ser devido a presença de metabólitos secundários como alcalóides, identificados em 88% das espécies, triterpenos (48%), esteróis (50%), saponinas (38%), cumarinas (65%), taninos (77%), flavonóides (81%) e antraquinonas (50%) (Tabela 1).

Plantas que acumulam flavonóides e alcalóides inibem ou significativamente retardam o crescimento de todas as bactérias testadas. Uma vez que flavonóides são sintetizados pelas plantas em resposta a infecções microbianas, não é surpresa que eles tenham sido encontrados em extratos com expressiva atividade antimicrobiana

(DIXON *et al.*, 1983, p.1-69). Sua atividade seria provavelmente devido à capacidade que possuem de complexarem com a parede bacteriana. Flavonóides com características lipofílicas podem também romper a membrana microbiana (TSUCHIYA *et al.*, 1994, p. 27-34). Alcalóides com atividade antimicrobiana também já foram descritos. Seu modo de ação pode ser atribuído à capacidade que possuem de interagir com DNA (PHILLIPSON, 2001, p.237-243).

4- Conclusão:

Todos os 48 extratos analisados apresentaram alguma atividade antibacteriana, o que justifica a abordagem etnofarmacológica na busca de novos compostos bioativos. Estudos fitoquímicos estão sendo realizados com a finalidade de se isolar e identificar as substâncias ativas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Universidade Federal de Juiz de Fora UFJF pelo apoio financeiro e às Dra Fátima Regina Salimena e Dra.Tatiana Konno pela identificação botânica das espécies vegetais.

Referências

AHMAD, I.; MEHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, n.62, p.183-193, 1998.

AUSTIN, D.J.; KRISTINSSON, K.G.; ANDERSON, R.M. Vancomycin-resistant enterococci in intensive-care hospital settings: Transmission dynamics, persistence, and the impact of infection control programs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, n.96, p.1152-1156, 1999.

DIXON, R.A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advanced Enzimology*, n.55, p.1-69, 1983.

JONES, R.N. Resistance patterns among nosocomial pathogens. *CHEST*, n.119, p.397-404, 2001.

MATOS, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*, EUFC, Fortaleza, Brazil, 1997.

PEREZ, C.; PAULI, M.; BAZERQUE, P. An antibiotic assay by the well agar method. *Acta Biologiae et Medicine Experimentalis*, n.15, p.113-115, 1990.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, n.56, p.237-243, 2001.

PRATES, M.V.; BLOCH-JUNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos. *Biotecnology* n.23, p.30-36, 2001.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; FUJIWARA, S.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; LINUMA, M. Comparative study of the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, n.50, p.27-34, 1996.

Tabela 1- Atividade antibacteriana e perfil fitoquímico de extratos metanólicos de plantas medicinais

Família	Nome científico	PU ¹	Atividade antibacteriana (halo de inibição - mm) ²							Constituintes químicos ³							
			SA	PA	BC	SS	ST	EC	KP	Al	Tr	Es	Ta	Sa	Cu	Fl	An
Amarantaceae	<i>Pfaffia glomerata</i> (Spreng.) Petersen [CESJ 46164]	R	0	7	13	0	10	0	9	+	-	+	+	+	+	-	-
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi. [CESJ 46576]	F	10	19	20	23	11	0	12	+	+	-	+	-	-	+	+
	<i>Anacardium occidentale</i> L. [CESJ 46602]	C	0	22	15	20	10	0	0	+	+	-	+	-	-	+	+
Asteraceae	<i>Wedelia paludosa</i> DC. [CESJ 46157]	F	0	7	26	9	11	8	9	+	-	+	+	-	-	+	+
	<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam. [CESJ 46085]	F	0	8	18	10	10	0	0	+	+	-	+	-	+	-	+
	<i>Vernonia polyanthes</i> Less. [CESJ 46082]	F	0	10	17	10	0	0	0	+	+	-	-	-	+	+	-
	<i>Vernonia condensata</i> Baker [CESJ 46086]	F	8	11	17	0	8	0	8	+	-	+	+	-	+	-	-
	<i>Galinsoga ciliata</i> (Raf.) S.F. Blake [CESJ 46160]	F	0	10	16	0	15	0	0	+	+	-	+	-	-	+	-
	<i>Mikania glomerata</i> Spreng. [CESJ 46581]	F	0	12	17	0	10	0	11	+	-	+	-	+	-	+	-
	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. [CESJ 46084]	PA	0	8	20	10	0	0	0	+	-	+	+	-	-	+	-
Bignoniaceae	<i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers [CESJ 46183]	F	0	18	20	11	10	0	0	-	+	-	+	+	-	+	-
	<i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers [CESJ 46183]	I	10	14	16	15	14	9	10	+	-	+	+	+	-	+	-
	<i>Stenolobium stans</i> (L.) Seem [CESJ 46071]	F	9	11	20	11	8	9	0	+	-	+	+	-	-	+	+
Bixaceae	<i>Bixa orellana</i> L. [CESJ 46077]	S	0	18	19	21	13	0	0	-	+	-	-	-	-	-	+

	<i>Bixa orellana</i> L. [CESJ 46077]	F	9	11	19	24	9	0	0	+	-	+	-	+	+	+	-
Boraginaceae	<i>Symphytum officinale</i> L. [CESJ 46577]	F	7	10	21	16	12	8	0	+	-	+	-	-	+	-	+
	<i>Cordia verbenaceae</i> DC. [CESJ 46080]	F	10	11	19	9	11	0	11	-	-	+	-	-	+	+	-
Caesalpiaceae	<i>Senna mancrathera</i> (Coll) HS. Irwin & Barneby [CESJ 46159]	F	0	8	16	11	8	0	0	+	-	+	+	+	+	+	-
Celastraceae	<i>Maytenus ilicifolia</i> (Schrad.) Planch. [CESJ 46081]	F	9	9	21	11	13	0	10	+	+	-	+	-	-	+	+
Convolvulaceae	<i>Cuscuta racemosa</i> Mart. [CESJ 46083]	PT	8	8	17	0	11	0	12	+	+	-	+	+	+	+	+
Costaceae	<i>Costus spiralis</i> (Jacq.) Roscoe [CESJ 46173]	F	0	9	15	10	10	0	0	+	-	-	-	-	+	+	+
Equisetaceae	<i>Equisetum hyemale</i> L. [CESJ 16588]	PA	0	10	11	0	12	0	10	-	+	-	+	-	+	-	-
Fabaceae	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	F	0	15	28	13	11	0	0	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Cajanus cajan</i> (L.) Millsp.	S	0	11	16	10	10	0	10	+	-	+	+	+	-	-	-
Labiatae	<i>Ocimum gratissimum</i> L. [CESJ 46165]	F	8	12	20	12	11	0	11	+	-	+	+	+	+	+	+
	<i>Ocimum gratissimum</i> L. [CESJ 46165]	I	7	14	25	14	11	8	13	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Rosmarinus officinalis</i> L. [CESJ 46073]	F	10	12	21	15	17	9	11	+	+	-	+	+	-	+	+
	<i>Leonurus sibiricus</i> L. [CESJ 46176]	F	0	7	20	10	9	0	0	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>Stachys byzantina</i> K. Koch [CESJ 46593]	F	8	13	15	14	11	9	0	-	+	-	-	-	+	+	+
Malvaceae	<i>Gossypium hirsutum</i> L. [CESJ 46070]	F	0	13	19	15	11	8	0	-	+	-	-	+	+	+	+
Myrtaceae	<i>Sygyium cuminii</i> (L.) Skeels	F	0	15	15	10	0	0	10	+	+	-	+	-	-	+	+

ae	[CESJ 46601]															
	<i>Eugenia uniflora</i> L. [CESJ F 46168]	0	12	19	22	0	0	0	+	-	+	+	-	-	+	+
	<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & L.M.Perry [CESJ 46600]	0	10	15	21	0	0	0	+	+	-	+	+	-	+	+
Piperaceae	<i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq. [CESJ 46593]	0	12	20	8	10	8	12	+	-	+	+	-	+	+	+
	<i>Piper aduncum</i> L. [CESJ 46075]	8	12	20	11	10	0	0	+	-	+	+	-	+	+	-
	<i>Piper aduncum</i> L. [CESJ 46075]	7	9	21	15	8	10	0	+	+	-	+	-	+	+	+
Plantaginaceae	<i>Pantago laceolata</i> L. [CESJ 46167]	10	13	17	16	12	7	10	+	-	+	+	+	+	+	-
Polygonaceae	<i>Polygonum hydropiperoides</i> Michx. [CESJ 46072]	11	11	16	12	11	10	9	+	+	-	+	-	+	+	-
	<i>Polygonum hydropiperoides</i> Michx. [CESJ 46072]	10	9	19	11	13	0	10	+	-	+	+	+	+	+	-
Rubiaceae	<i>Mitracarpus frigidus</i> (Willd.) K. Schum. [CESJ 46076].	23	11	24	17	13	11	10	+	+	-	+	+	+	+	+
	<i>Spermacoce verticillata</i> Vell. [CESJ 46091]	0	10	14	8	10	9	10	+	-	+	+	+	+	+	-
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i> Mill. [CESJ 46069]	0	7	14	11	10	0	0	+	-	+	+	-	+	-	-
	<i>Solanum palinacanthum</i> Dun. [CESJ 46590]	0	12	15	0	0	0	0	+	+	-	+	+	+	+	-
	<i>Solanum palinacanthum</i> Dun. [CESJ 46590]	10	9	11	0	12	0	0	+	-	+	+	-	+	-	+
	<i>Solanum cernuum</i> Vell. [CESJ 46169]	0	7	16	13	10	0	0	+	+	-	+	-	+	+	-
	<i>Solanum concinnun</i> Sendtn.	8	17	25	15	12	0	10	+	+	-	+	-	-	+	-

	[CESJ 46079]															
Verbena	Lantana camara L. [CESJ F	0	11	20	13	12	0	0	+	-	+	-	-	+	+	-
ceae	46090]															
	Stachytarpheta cayennensis PA	0	8	15	10	8	0	0	+	+	-	-	-	+	+	-
	(Rich.) Vahl. [CESJ 46596]															

¹ Parte usada: R – raiz; F - folha; I – inflorescência; C – casca; PA – parte aérea; Fr – fruto; S – semente; PT – planta toda.

² Microorganismos: SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; BC, *Bacillus cerues*; SS, *Shigella sonnei*; ST, *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium*; EC, *Escherichia coli*; KP, *Klebsiella pneumoniae*.

³ Constituintes químicos: Al, alcalóides; Tr, triterpenos, Es, esteróides, Ta, taninos; Sa, saponinas; Cu, cumarinas; Fl, flavonóides; An, antraquinonas.