

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT

Jaqueline Inês Alves de Andrade

**Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia*
subsp. *magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do
extrato metanólico**

Manaus - AM

2009

Jaqueline Inês Alves de Andrade

Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do extrato metanólico

ORIENTADORA: Cecilia Veronica Nunez, Doutora

CO-ORIENTADOR: Takeshi Matsuura, Doutor

Financiamento: PPBio/INPA/MCT e CT-Agro/CNPq

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da UEA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, área de concentração em Biotecnologia.

Manaus - AM

2009

Ficha Catalográfica

A553a Andrade, Jaqueline Inês Alves de.
Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* (Trécul) contra *Aeromonas hydrophila* e fracionamento do extrato metanólico / Jaqueline Inês Alves de Andrade . -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2009.
40f. : il.

Dissertação (pós-graduação) Universidade do Estado do Amazonas,UEA 2009.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Cecilia Veronica Nunez
Co-orientador: Prof. Dr. Takeshi Matsuura

1. Extratos vegetais 2. Biotecnologia. I. Título.

CDU: 615.322

BANCA EXAMINADORA

Dra. Cecilia Veronica Nunez (Orientadora)

Dra. Maria da Paz Lima (Titular)

Dra. Cheila de Lima Bojjink (Titular)

DEDICO

A toda minha família, pelo amor incondicional
e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus nosso Senhor, pois sem sua bênção nada seria possível;
- A toda a minha família, ao João Rosche e a Nira Delfino pela confiança e apoio;
- Em especial a minha Orientadora Doutora Cecilia Veronica Nunez, pela orientação concedida, paciência e pelas oportunidades que sempre foram dadas para o meu crescimento profissional;
- Ao meu Co-orientador Doutor Takeshi Matsuura pela orientação no trabalho, sempre paciente e disposto a ajudar e pela amizade. E ao laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM);
- Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e em especial ao Laboratório de Bioprospecção da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais (CPPN), pelo espaço concedido e suporte para a realização deste trabalho;
- Aos meus amigos e profissionais do Laboratório de Bioprospecção do INPA, pela amizade e companheirismo, especialmente a Cláudia D. Comandoli, Júlio N. Souza e Pierre A. dos Santos;
- À Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pelo apoio durante o curso;
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida;
- Ao PPBio/INPA/MCT e CT-Agro/CNPq, pelo apoio financeiro à realização do projeto;
- E o meu muito obrigada a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1.	Princípios ativos naturais.....	3
2.2.	Antibióticos <i>versus</i> Resistência Microbiana.....	5
2.3.	Doenças causadas por bactérias patogênicas do gênero <i>Aeromonas</i>	7
2.4.	O uso de produtos naturais contra bacterioses em peixes.....	10
2.5.	Espécie vegetal.....	12
3.	OBJETIVOS.....	14
3.1.	Objetivo geral.....	14
3.2.	Objetivos específicos.....	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1	Origem e identificação do material vegetal	15
4.1.1.	Secagem e Moagem do material vegetal	15
4.2.	Preparo dos extratos vegetais.....	16
4.3.	Prospecção dos constituintes dos extratos metanólico e aquoso.....	17
4.4.	Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	17
4.5	Partição.....	18
4.6.	Fracionamento Cromatográfico.....	19
4.6.1.	Cromatografia em Coluna.....	19
4.7.	Microrganismo-teste.....	19
4.7.1.	Testes de atividade antibacteriana.....	20
4.7.2.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	21
4.7.2.1.	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	21
4.7.2.2.	Concentração Mínima Bactericida (CMB).....	21
4.7.3.	Bioautografia.....	22
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6.	CONCLUSÃO.....	32
7.	REFERÊNCIAS.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
BuOH	Butanol
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMB	Concentração Mínima Bactericida
DCM	Diclorometano
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
LUV	Luz Ultravioleta
MeOH	Metanol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Frutos verdes de <i>Coussapoa asperifolia</i> subsp. <i>magnifolia</i>	13
Figura 2	Local de coleta do material vegetal – Reserva Ducke.....	15
Figura 3	Preparo dos extratos vegetais	16
Figura 4	Partição (extração líquido-líquido)	18
Figura 5	Fracionamento do extrato MeOH	19
Figura 6	Atividade antibacteriana dos extratos dos frutos (DCM, MeOH e H ₂ O)	21
Figura 7	Esquema da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima bactericida (CMB)	22
Figura 8	Atividade antibacteriana do extrato dos frutos (DCM, MeOH e H ₂ O)	24
Figura 9	Revelação CCDC dos extratos MeOH e H ₂ O	25
Figura 10	Revelação CCDC do extrato MeOH com AlCl ₃	25
Figura 11	Revelação CCDC do extrato MeOH com LUV	25
Figura 12	Determinação da CIM e CBM do extrato MeOH dos frutos	26
Figura 13	Atividade antibacteriana das fases da Partição	27
Figura 14	Revelação CCDC das fases da Partição (F _{AcOEt} , F _{BuOH} e F _{H₂O})	28
Figura 15	Atividade antibacteriana das frações da partição F _{AcOEt}	29
Figura 16	Bioautografia da F _{AcOEt}	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Antibióticos utilizados na Piscicultura	9
----------	---	---

RESUMO

A piscicultura é um setor bastante promissor para produção de alimentos, porém, ainda existem vários gargalos para o seu desenvolvimento. Um destes entraves é a sanidade dos peixes. São poucos os estudos a respeito das formas de tratamento que podem ser utilizados nos sistemas piscícolas, principalmente em doenças causadas por agentes bacterianos. Isso é um grande problema, visto que, muitas das doenças na piscicultura são de etiologia bacteriana, e estas vem adquirindo cada vez mais resistência aos antibióticos utilizados tradicionalmente. Uma das espécies de grande importância na piscicultura por causar grandes mortalidades é a *Aeromonas hydrophila*, microrganismo que também vem se tornando cada vez mais resistente aos antibióticos utilizados comumente devido ao seu uso indiscriminado. Conseqüentemente, o interesse por produtos naturais biologicamente ativos com o intuito de serem utilizados como profilaxia e no tratamento de doenças em peixes tem aumentado nos últimos anos. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana dos extratos diclorometânico (DCM), metanólico (MeOH) e aquoso (H₂O) dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* contra *Aeromonas hydrophila* e fracionar o extrato mais ativo. Os testes de atividade antibacteriana foram realizados em duplicata pelo método de difusão em ágar pela técnica do poço e por bioautografia. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada por macrodiluição e a concentração mínima bactericida (CMB), a partir da CIM. O extrato DCM não apresentou atividade antibacteriana, porém, os extratos MeOH e H₂O apresentaram atividade contra *A. hydrophila*. Dentre os dois extratos ativos, o MeOH foi escolhido para posterior fracionamento, devido às características das moléculas presentes nele. A CIM e a CMB para o extrato metanólico foram 4 mg/mL e 32 mg/mL, respectivamente, mostrando-se então bacteriostático e bactericida. O fracionamento deste extrato começou pela partição líquido-líquido, com os solventes DCM, acetato de etila (AcOEt), butanol (BuOH) e H₂O. Em seguida, foi realizada uma nova avaliação da atividade antibacteriana destas fases, onde todas mostraram-se ativas, porém com intensidades distintas e devido às suas características moleculares e quantidade de massa, foi escolhida a fase AcOEt para posterior fracionamento. Assim, a fase AcOEt foi submetida a uma cromatografia em coluna de Florisil, usando gradiente de DCM, AcOEt e MeOH, obtendo-se 86 frações, que foram reunidas após análise em cromatografia em camada delgada comparativa, totalizando 10 frações. Foi realizado teste de atividade antibacteriana das últimas frações que continham massa suficiente para continuar o fracionamento, porém não apresentaram atividade. Assim, foram realizadas análises de bioautografia, com a fase AcOEt (original), para determinar se havia a possibilidade das substâncias ativas terem ficado retidas na coluna, e ainda se havia a possibilidade de ocorrer sinergismo entre todas as frações e, pelos resultados obtidos, ambas as possibilidades foram descartadas. Desta forma, o que pode ter ocorrido é que a escolha da fase estacionária ou móvel foi incorreta, gerando a degradação das moléculas ativas. Outras metodologias de fracionamento deverão ser realizadas com o extrato metanólico dos frutos de *C. asperifolia* subsp. *magnifolia* visando isolar as moléculas antibacterianas.

ABSTRACT

The fish farming is a promising sector for food production, however, there are still several bottlenecks to its development. One of these impediments is the fish's health. There are few studies regarding the treatment forms that can be used on fish farming systems, mainly about diseases caused by bacterial agents. This is a great problem, because many of the fish farming diseases are of bacterial aetiology, and they are acquiring more and more resistance to the antibiotics traditionally used. One of the species that causes great mortalities in fish farming is *Aeromonas hydrophila*, microorganism that is becoming more and more resistant to the antibiotics used commonly due to its indiscriminated use. Consequently, the interest for biologically active natural products with the intention of use them as prophylaxis and in fish diseases treatment has been increased in the last years. Therefore, the aim of this work was to evaluate the antibacterial activity of dichloromethane (DCM), methanolic (MeOH) and aqueous (H₂O) extracts of *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* fruits against *Aeromonas hydrophila* and to fractionate the most active extract. The antibacterial activity assays were accomplished, in duplicate, using the agar diffusion method by well technique and bioautography. The minimum inhibitory concentration (MIC) determination was made by macrodilution and the minimum bactericidal concentration (MBC), from MIC. The DCM extract didn't show antibacterial activity, however, the MeOH and H₂O extracts showed activity against *A. hydrophila*. Between the two active extracts, the MeOH was chosen for subsequent fractioning, due to the characteristics of the molecules present in it. The MIC and MBC for the MeOH extract were 4 mg/mL and 32 mg/mL, respectively and showing both bacteriostatic and bactericidal activities. The fractionation of this extracts began by liquid-liquid partition using DCM, ethyl acetate (AcOEt), butanol (BuOH) and H₂O, as solvents. Then, a new assay to evaluate the antibacterial activity of those phases was accomplished and all phases showed activity, however, with different intensities, and due to their molecular characteristics and mass amount, AcOEt phase was chosen for the subsequent fractioning. So, the AcOEt phase fractionation was performed by using Florisil column chromatography and DCM, AcOEt and MeOH gradient, yielding 86 fractions, which were combined after thin layer chromatography comparison totalizing 10 fractions. The antibacterial test was made with the last fractions containing enough mass to follow the fractionation, but showed no activity. Thus, tests were carried out bioautography assay with the phase AcOEt (original), to determine whether there was a possibility of the active substances have been held in the column, and if still had the possibility of synergism occurring between all the fractions and, by the results obtained, both possibilities were discarded. Thus, what may have happened is that the choice of stationary or mobile phases was incorrect, yielding the degradation of the active molecules. Other fractionation methods should be carried out with the fruit methanolic extract of *C. asperifolia* subsp. *magnifolia* in order to isolate the antibacterial molecules.

1. INTRODUÇÃO

A floresta Amazônica se destaca por possuir a maior diversidade florística do mundo. Sendo assim, apresenta várias espécies vegetais que podem ser portadoras de princípios ativos, com potencial terapêutico contra várias doenças, principalmente no que diz respeito a doenças causadas por agentes bacterianos (CUNICO et al., 2006; TANAKA et al., 2005). Isso se torna de grande importância, visto que, os antibacterianos disponíveis no mercado estão se tornando cada vez mais ineficientes graças ao aparecimento de cepas com resistência a seus princípios ativos, o que tem se tornado uma preocupação mundial.

O problema da resistência bacteriana afeta vários setores da sociedade, desde a área da saúde humana a setores do agronegócio, como no caso da piscicultura (produção de peixes em cativeiro). Os sistemas piscícolas são afetados em grande escala devido ao fato, que várias doenças são de etiologia bacteriana, e estas vêm adquirindo cada vez mais resistência aos antibióticos utilizados comumente (AKINBOWALE et al., 2007), entre estas está a espécie *Aeromonas hydrophila*, uma das espécies bacterianas de grande importância na piscicultura por causar grandes perdas (RICHARDS; ROBERTS, 1978) e que também está se tornando cada vez mais resistente aos antibióticos usados tradicionalmente (HATHA et al., 2004). Conseqüentemente, o interesse pelos produtos naturais biologicamente ativos com o intuito de serem utilizados como profilaxia e no tratamento de doenças em peixes tem aumentado nos últimos anos.

Sabendo-se dos benefícios de diferentes produtos naturais utilizados como antibacterianos, vários estudos vêm sendo realizados demonstrando que a utilização destes produtos como fonte de substâncias ativas contra bactérias patogênicas de

peixes, pode ser uma alternativa promissora (DAS et al., 2007; HARIKRISHNAN et al., 2003; KIM et al., 1999; ZILBERG et al., 2004).

Várias espécies vegetais nativas apresentam propriedades medicinais tais como: atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, cicatrizante, antioxidante (RASMUSSEN, et al., 2000; SANTOS et al., 2007; SHARMA, 1993). Entre estas espécies, o apuí, *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia*, da família Cecropiaceae, apresenta uma alta atividade antioxidante nos extratos obtidos dos seus frutos e folhas, e provavelmente esta atividade está relacionada à presença de flavonóides (JEFFREYS et al., 2006).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Princípios ativos naturais*

As regiões que abrigam a maior diversidade de espécies são as florestas tropicais, devido às suas características favoráveis. Dentre estes ecossistemas se destaca a floresta Amazônica, com a maior biodiversidade do planeta. A riqueza da flora compreende aproximadamente 30.000 espécies, cerca de 10% das plantas de todo o planeta (MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI, 2009).

Sendo a maior diversidade florística do mundo, apresenta várias espécies vegetais que não foram bem estudadas, e outras ainda nem descobertas pela ciência. Plantas estas, que podem ser portadoras de princípios ativos, com potencial terapêutico contra várias doenças.

Princípios ativos são substâncias que exercem efeito farmacológico ou terapêutico. Nos vegetais, estes se concentram nas flores, folhas, raízes, frutos, caules e cascas (SANTOS, 2004). Sua concentração não é homogênea, variando de acordo com o habitat, a parte da planta e a sazonalidade (NOLDIN, et. al., 2003).

Muitos desses princípios ativos são originários do metabolismo secundário das plantas, produtos estes que, mesmo não sendo necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação da sua espécie no ambiente em que vive. Estas substâncias pertencem a vários grupos, dentre estes podemos citar os heterosídeos cianogênicos, fenóis, triterpenóides (e seus derivados metabólicos, os esteróides), taninos, alcalóides, dentre outros (SANTOS, 2004).

Estas classes de metabólitos secundários exercem funções como, por exemplo, a defesa contra herbívoros, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes, alelopatia, dentre outras (SANTOS, 2004; MALHEIROS; PERES, 2001).

Estudos mostram que plantas com estas classes de metabólitos apresentam efeito terapêutico contra várias doenças, principalmente no que diz respeito a doenças causadas por agentes bacterianos (CUNICO et al., 2006; TANAKA et al., 2005).

Sendo assim, o estudo dos vegetais torna-se de grande importância, pois os antibacterianos disponíveis no mercado estão cada vez mais se tornando ineficientes graças ao aparecimento de cepas com resistência a seus princípios ativos, o que tem se tornado uma preocupação mundial. A resistência bacteriana é um fenômeno natural entre os microrganismos, mas o uso indiscriminado de medicamentos tem acentuado este problema.

Dentre as medidas que podem ser tomadas para evitar ou diminuir essa resistência, está o uso racional de antibacterianos e o desenvolvimento de novos medicamentos (WANNMACHER, 2004). Os vegetais têm sido visto como uma fonte promissora de novas substâncias antibacterianas, e as pesquisas nessa área vêm ganhando importância mundial.

São inúmeros os relatos na literatura a respeito de espécies vegetais com atividade contra agentes bacterianos (BEHERA et al., 2008; LOGUERCIO et al., 2005; MAHASNEH; EL-OQLAH, 1999; SISTI et al., 2008). Várias pesquisas estão sendo realizadas com o objetivo de purificar e identificar substâncias de origem vegetal com propriedades antibacterianas.

Estudo realizado por Panizzi et al., (2002) demonstrou por meio de teste de atividade antibacteriana *in vitro*, que o extrato e bruto de *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) e suas frações contendo triterpenóides, flavonóides e outros compostos, foram capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas para humanos. Na literatura, vários outros estudos de atividade antibacteriana *in vitro* demonstram a

eficácia de extratos brutos e frações contra bactérias patogênicas (RAUHA et al., 2000; SANTOS et al., 2007; TANAKA et al., 2005; XIANG et al., 2008).

Todos estes estudos comprovam o grande potencial de espécies vegetais no tratamento de doenças de etiologia bacteriana.

2.2. Antibióticos versus Resistência Microbiana

Antibióticos são substâncias produzidas pelos organismos vivos (vegetal, animal ou microrganismo), capazes de inibir o crescimento ou matar outros microrganismos em pequenas concentrações (TAVARES, 2001; LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995). Os antibióticos diferem muito em suas propriedades físicas, químicas, farmacológicas, espectro antimicrobiano e mecanismos de ação. Atuam sobre as bactérias de duas maneiras, a partir da interrupção de seu crescimento e reprodução (efeito bacteriostático) e/ou indução da morte bacteriana (efeito bactericida) e seu mecanismo de ação varia de acordo com as suas características químicas, determinadas pela sua biossíntese (TAVARES, 2001). Os antibióticos interferem em vários processos celulares que são essenciais para o crescimento e sobrevivência das bactérias. Dentre os mecanismos de ação dos antibióticos podemos citar inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese protéica, alteração na permeabilidade da membrana plasmática, inibição da síntese dos ácidos nucléicos e antimetabolismo, ou seja, o bloqueio do metabolismo da bactéria pela adição do antibiótico (TAVARES, 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Apesar dos mais diversificados mecanismos de ação dos antibióticos, esses microrganismos desenvolvem várias estratégias para contornar essas ações e conseguir sobreviver. Algumas espécies de bactérias se protegem evitando que o

antibiótico atinja o seu alvo, impedindo que ele seja absorvido, ou expulsando-o para fora da célula; outras bactérias respondem alterando a estrutura do alvo de modo que o antibiótico não possa mais reconhecê-lo ou se ligar a ele; e ainda existem outras ações mais drásticas como a capacidade de destruição destes antibióticos (PELCZAR; REID; CHAN, 1996; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Muitos desses mecanismos são inerentes às bactérias, entretanto, existem espécies que não desenvolveram resistência a um antibiótico em particular e podem adquirir resistência de uma outra bactéria da mesma espécie, ou de espécies diferentes (TAVARES, 2001). O processo de resistência ocorre de várias maneiras, e pode ser transmitida de geração em geração. Este fato vem fazendo com que os medicamentos percam sua eficácia e se tornando preocupação mundial, visto que muitas das infecções são causadas por bactérias. Este processo de resistência é um fenômeno natural, entretanto, ele vem sendo otimizado pelo uso inadequado destes antibióticos. Daí a importância do uso racional de medicamentos, e aliado a isso o incentivo a novas pesquisas para a busca de novos produtos.

O problema da resistência microbiana afeta vários setores da sociedade, desde a área da saúde humana a setores do agronegócio, como no caso da piscicultura (produção de peixes em cativeiro). Os sistemas piscícolas são afetados em grande escala devido ao fato que várias doenças são de etiologia bacteriana, e estas vêm adquirindo cada vez mais resistência aos antibióticos utilizados comumente (AKINBOWALE et al., 2007). Isso é um fator determinante para produção de peixes, uma vez que, muitas vezes os sistemas aquícolas são dizimados por estes microrganismos. Essa resistência provavelmente está relacionada às grandes pressões sofridas pelo uso excessivo destes produtos nos sistemas de cultivo, pois, estudos mostram que essa espécie bacteriana apresenta múltipla resistência a

antibióticos (VIVEKANANDHAN, 2002; PETTIBONE et al., 1996; SON et al., 1997), e está relacionada geralmente aos plasmídeos, resistência horizontal (CHANG; BOLTON, 1987; ANSARY, et al., 1992).

2.3. Doenças causadas por bactérias do gênero Aeromonas

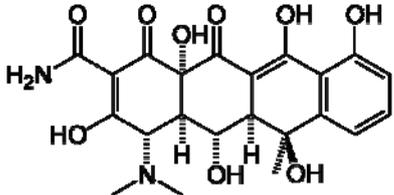
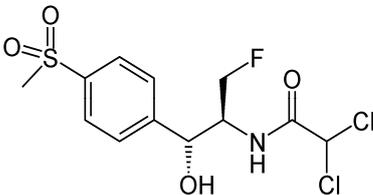
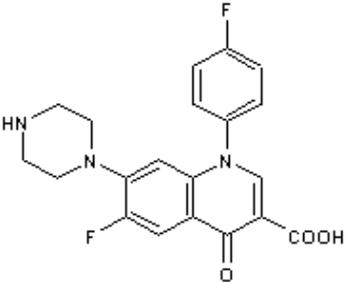
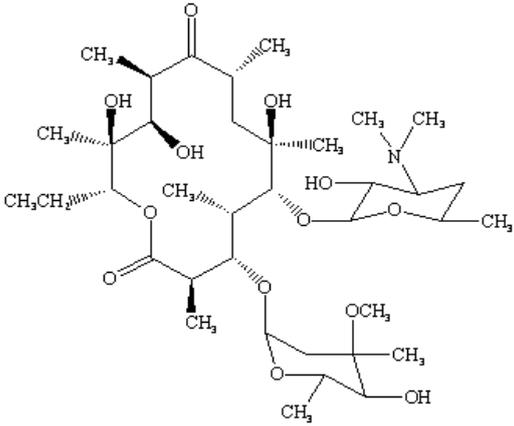
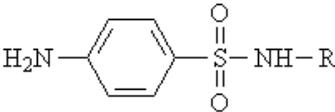
Dentre as doenças infecciosas em peixes, as de origem bacteriana são as que representam maior significância patogênica em cultivo intensivo (THUNE et al., 1993). Bactérias do gênero *Aeromonas* são responsáveis por grandes perdas na piscicultura, muitas vezes aparecendo como agente primário causador de lesões ulcerativas e septicemia hemorrágica em peixes de água doce (GHENGHESH et al., 2001; RADU et. al., 2003; SAHA; PAL, 2002; SOUZA; SILVA-SOUZA, 2001). Estas são bacilos ou coco-bacilos, Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não esporulantes (ROBERTS, 1993). As espécies de bactérias deste grupo que causam problemas nos peixes são: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas cavia* e *Aeromonas salmonicida*, sendo esta última espécie a única desse complexo, não móvel e patogênica obrigatória de peixes. O restante pode causar enfermidades nos animais pecilotérmicos (por exemplo, répteis e peixes) e homeotérmicos (por exemplo, mamíferos, incluindo o homem) (SALTON; SCHNICK, 1973).

Dentre as espécies de bactérias citadas acima, as que provocam maior mortalidade na piscicultura de água doce é a espécie *Aeromonas hydrophila* (RICHARDS; ROBERTS, 1978). Esta é uma bactéria tipicamente oportunista, patogênica facultativa, que quando há desequilíbrio dos sistemas bactéria-hospedeiro-ambiente, podem desencadear o aparecimento de doenças (PAVANELLI et al., 1998; VENTURA; GRIZZELE, 1998). Fazem parte da comunidade bacteriana normal da água, e podem atacar as brânquias, tegumento e intestino de peixes

perfeitamente saudáveis, sendo especialmente abundantes em águas eutrofizadas (PAVANELLI et al., 1998). Geralmente os sinais clínicos de infecções causadas por *A. hydrophila* em peixes são: perda de apetite, perda de equilíbrio, lesões epidérmicas (despigmentação, necroses da pele, úlceras com exposição da musculatura), hiperplasia (aumento de tamanho) do fígado, do baço e dos rins, dentre outras (HARIKRISHNAN et al., 2003; KUBITZA, 2004; PLUMB, 1994).

Por estarem presentes naturalmente no ambiente aquático e fazerem parte da microbiota natural de organismos aquáticos torna-se difícil seu controle. No mercado são disponíveis vários antibióticos e quimioterápicos destinados ao tratamento contra doenças bacterianas em peixes (Tabela 1).

Tabela 1. Antibióticos comumente utilizados na Piscicultura.

Antibiótico	Estrutura Química	Tratamento
Oxitetraciclina		Furunculoses em salmonídeos causados por <i>Aeromonas salmonicida</i> Septicemia hemorrágica causada por <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> e <i>Pseudomonas</i>
Florfenicol Premix		Tratamento de furunculoses causada por susceptibilidade de cepas a <i>Aeromonas salmonicida</i> .
Sarafloxacino		Tratamento de furunculoses, vibrioses e doença da boca vermelha em salmonídeos.
Eritromicina		Tratamento da doença renal bacteriana (<i>Renibacterium salmoninarum</i>) e Estreptococoseis em yellowtail no Japão.
Sulfonamidas potencializadas com Trimetoprim ou Ormetoprim		Tratamento de furunculoses, doença da boca vermelha e vibrioses.

Entretanto, o uso desses produtos pode trazer efeitos negativos, tais como: acúmulo de resíduos nos tecidos, imunossupressão, resistência bacteriana ao princípio ativo da droga e poluição do meio ambiente (ELLIS, 1988; RIJKERS et al., 1980; VAN MUISWINKEL et al., 1985).

Assim, se torna necessária a busca por medidas profiláticas e de tratamento contra as doenças de etiologia bacteriana, que minimizem tais efeitos colaterais causados pelos tratamentos convencionais. Portanto, o uso dos vegetais como fonte de produtos antibacterianos é uma alternativa a ser considerada.

2.4. O uso de produtos naturais contra bacterioses em peixes

A utilização dos vegetais no tratamento de doenças é empregada no mundo todo por milhares de anos (NOVAES et al., 2003). Plantas com finalidade terapêutica eram, e ainda são, utilizadas empiricamente pelas populações tradicionais. Atualmente é sabido que as plantas produzem substâncias que apresentam um alto poder curativo (KOO, 2000), e a busca por estas substâncias vem se tornando cada vez mais intensa.

São inúmeros os relatos a respeito de espécies vegetais com atividade contra patógenos humanos (BEHERA et al., 2008; LOGUERCIO et al., 2005; MAHASNEH; EL-OQLAH, 1999; SISTI et al., 2008; TAKAHASHI, et al., 2004). Entretanto, são poucos os dados a respeito dos efeitos contra patógenos de peixes.

Apesar do expressivo número de antibióticos e outros quimioterápicos utilizados na aquicultura (KUBITZA, 2004; PAVANELLI et al., 1998; SHARIFF et al., 2001), a resistência microbiana a essas drogas tem aumentado nos últimos anos, e aliado a isso, o uso destes produtos tem sido bastante criticado pelos efeitos negativos, inclusive ao meio ambiente (ELLIS, 1988; RIJKERS et al., 1980; VAN

MUISWINKEL et al., 1985). Conseqüentemente, o interesse pelos produtos naturais biologicamente ativos com o intuito de serem utilizados como profilaxia e no tratamento de doenças em peixes tem aumentado nos últimos anos.

Sabendo-se dos benefícios de diferentes produtos naturais utilizados como antibacterianos, vários estudos têm sido realizados demonstrando que a utilização destes produtos como fonte de compostos contra bactérias patogênicas de peixes, pode ser uma alternativa promissora. Estudo realizado por Bansemir et al. (2006), testando a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos brutos de várias espécies de algas marinhas contra cinco espécies de bactérias patogênicas para peixes, encontrou resultados satisfatórios para a maioria das espécies de algas. Trabalhos semelhantes foram realizados por outros autores, também encontrando resultados positivos (DUBBER; HARDER, 2008; NAVINER et al., 1999).

Segundo Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2007), alguns compostos da classe dos flavonóides, tais como, morina e quercetina, isolados da folha de *Psidium guajava*, demonstraram efeito bacteriostático sobre *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio salmonicida*.

Outros estudos demonstram o efeito benéfico do uso de algumas espécies vegetais no controle de doenças bacterianas *in vivo* (DAS et al., 2007; HARIKRISHNAN et al., 2003; KIM et al., 1999; ZILBERG et al., 2004). Dentre estas espécies, algumas agem como imunoestimulantes naturais, aumentando a atividade dos mecanismos de defesa não específicos e conferindo proteção contra doenças quando adicionados à ração dos peixes. Segundo Christyapita et al. (2007), o extrato aquoso da folha de *Eclipta alba* acrescentado à dieta de *Oreochromis mossambicus* aumenta a resposta imune não-específica e a resistência a

Aeromonas hydrophila. Já, as sementes de *Magnifera indica*, quando adicionadas a dieta, também aumentaram a resposta imune e a sobrevivência de *Labeo rohita* contra infecção por *A. hydrophila* (SAHU et al., 2007).

Estes produtos também podem ser usados, além de suplemento alimentar, como banhos terapêuticos. Segundo Harikrishnan et al. (2003), carpa comum (*Cyprinus carpio*) tratados com banhos terapêuticos com folhas de *Azadirachia indica* apresentaram diminuição no diâmetro das lesões causadas por infecção de *A. hydrophila*.

2.5. Espécie vegetal

Várias espécies vegetais nativas apresentam propriedades medicinais tais como: atividade antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, cicatrizante, antioxidante (RASMUSSEN, et al., 2000; SANTOS et al., 2007; SHARMA, 1993). Entre estas espécies nativas se destaca o apuí, *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia*. Pertencente à família Cecropiaceae está distribuída no Brasil, Colômbia, Equador, Panamá, Peru, Venezuela. Na literatura disponível, há apenas dois trabalhos realizados com esta espécie, sendo um realizado por Jeffrey et al. (2006) mostrando que as folhas e os frutos dessa espécie apresentam uma alta atividade antioxidante, e provavelmente esta atividade esteja relacionada à presença de flavonóides, e outro de Nunez et al., (2008), onde foi analisada a composição química dos frutos maduros e observou-se a presença de triglicerídeos esterificados com os ácidos palmítico, linoléico, oléico e esteárico nas ceras e um teor baixo de açúcares nos extratos polares.

Os flavonóides já foram encontrados em *Cecropia obtusifolia*, outra espécie da mesma família (ANDRADE-CETTO; WIEDENFELD, 2001). Em *Cecropia*

lyratiloba, além dos flavonóides, foi detectada a presença de terpenóides (ROCHA et al., 2007). Estas duas classes de substâncias apresentam várias atividades biológicas, incluindo antibacteriana (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2007). Sendo assim, a espécie *C. asperifolia* subsp. *magnifolia* pode se tornar um vegetal com grande potencial para ser utilizado como tratamento e profilaxia de doenças de etiologia bacteriana na piscicultura.



Figura 1. Frutos verdes de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* contra *Aeromonas hydrophila*.

3.2. Objetivos específicos:

- 1) Realizar o ensaio de atividade antibacteriana com os extratos diclorometânico, metanólico e aquoso dos frutos de *C. asperifolia* subsp. *magnifolia* contra *A. hydrophila*;
- 2) Realizar o fracionamento cromatográfico do extrato mais ativo dos frutos de *C. asperifolia* subsp. *magnifolia*.;
- 3) Determinar a fração ativa do extrato mais ativo dos frutos de *C. asperifolia* subsp. *magnifolia* contra o microrganismo teste *A. hydrophila*;
- 4) Determinar a Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato bruto mais ativo e da fração ativa.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem e identificação do material vegetal

O material vegetal foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Reserva Ducke), localizado no Km 26, rodovia AM 010, cidade de Manaus (Figura 2). Após a coleta, parte do material foi levado a Coordenação de Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), para confirmação da espécie. A exsicata foi depositada no herbário do mesmo Instituto (n° de registro: 183483). O restante do material vegetal coletado foi transferido para a Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais - CPPN/INPA, onde foram realizadas as extrações e os fracionamentos cromatográficos.



Figura 2. Local de coleta do material vegetal - Reserva Ducke

4.1.1. Secagem e Moagem do material vegetal

Os frutos foram secos em estufa de ventilação a 45°C, por 2-3 dias, e em seguida pulverizados em moinho de facas (marca Tecnal, modelo TE-650).

4.2. Preparo dos extratos vegetais

Os extratos dos frutos de *Coussapoa asperifolia* subsp. *magnifolia* foram preparados utilizando solventes orgânicos e água com aumento crescente de polaridade (diclorometano, metanol e água). Após extração realizada em banho de ultra-som por 20 minutos, os extratos diclorometânico (DCM) e metanólico (MeOH) foram concentrados em rota-evaporador e o aquoso (H_2O) liofilizado (Esquema 1). Em seguida estocados em freezer até a realização dos experimentos.

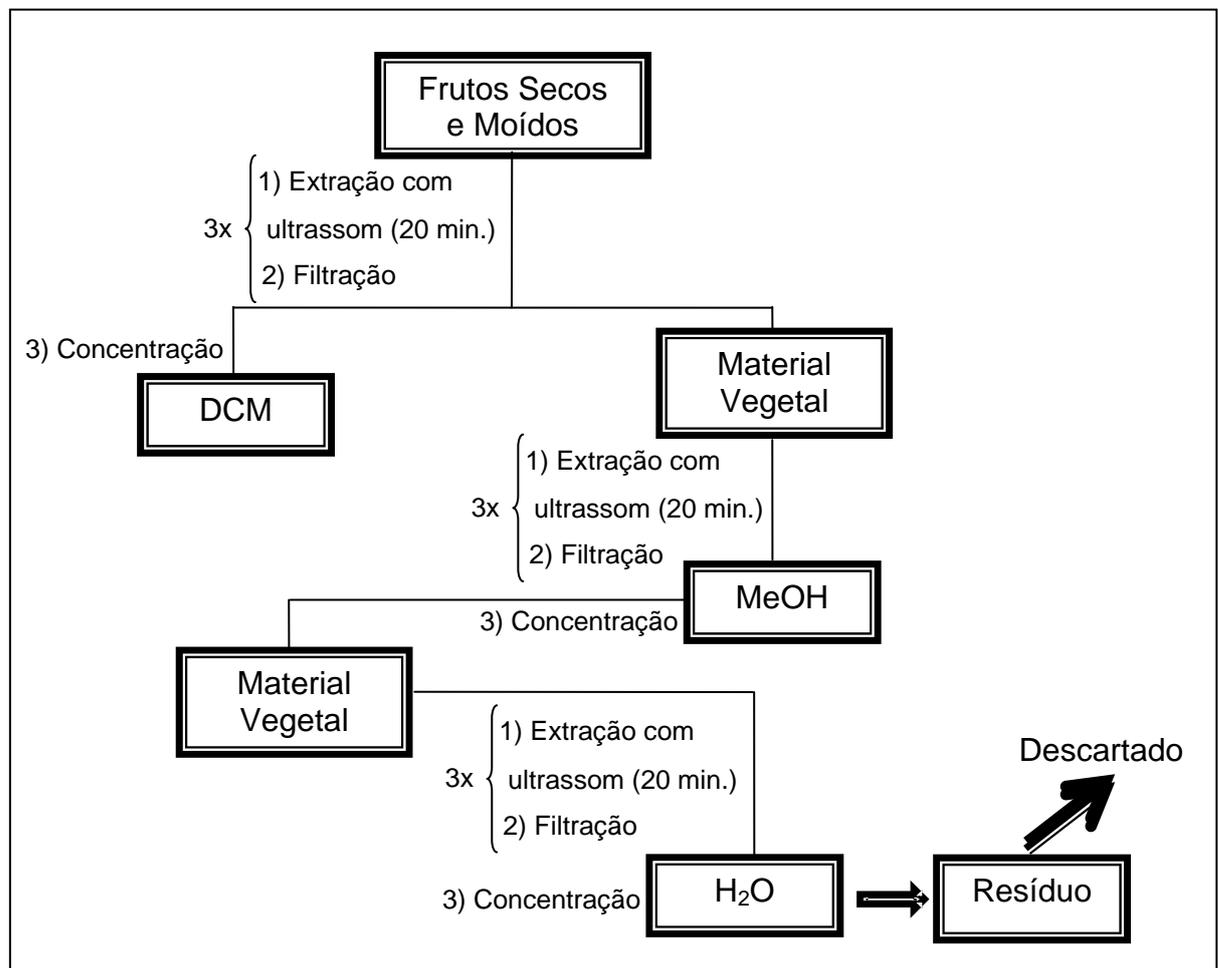


Figura 3. Preparo dos extratos vegetais.

4.3. Prospecção dos constituintes dos extratos metanólico e aquoso

Os extratos MeOH e H₂O foram analisados em CCDC, utilizando como fase estacionária sílica e fase móvel (AcOEt/MeOH 8:2) e reveladas com LUV, no comprimento de onda de 254 nm, anisaldeído, DPPH e cloreto férrico. O anisaldeído mostra a possível presença de terpenos, o cloreto férrico a presença de substâncias com anéis aromáticos e o DPPH indica a presença de substâncias antioxidantes.

O extrato metanólico dos frutos foi submetido a outros testes de prospecção fitoquímica para verificar a presença das seguintes classes de compostos: flavonóides e terpenóides. A detecção dos flavonóides foi realizada através de CCDC. Após a preparação da cromatoplaça, esta foi borrifada com reagente específico AlCl₃ seguido de revelação em LUV 365 nm conforme os ensaios descritos por Simões (2004). Os terpenos tiveram sua presença detectada pelo método de Liebermann-Buchard. Após a preparação da CCDC, seguiu-se a revelação por nebulização da cromatoplaça com o reagente específico seguida de visualização em LUV 254 nm (COSCIA, 1984).

4.4. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC): As análises em CCDC foram realizadas em cromatoplaças utilizando como fase estacionária, sílica gel 60 (dióxido de silício), marca Merck, com indicador de fluorescência UV₂₅₄, com suporte em alumínio. E como fase móvel foram utilizados os solventes DCM, AcOEt e MeOH em diversas proporções de acordo com a necessidade. A revelação das substâncias eluídas foi realizada através de métodos físicos (luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm) e químicos (iodo ressublimado, DPPH, cloreto férrico, sulfato cérico, anisaldeído e cloreto de alumínio).

4.5. Partição

O extrato metanólico foi submetido a uma partição (extração líquido-líquido). Para isso, quarenta gramas do extrato bruto foram ressuspensos em água destilada e realizada partição com os solventes diclorometano, acetato de etila e butanol. Para tanto, foram feitas extrações com 300 mL de cada solvente. Após cada adição de solvente, o material foi agitado e logo em seguida decantado, sendo posteriormente concentrado (Figura 2). As quatro frações obtidas (diclorometânica, acetato de etila, butanólica e aquosa) foram submetidas ao teste de atividade antibacteriana (item 4.4.1).

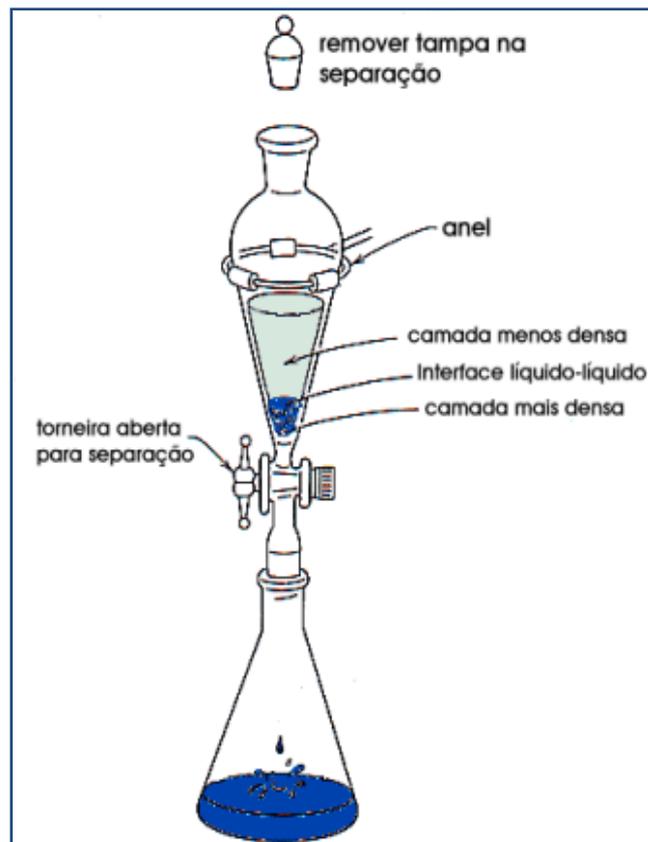


Figura 4. Partição (extração líquido-líquido).

4.6. Fracionamento cromatográfico

4.6.1. Cromatografia em coluna (CC): Uma alíquota da fase acetato de etila obtida da partição (6 g) foi submetida a uma CC. Como fase estacionária foi utilizado o adsorvente Florisil (silicato de magnésio), marca Merck, 0,075-0,150 mm, e para eluição das substâncias foram utilizados solventes com aumento crescente de polaridade (diclorometano, acetato de etila e metanol). As frações obtidas da coluna (86 frações) foram analisadas através de CCDC, sendo as frações semelhantes, novamente reunidas.

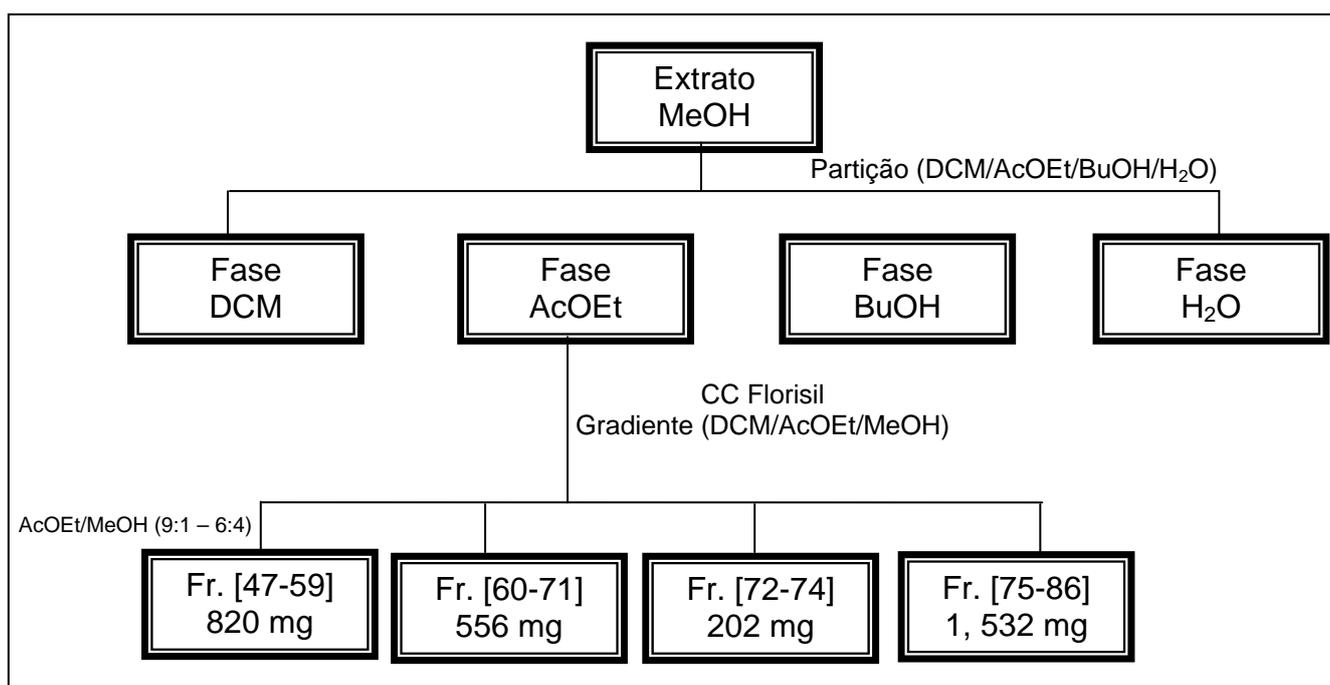


Figura 5. Fracionamento do extrato metanólico (MeOH).

4.7. Microrganismo-teste

O microrganismo escolhido para o teste de atividade antibacteriana (item 4.4.1) foi a bactéria *Aeromonas hydrophila*. Esta cepa foi cedida pela Professora Doutora Alicia Estévez-Toranzo do grupo de Ictiopatologia da Universidade de

Santiago de Compostela (Galícia, Espanha) e transportadas, via aérea, para Manaus, AM, onde se encontram preservadas a -20 °C (MURO e LUCHI, 1989) na Coleção de Culturas Bacterianas do Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

4.7.1. Testes de atividade antibacteriana

Os testes de atividade antibacteriana do extrato metanólico e de suas respectivas frações, foi realizado, em duplicata, segundo a metodologia proposta por Hu et al. (2004) modificada. O microrganismo-teste (*Aeromonas hydrophila*) foi inoculado em placa de Petri contendo o meio de cultura Ágar Müeller-Hinton através da técnica de spread-plate onde foram feitas incisões circulares com diâmetro de 6,0 mm, de modo a obter-se uma cavidade.

Inoculou-se 0,1 mL do extrato vegetal (correspondendo a 5 mg da massa do extrato bruto) e das frações (correspondendo a 5 mg de cada fração) na cavidade do meio preparado anteriormente. Foi utilizado como controle negativo de atividade antibacteriana o dimetilssulfóxido e a oxitetraciclina (10 µg) como controle positivo da atividade antimicrobiana. Após evaporação, as placas foram incubadas a 30 °C por um período de 18-24 horas.

Ao final do período de incubação, procedeu-se à verificação da formação dos halos de inibição de crescimento e à aferição do diâmetro dos halos foi realizada com o auxílio de um paquímetro.

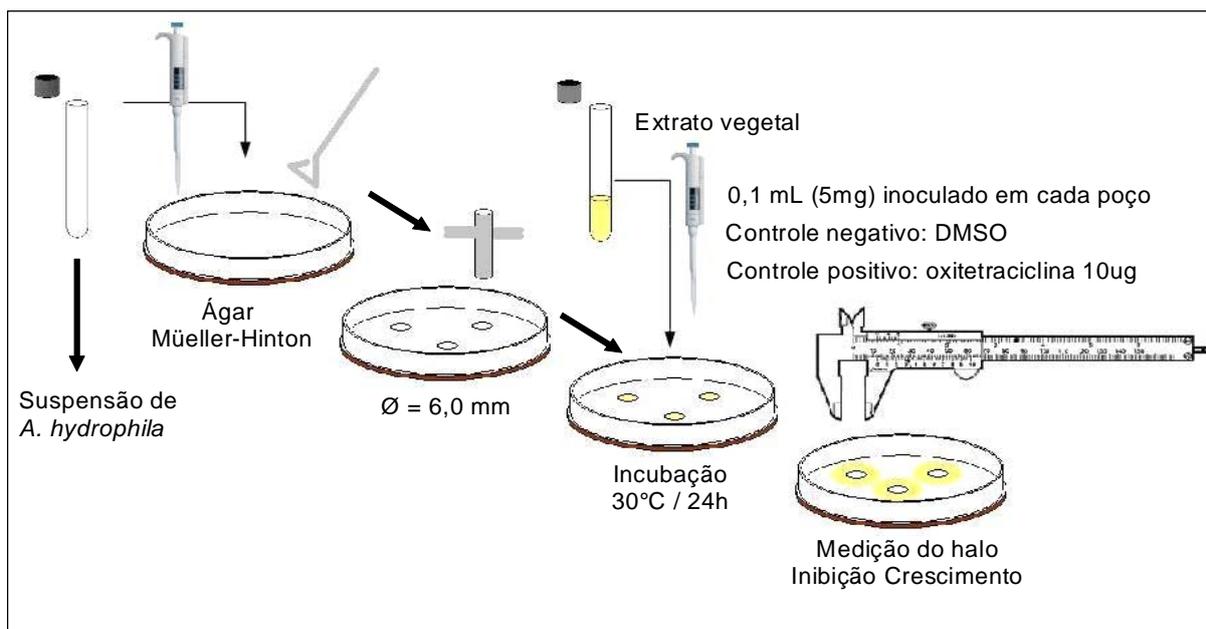


Figura 6. Atividade antibacteriana dos extratos DCM, MeOH e H₂O.

4.7.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) do extrato metanólico conforme metodologia descrita em Tavares (2001).

4.7.2.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em meio líquido, através da técnica de macrodiluição. Para isto, foram feitas diluições sucessivas do extrato (128 mg/mL até 0,065 mg/mL). Em seguida, foi inoculado o microrganismo-teste e os tubos foram incubados a 30 °C por um período de 18 a 24 horas. A CIM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento bacteriano visível.

4.7.2.2. Concentração Mínima Bactericida (MBC)

Os tubos incubados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foram utilizados para determinação da CBM. Uma alíquota (100 μ L) de cada concentração a partir da CIM foi inoculada em placas de Ágar Müeller-Hinton e posteriormente incubadas em ambiente a 30 °C de 18 a 24 horas. A CBM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9 % de morte microbiana).

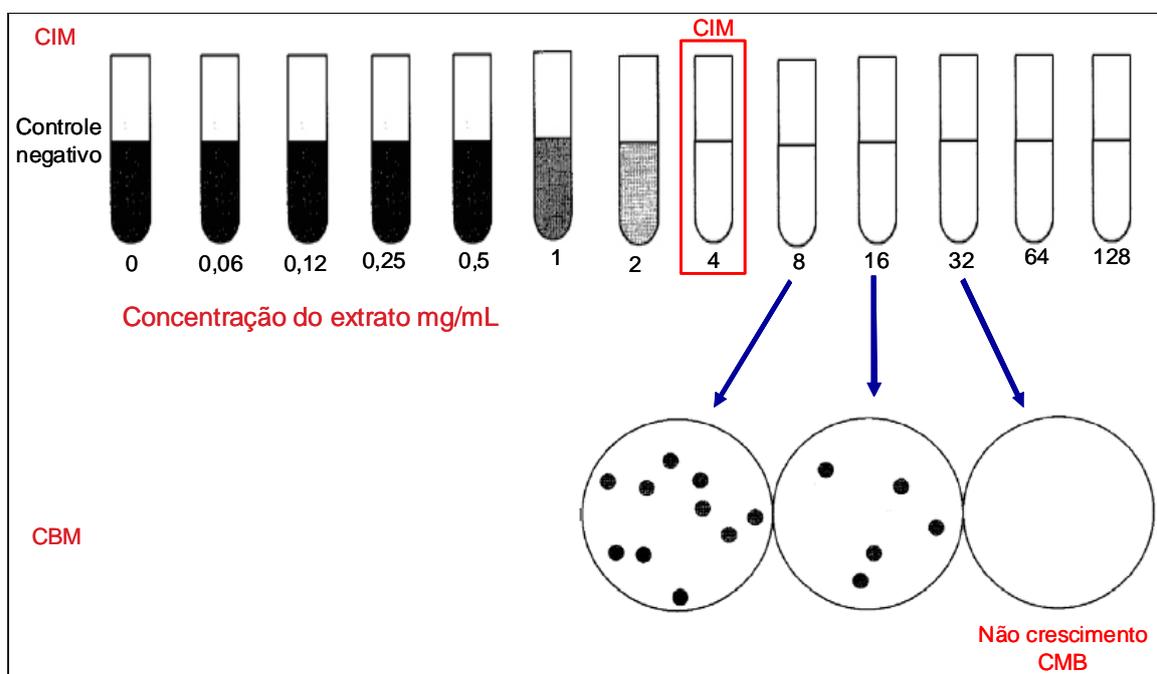


Figura 7. Esquema da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração da mínima bactericida (CMB).

4.7.3. Bioautografia

A avaliação da atividade antibacteriana do extrato metanólico e das fases da partição foi realizada através da técnica de bioautografia (BETINA, 1973) modificada. Para os testes, as amostras das frações do extrato foram aplicadas em cromatoplaças de CCDC e eluídas com solventes apropriados. Em seguida, foi

adicionado sobre a mesma, Ágar Müller-Hinton a 45°C contendo uma suspensão do microrganismo teste, em solução salina. Para melhor visualização da zona de inibição de crescimento, foi incorporado ao meio de cultura o revelador cloreto 2,3,4-trifeniltetrazólio.

Após solidificação do meio de cultura, a placa foi incubada a 30°C durante 24 horas. Ao final do período de incubação, os resultados foram avaliados qualitativamente observando-se a existência ou não de halos de inibição de crescimento bacteriano.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila* realizado com os extratos DCM, MeOH e H₂O dos frutos de *C. asperifolia* subsp. *magnifolia* (Figura 8) mostra que o extrato DCM não apresentou atividade, já os extratos MeOH e H₂O apresentaram atividade contra o microrganismo teste, com um halo de inibição de 7mm (média atividade) observado para cada extrato.

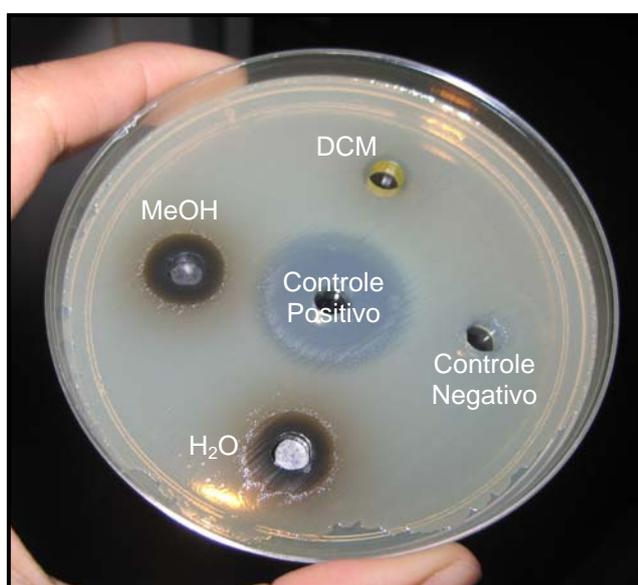


Figura 8. Atividade antibacteriana do extrato dos frutos (DCM, MeOH e H₂O).

Dentre os dois extratos ativos, o MeOH foi escolhido para posterior fracionamento. Esta escolha foi devido às características das moléculas presentes nesse extrato. Como pode ser observado na Figura 9, os extratos MeOH e H₂O foram analisados em CCDC e reveladas com LUV (254 nm), anisaldeído, DPPH e cloreto férrico. O anisaldeído mostra a possível presença de terpenos, o cloreto férrico a presença de substâncias com anéis aromáticos e o DPPH indica a presença

de moléculas antioxidantes. A presença destas classes químicas no extrato MeOH detectada pelas análises em CCDC incentivou o seu fracionamento.

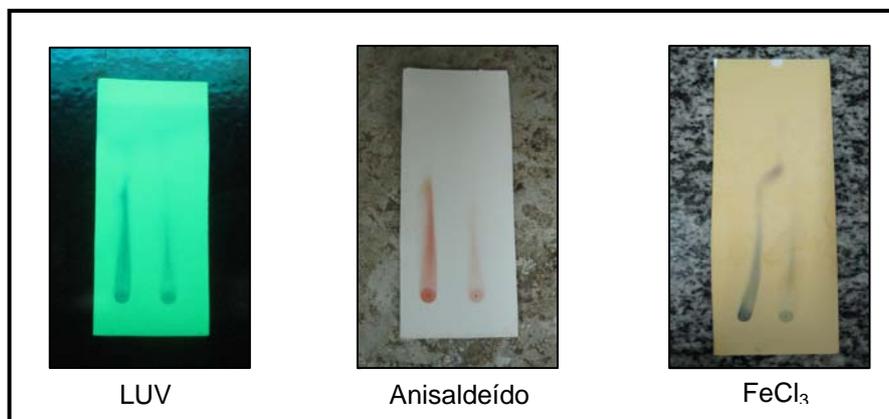


Figura 9. Revelação CCDC dos extratos MeOH e H₂O, respectivamente.

Além disso, o extrato MeOH foi revelado com cloreto de alumínio, o que indicou a presença de flavonóides nesse extrato (Figura 10). Vários trabalhos mostram que extratos vegetais e/ou suas frações, contendo flavonóides apresentam atividade antibacteriana contra várias espécies, inclusive *Aeromonas hydrophila* (KUETE et al., 2006; PEREIRA, et al., 2006; RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2007). Outra classe de substâncias detectada no extrato MeOH foi a dos terpenóides (Figura 11). Essa mesma classe já havia sido relatada em *Cecropia lyratiloba*, outra espécie da mesma família (ROCHA et al., 2007).

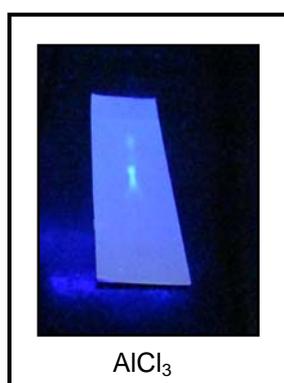


Figura 10. Revelação em CCDC do extrato MeOH.

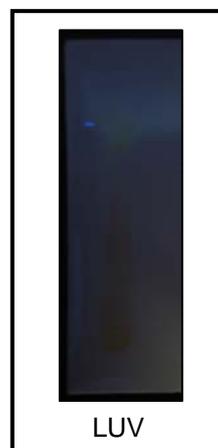


Figura 11. Revelação em CCDC do extrato MeOH.

Diversos estudos mostram que os extratos MeOH de várias espécies vegetais são constituídos por diversas substâncias que apresentam atividade antibacteriana. Dentre estas substâncias, além dos flavonóides, têm-se os triterpenóides, alcalóides, antraquinonas, dentre outras (CONEGERO, et al., 2003; KUETE et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

O teste de atividade antibacteriana por difusão em ágar é um teste qualitativo. A fim de obter um dado quantitativo, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima bactericida (CMB) do extrato metanólico, para uma melhor avaliação de sua atividade (Figura 12).

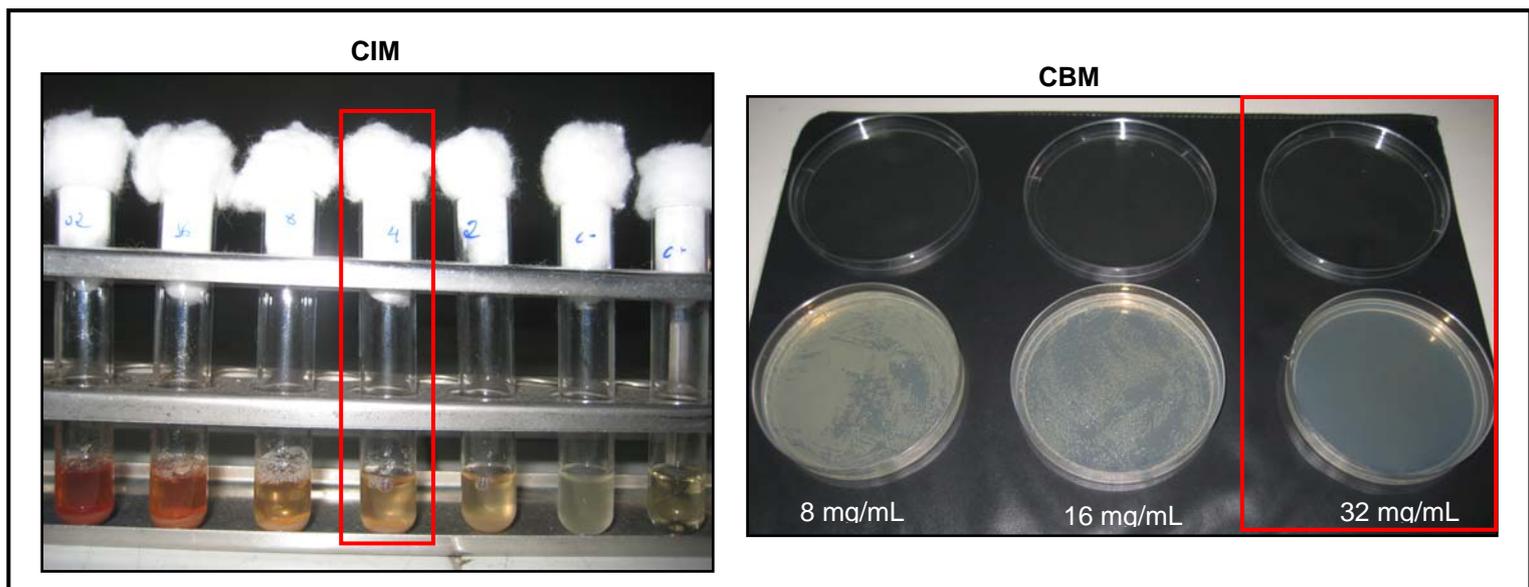


Figura 12. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração mínima bactericida (CBM) do extrato metanólico dos frutos.

A CIM foi avaliada entre as concentrações de 128 a 0,0625 mg/mL. A CIM obtida para o extrato metanólico foi de 4 mg/mL e a CBM foi de 32 mg/mL. Estes resultados indicam que o extrato MeOH possui tanto atividade bacteriostática quanto

bactericida, ou seja, tanto inibem o crescimento quanto possuem a capacidade de matar a bactéria.

Após o teste de atividade antibacteriana e determinação da CIM e CBM, o extrato MeOH dos frutos foi submetido ao fracionamento. Inicialmente foi submetido a uma partição que originou quatro fases, a diclorometânica (FDCM), a acetato de etila (FAcOEt), a butanólica (FBuOH) e a aquosa (FH₂O). Estas fases foram testadas quanto à atividade antibacteriana, onde todas as fases demonstram ser ativas (Figura 13). A FDCM apresentou baixa atividade (halo de inibição 5 mm), FAcOEt, FBuOH e FH₂O apresentaram média atividade (7 mm, 9 mm e 7 mm) respectivamente.

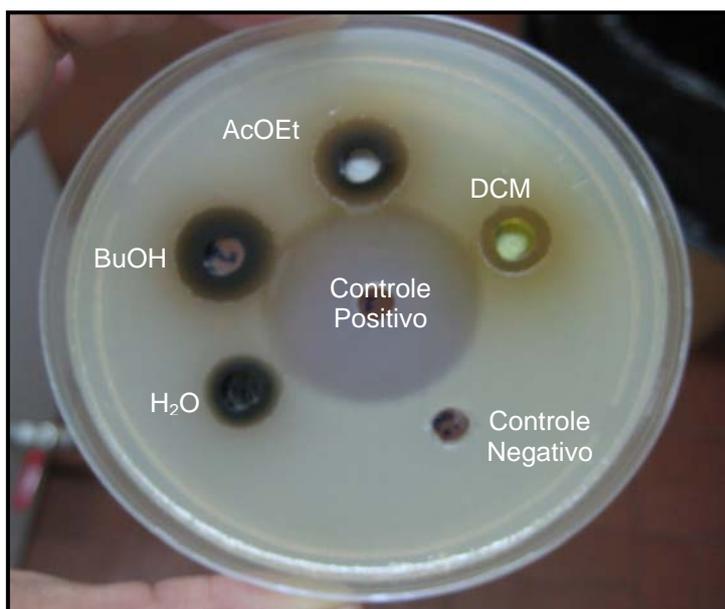


Figura 13. Atividade antibacteriana das fases da Partição.

As fases AcOEt, BuOH e H₂O foram analisadas em CCDC, utilizando como fase estacionária sílica e fase móvel (AcOEt/MeOH 8:2) e reveladas com LUV (254 e 365 nm), anisaldeído e cloreto férrico (Figura 14). A partir da análise das CCDC, verificou-se que a fase AcOEt apresentava melhor resolução para realizar o

fracionamento no sistema utilizado. Além disso, apresentava massa suficiente para seguir o fracionamento e os testes de atividade antibacteriana.

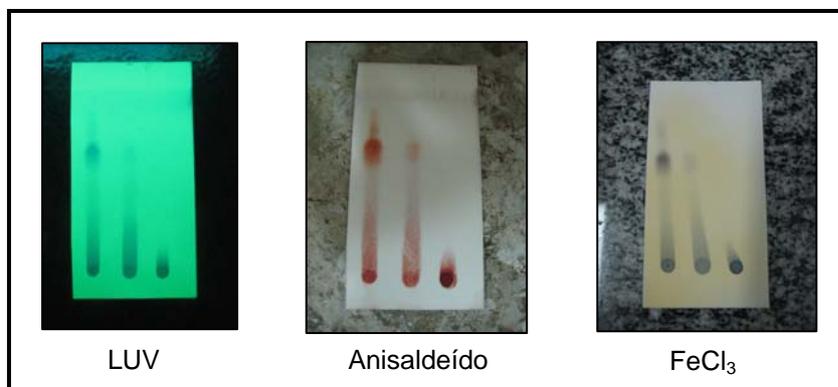


Figura 14. Revelação CCDC das fases da partição (FACOEt, FBUOH, FH₂O, respectivamente).

Para o fracionamento, parte da FACOEt foi submetida a uma CC, utilizando como fase estacionária florissil, e para eluição das substâncias, solventes com aumento crescente de polaridade (diclorometano, acetato de etila e metanol). Com isso, foram obtidas da coluna 86 frações, que foram analisadas através de CCDC, sendo as frações semelhantes, novamente reunidas. Ao final de todas as reuniões possíveis, restaram apenas 10 frações, das quais apenas quatro ([47-59], [60-71], [72-74], [75-86]), continham massa suficiente para realização dos testes de atividade antibacteriana e posteriormente, continuação do fracionamento. Foi realizado o teste de atividade antibacteriana então apenas destas quatro últimas frações (Figura 15).

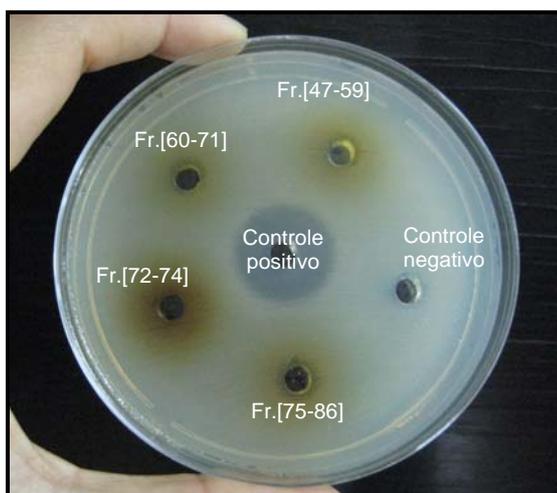


Figura 15. Atividade antibacteriana das frações da partição FAcOEt.

As frações obtidas do fracionamento da FAcOEt não apresentaram atividade antibacteriana. Esse resultado pode ser devido a dois fatores. Primeiramente algumas substâncias à medida que vão sendo purificadas, aumentam sua atividade, porém, outras substâncias têm sua atividade diminuída ou mesmo inativadas conforme vão sendo purificadas. A diminuição da atividade pode ser devida ao sinergismo existente entre diversas substâncias que compõem o vegetal e que lhe conferem uma determinada atividade biológica. O segundo fator pode ser devido a uma alta retenção da amostra na CC, onde o princípio ativo responsável pela atividade antibacteriana pode não ter sido eluído. Portanto, foi realizado um teste de atividade antibacteriana por bioautografia a fim de identificar a fração ativa, e confirmar se as substâncias ativas presentes não ficaram retidas na CC (Figura 16).

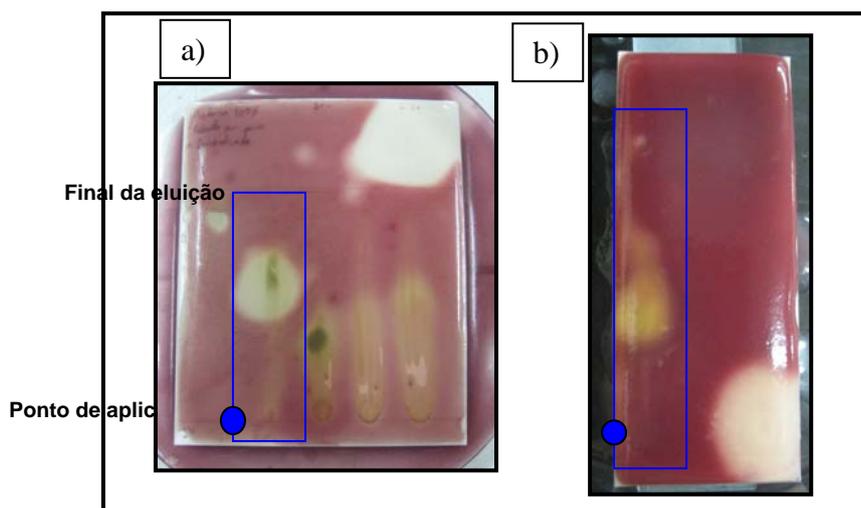


Figura 16. (a) Bioautografia da FAcOEt e antibiótico padrão, eluída com Acetona 100% e (b) FAcOEt e antibiótico padrão, eluída com AcOEt / MeOH 6:4.

A determinação da atividade antibacteriana por bioautografia da FAcOEt mostrou que as substâncias ativas presentes não ficaram retidas na coluna cromatográfica de Florisil. Uma vez que o adsorvente Florisil é menos polar que a sílica, espera-se que as substâncias fiquem ainda menos aderidas nele. Como o sistema de eluição da coluna foi um gradiente de AcOEt em DCM e depois de MeOH em AcOEt, e a placa cromatográfica do teste foi eluída com AcOEt/MeOH 6:4 e o halo de inibição do crescimento da bactéria está bem visível acima do ponto de aplicação da amostra na placa, confirma que as moléculas ativas não ficaram retidas na CC. Outra confirmação deste fato, foi obtida ao eluir outra placa com a FAcOEt com acetona, solvente menos polar que o MeOH, e mais uma vez, as substâncias ativas encontravam-se bem distantes do ponto de aplicação.

Outra hipótese então, é a possibilidade de haver sinergismo entre as substâncias presentes na FAcOEt. Para avaliar se isto ocorreu, foram feitos diversos testes de sobreposição das frações e nenhuma atividade antibacteriana foi observada.

A última hipótese sugerida, é que possa ter ocorrido degradação das substâncias ativas pelo tipo de fracionamento escolhido. Para comprovar se isto ocorreu, uma parte do extrato que não foi fracionada, deverá ser submetida a novo fracionamento, desta vez com outro adsorvente que não Florisil.

6. CONCLUSÃO

A partir da análise dos resultados observamos que, o extrato metanólico dos frutos de *C. asperifolia* subsp. *magnifolia* é ativo contra *Aeromonas hydrophila*, apresentando tanto atividade bacteriostática quanto bactericida.

A perda de atividade do extrato após seu fracionamento pode ser devido à degradação pelo sistema escolhido para o fracionamento. A possibilidade de sinergismo ou do material ativo ter ficado retido na coluna cromatográfica é mínima, uma vez que testes de avaliação do sinergismo e a bioautografia foram feitos e o material não se mostrou tão polar a ponto de ter ficado retido e nem apresentou sinergismo quando testado em blocos.

7. REFERÊNCIAS

AKINBOWALE, O.L.; PENG, H.; GRANT, P.; BARTON, M.D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30 p. 177–182, 2007.

ANDRADE-CETTO, A, WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 78, n. 2-3, p. 145-149, 2001.

ANSARY, A.; HANEEF, R.M.; TORRES, J.L.; YADAV, M. Plasmids and antibiotic resistance in *A. hydrophila*. **Journal of Fish Biology**, v.15, p.191-196, 1992.

BANSEMIR, A.; BLUME, M.; SCHRÖDER, S.; LINDEQUIST, U. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. **Aquaculture**, v. 252 p. 79–84, 2006.

BEHERA, B.C.; VERMA, N.; SONONE, A.; MAKHIJA, U. Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 776–784, 2008.

BETINA, V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. **Journal of Chromatography A**, v. 78 p. 41-51, 1973.

CHANG, B.J.; BOLTON, S.M. Adherence haemagglutination and cell surface characteristics of motile aeromonads virulent for fish. **Journal of Fish Diseases**, v.13, p.255-268, 1987.

CHRISTYBAPITA, D.; DIVYAGNANESWARI, M.; DINAKARAN MICHAEL, R. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23 p. 840-852, 2007.

CONEGERO, L.S.; IDE, R.M.; NAZARI, A.S.; SARRAGIOTTO, M.H.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V.; CARVALHO, J.E.; FOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 825-827, 2003.

COSCIA, C.J. **CRC Handbook of Chromatography Terpenoids**. Florida: CRC Press. Inc., vol.1, p.183, 1984.

CUNICO, M. M.; DIAS, J. G.; MIGUEL, M. D.; OBDULIO, G. M.; AUER, C. G.; CÔCCO, L. C.; LOPES, A. R.; YAMAMOTO, C. I.; MONACHE, F. D. Potencial antimicrobiano e alelopático das amidas isoladas do extrato das raízes de *Ottonia martiana* Miq. **Química Nova**, v. 29 p. 746-749, 2006.

DAS, B. K.; SAHU, S.; PRADHAN, J.; MOHAPATRA, B.C.; MISHRA, B.K.; SARANGI, N. Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in Labeo rohita fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 109-118, 2007.

DUBBER, D.; HARDER, T. Extracts of *Ceramium rubrum*, *Mastocarpus stellatus* and *Laminaria digitata* inhibit growth of marine and fish pathogenic bacteria at ecologically realistic concentrations. **Aquaculture**, v. 274, n. 2-4, p. 196–200, 2008.

ELLIS, A.E. General principles of fish vaccination. In: ELLI, A.E. (Ed.), **Fish Vaccination**. London: Academic Press, 1988.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Rome, 2005.

GHENGHESH, K. S.; EL-GHODBAN, A.; DKAKNI, R.; ABEID, S.; ALTOMI, A.; TAHRUNI, A.; MARIALIGETI, K. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 169-173, 2001.

HARIKRISHNAN, R.; NISHA RANI, M.; BALASUNDARAM, C. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. **Aquaculture**, v. 221, p. 41-50, 2003.

HATHA, M.; VIVEKANANDHAN, A.A.; JULIE JOICE, G.; CHRISTOL. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 131– 134, 2004.

HU, S. H.; WANG, J. C.; KUNG, H. F.; WANG, J. T.; LEE, W. L.; YANG, Y. H. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. **Kaohsiung Journal of Medical Science**, v. 12, p. 591-599, 2004.

JEFFREYS, M.F., GONÇALVES, R.T., LIMA, R.D., ABREU, A.C.A., SERUDO, R.L., PEREIRA JR., O.L., SARGENTINI JR., E, AMARAL, I.L., NUNEZ, C.V. Quantification of the antioxidant activity of *Coussapoa asperifolia magnifolia* (Trécul) Akkermans & C.C. Berg (Cecropiaceae) and *Brosimum parinarioides* Ducke (Moraceae). **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 348-351, 2006.

KIM, K. H.; HWANG, Y. J.; BAI, S. C. Resistance to *Vibrio alginolyticus* in juvenile rockfish (*Sebastes schlegeli*) fed diets containing different doses of aloe. **Aquaculture**, v.180, p. 13–21, 1999.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A. Effects of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res., Basel**, v. 2, p. 393-400, 2000.

KUBITZA, F. **Principais parasitoses e doenças dos peixes cultivados**. Jundiaí, SP. p. 108, 2004.

KUETE, V.; JEAN ROBERT NGUEMEVING,; V'ERONIQUE PENLAP BENGA,; ANATOLE GUY BLAISE AZEBAZE,; FRANC, OIS-XAVIER ETOA,; MICH`ELE MEYER,; BERNARD BODOD, AUGUSTIN EPHREM NKENGFAK. Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 109, n. 3, p. 372-379, 2007.

LANCINI, G.; PARENTI, F.; GALLO, G.G. **Antibiotics: A Multidisciplinary Approach**. New York: Plenum, 1995.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS A. C.; HENZEL, A.; WITT N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jabolão, (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, v. 2, p. 371-376, 2005.

MAHASNEH, A. M.; EL-OQLAH, A. A. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 271–276, 1999.

MALHEIROS, A.; PERES, M.T.L.P. **Alelopatia: Interações químicas entre espécies**. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (Eds) Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Ed. Argos: Chapecó, p. 502-523, 2001.

MURO, M. A.; LUCHI, M. R. **Preservação de microrganismos**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Toselo”. p. 65, 1989.

MUSEU PARAENSE EMÍLIO GOELDI. Biodiversidade da Amazônia Online. <http://www.museu-goeldi.br/biodiversidade/index.asp>. Acessado em: 12 de julho 2009.

NAVINER, M; BERGE, J.P. ; DURAND, P. ; LE BRIS, H. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. **Aquaculture**, v. 174, p. 15–24, 1999.

NOLDIN, V.F.; FILHO, V.C.; MONACHE, F.D.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivadas no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

NOVAES, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRACA, F.; GIULIETTE, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. 2003. Atividade antimicrobiana de alguns extratos vegetais de semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 5-7, 2003.

NUNEZ, C.V.; OLIVEIRA, M.L.; LIMA, R.D.; COLLANTES, I.E.; SARGENTINI JR, E.; PEREIRA JR, O.; ARAÚJO, L.M. Chemical analyses confirm a rare case of seed dispersal by bees. **Apidologie**, v. 39, p. 618–626, 2008.

OLIVEIRA, D.F.; PEREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CARVALHO, D.A.; SILVA, G.; NUNES, A.S.; ALVES, D.S.; CARVALHO, H.W.P. Carvalho. Antibacterial activity of plant extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v. 78, p. 142–145, 2007.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO S.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 165–168, 2002.

PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: Profilaxia, diagnóstico e tratamento**. 3. ed. Nupélia, Maringá, 301 p. 2008.

PELCZAR, J.R.; MICHAEL, J; CHAN, E.C.S; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Vol. 2 . 2. ed. São Paulo: MAKRON Books, p. 517, 1996.

PEREIRA, A.C; CARVALHO, H.W.P.; SILVA, G.H.; PRADO, N.R.T.; OLIVEIRA, D.F.; FIGUEIREDO, H.C.P.; CAVALHEIRO, A.J.; CARVALHO, D.A. Identificação de

uma das substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana de *Solanum aculeatissimum* Jacq. **29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

PETTIBONE, G.W.; MEAR, J.P.; SAMPSELL, B.M. Incidence of antibiotic and metal resistance and plasmid carriage in *Aeromonas* isolated from brown nullhead (*Ictalurus nebulosus*). **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p.234-240, 1996.

PLUMB, J.A. **Health maintenance of cultured fish**. Principal microbial diseases. USA: CRC, p.254, 1994.

RADU, S.; AHMAD, N.; LING, F. H.; REEZAL, A. Prevalence and resistance to antibiotics for *Aeromonas* species from retail fish in Malaysia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 261-266, 2003.

RASMUSSEN, H. B.; CHRISTENSEN, S. B.; KVIST, L. P.; KHARAZMI, A. & HUANSI, A. G. Absolute configuration and antiprotozoal activity of minquartynoic acid. **Journal of Natural Products**, v, 63, p. 1295-1296, 2000.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens. **Fitoterapia**, v. 78, p. 434–436, 2007.

RAUHA, J.P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 3-12, 2000.

RICHARDS, R.H.; ROBERTS, R.J. **The bacteriology of teleosts**. In: Roberts, R.J. Fish pathology. London : Baillien Tindall. p.183-204, 1978.

RIJKERS, G.T., TEUNISSEN, A.G., VAN OOSTERON, R., VAN MUISWINKEL, W.B. The immune system of cyprinid fish. The immuno-suppressive effects of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture**, v. 19, p. 177–189, 1980.

ROBERTS, R.J. **Motile Aeromonad Septicaemia**. In: Inglis, V.; Roberts,R.J.; Bromage, N.R. (Ed.). Bacterial disease of fish. Oxford: Blackwell Science, cap. 08: 143-155, 1993.

ROCHA, G.G.; MARISOL, S.; LÚCIO, K.A.; OLIVEIRA, R.R.; KAPLAN, M.A.C.; GATTASA, C.R. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both

sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7355–7360, 2007.

SAHA, D.; PAL, J. In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS-affected fishes in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 34, p. 311-316, 2002.

SAHU, S.; KUMAR DAS, B.; PRADHAN, J.; MOHAPATRA, B.C.; MISHRA, B.K.; SARANGI N. Effect of *Magnifera indica* kernel as a feed additive on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* fingerlings. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, p. 109-118, 2007.

SALTON, R.; SCHICK, S. *Aeromonas hydrophila* peritonitis. **Cancer Chemotherapy Reports**, v. 57, p. 489-491, 1973.

SANTOS, I.R. **Metabolismo básico e origem dos metabolitos secundários**. In: Simões, C.M.L.; Schenkel, E.P.; Gosmam, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Eds) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Vol. 5. Editora UFSC, p. 403-434, 2004.

SANTOS, A. L.; GRAEBNER, I. B.; MARQUES, D. M.; REGIANI, A. M. REGIANI; MORAIS, L. C. SARTORI, R. A.; FERNANDEZ, C. C.; RIBEIRO, S. M. A. Ensaio microbiológico dos extratos e frações da *Vismia guianensis*, Clusiaceae (Aubl.) Pers. **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

SHARIFF, M.; JAYAWARDENA, P. A. H. L.; YUSOFF, F. M.; SUBASINGHE, R. 2001. Immunological parameters of Javanese carp *Puntius gonionotus* (Bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 11, p. 281–291, 2001.

SHARMA, R. K. "Phytosterols: Wide-spectrum antibacterial agents." **Bioorg. Chem.**, v. 21, p. 49-60, 1993.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, p.598, 2004.

SISTI, M.; DE SANTI, M.; FRATERNALE, D.; NINFALI, P.; SCOCCIANI, V.; BRANDI, G. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 946–950, 2008.

SON, R.; RUSUL, G.; SAHILAH, A.M.; ZAINURI, A.; RAHA, A.R.; SALMAH, I. Antibiotic resistance and plasmid profile of *Aeromonas hydrophila* isolates from cultured fish, *Telapia* (*Telapia mossambica*). **Letters in Applied Microbiology**, v.24, p.479-482, 1997.

SOUZA, J. A.; SILVA-SOUZA, A. T. Bacterial community associated with fish and water from Congonhas river, Sertaneja, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 4, p. 373-381, 2001.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 60–64, 2004.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu, p. 792, 2001.

THUNE, R. L.; STANLEY, L. A.; COOPER, R.K. Pathogenesis of gram-negative bacterial infections in warmwater fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 3, p. 37-68, 1993.

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 893p, 2005.

VAN MUISWINKEL, W. B., ANDERSON, D. P., LAMERS, C.H.J., EGBERRS, E., VAN LOON, J.J.A., IJSSEL, J.P. **Fish immunology and fish health**. In: Manning, M.J. (Ed.), *Fish Immunology*. Academic Press, London, p. 1–8, 1985.

VENTURA, M. T.; GRIZZLE, J.M. Lesion associated with natural and experimental infections of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, v. 11, p. 397-407, 1998.

VIVEKANANDHAN, G.; SAVITHAMANI, A.K.; HATHA, A.A.M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, B.P. Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from marketed fish and prawn of South India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 165-168, 2002.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Boletim de Saúde**, v. 1, p. 4, 2004.

XIANG, W.; SONG, Q.; ZHANG, H.; GUO, S. Antimicrobial anthraquinones from *Morinda angustifolia*. **Fitoterapia**, v. 79, p. 501–504, 2008.

ZILBERG, D.; ABUTBUL, S.; GOLAN-GOLDHIRSH, A.; BARAZANI, O. Use of *Rosmarinus officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.). **Aquaculture**, v. 238, p. 97–105, 2004.