

Atividade antimicrobiana dos metabólitos produzidos pela *Bryophyllum calycinum* Salisb, frente os microrganismos *Proteus vulgaris* , *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus*.

1-Márcia Pinheiro de Amorim

2 - Andrey Azedo Damasceno

1-Aluna do 8º Período de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas - UEA/CEST;

2- Graduado em Ciências Biológicas, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Resumo

As folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb. (“Coirama”), Crassulaceae, têm sido usadas na medicina popular como emolientes para furúnculos, em queimaduras ou outros ferimentos, além de problemas respiratórios e gástricos. Por tanto a presente pesquisas, teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, frente a bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* e Gram negativas *Proteus vulgaris* , *Escherichia coli*. A Coleta Botânica foi realizada no município de Tefé-AM, os exemplares foram desidratados á 35⁰C por 48 horas, sendo triturados em liquidificador industrial, para cada 30 gramas do material triturado foi acrescido 250 ml do solvente álcool 70%, utilizando como extrator o Soxhlet. Para o extrato a frio utilizou-se as mesmas proporções de material biológico e de solvente deixado em repouso por um período de 48h em um recipiente âmbar. As diluições dos extratos utilizadas foram 0,4 µg para ambos e diluídas em 20µl de DMSO, posteriormente acrescido 1,96 ml de água destilada. Os microrganismos foram cultivados meio nutriente (NA), por 24h em estufa á 37⁰C . O crescimento das bactérias foi ajustado a partir da escala de Mac Farland, utilizando-se o tubo 0,5 da mesma concentração padrão, o que equivale a 1,5x10⁸ bactérias/ml. As cepas de *E. coli*, e *S. aureus* e *P. vulgaris* foram semeadas nas placas de Petri 90x15mm contendo meio nutriente Mueller Hinton. O experimento foi realizado em triplicata, foi adicionado em 80 µl dos microrganismos a serem avaliados nas placas de Petri 90x15mm e semeados com uma alça de Drigalsk. Utilizou-se a técnica de difusão de discos de ± 0,5 cm foram usados 4 discos por placa, em três adicionou-se 60 µl do extrato a ser avaliada e no quarto o grupo controle adicionou-se 60 µl de DMSO como controle negativo, posteriormente as placas foram a B.O.D. a temperatura de 37 °C por 24h para a observação de atividade do extrato. De modo geral os extratos avaliados mostraram-se eficientes frente aos microrganismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*, Ressalta-se entretanto que os melhores resultados foram frente aos microrganismos Gran-negativos *Escherichia coli*, isso para ambas as técnicas de extração.

Palavras-Chaves: Antimicrobiano; metabólito; Amazônia.

ABSTRACT

Antimicrobial activity of metabolites produced by *Bryophyllum calycinum* Salisb front microorganisms *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. The leaves of *Bryophyllum* *Bryophyllum calycinum* Salisb. ("Coirama"), Crassulaceae, have been used in folk medicine as emollient for boils, burns or other injuries, and respiratory problems and gástricos. Por both hereto research aimed to evaluate the antimicrobial activity against Gram positive *Staphylococcus aureus* and Gram negative bacteria *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*. The Botanical Collection was held in the city of Tefé-AM, the specimens were dehydrated will 350C for 48 hours, being crushed in industrial blender, For every 30 grams of crushed material was added 250 ml of 70% ethanol solvent, such as using the Soxhlet extractor . To the cold extract was used the same proportions of biological material and solvent allowed to stand for a period of 48 hours in a container âmbar. As dilutions of the extracts were used for both 0.4 mg and diluted in 20µl of DMSO subsequently plus 1.96 ml water destilada. Os microorganisms were cultivated nutrient medium (NA) for 24h in an oven at 370C. The growth of bacteria was adjusted from the range of Mac Farland, using the same tube of 0.5 standard concentration, equivalent to 1.5×10^8 bacteria / ml. The strains of *E. coli* and *S. aureus* and *P. vulgaris* were sown in Petri dishes containing nutrient medium 90x15mm Mueller Hinton. O experiment was performed in triplicate, was added at 80 l of microorganisms to be evaluated in Petri dishes and seeded with a 90x15mm handle Drigalsk. It was used the technique of diffusion disks ± 0.5 cm were used four disks per plate, were added in three 60 l of extract to be evaluated and fourth control group was added 60 l of DMSO as negative control later the plates were Boda temperature of 37 ° C for 24 hours for observation of activity of the extract. Generally the extracts evaluated were effective against microorganisms *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris*, should be noted however that the best results were against microorganisms Gran-negative *Escherichia coli*, that for both extraction techniques.

INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintético” (VEIGA JÚNIOR, 2005). Segundo Carvalho et al. (2007) plantas medicinais são aquelas que possuem tradição de uso em uma população ou comunidade e são capazes de prevenir, aliviar ou curar enfermidades. Ao serem processadas para a obtenção de um medicamento, tem-se como resultado o medicamento fitoterápico. A fitoterapia pode ser historicamente definida como a ciência que trata dos problemas de saúde, utilizando os vegetais, sendo contemporânea ao início da civilização. As plantas são tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de doenças e pragas (LAVABRE, 1993).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de plantas do mundo, contando com um número estimado de mais de 20% do número total de espécies do planeta. O País possui a mais diversa flora, número superior a 55 mil espécies descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (BRASIL, 2006; CARVALHO et al. 2007).

A *Bryophyllum calycinum* Salisb, conhecida popularmente como Courama ou Coirama, é uma planta de região tropical da África do Sul (MIGUEL 2009). Muito utilizada na medicina popular de indígenas e populações ribeirinha na região do Baixo Amazonas. A courama é utilizada no tratamento de conjuntivite, puxar furúnculos, bronquite, asma, gastrite, combater caspa a seborréia e fortalecer os cabelos, inflamação urinaria, ferida no útero, corrimento vaginal, cólicas menstruais, excesso e escassez da menstruação e transtorno da menopausa. Com isto esta planta apresenta grande importância para a população do Baixo Amazonas. Evolutivamente as plantas vêm desenvolvendo complexos sistemas adaptativos, muitos destes somente possíveis, graças às interações com microrganismos. Destes microrganismos destacam-se os endofíticos que, em pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, habitam o interior de tecidos vegetais, sem causar dano aparente aos mesmos. Eles são geralmente fungos e bactérias que desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta com o meio (PEIXOTO NETO et al. 2004). Estudos realizados por Stierle et al. 1993, despertaram, mais ainda o interesse na microbiota endofítica relacionada com plantas medicinais, uma vez que os mesmos conseguiram comprovar que um fungo endofítico o *Taxomyces andreane* de *Taxus brevifolia* Nutt, é capaz de produzir o complexo

diterpenóide, Taxol, utilizado no combate de vários tipos de câncer, e já movimentou mais de nove bilhões de dólares (GAO, 2003). Em trabalhos posteriores comprovou-se que outros gêneros de fungos são capazes de produzirem taxol e outros compostos de importância biológica como: *Acremonium* SP. Isolado de *Taxus baccata*, produz leucinostatina, anticâncer e antifúngico (STROBEL et al. 1997), *Cytonaema* sp. Isolado de *Taxus wallachiana*, produz ácido citônico A e B, inibidor de protease (GUO et al. 2000).

MATERIAL E MÉTODO

A presente pesquisa foi desenvolvida no Município de Tefé-Am, no laboratório de biologia do Centro de Estudos Superiores de Tefé (CEST). As coletas do material botânico *Bryophyllum calycinum* Salisb, foi realizada no mês de agosto na estrada da Agrovila Km 6, posteriormente foi enviada uma amostra excicata para o herbário da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), para identificação botânica.

PREPARO DOS EXTRATOS

Foi utilizado como solvente álcool 70% para retirada dos componentes bioativos presente nas folhas. Após a coleta do material estes foram selecionados e desidratados à temperatura de 35⁰ C na estufa por 48 horas, posteriormente foram triturados em liquidificador industrial e passados em peneira de 60 mesh para homogeneizar a amostra, para cada 30 gramas do material biológico triturado foi acrescido 250 ml do solvente e utilizado como extrator o Soxhlet para extração a quente dos compostos bioativos, a extração leva em média 4 horas. Para o extrato a frio utilizou-se as mesmas proporções de material biológico e de solvente (30g para 250 ml) e deixado em repouso por um período de 72 h em um recipiente âmbar, para evitar possíveis reações com a luz. Os extratos obtidos foram concentrados em fluxo forçados em capela de exaustão em temperatura ambiente 28 – 30° C, até se obter um concentrado. Essa metodologia foi descrita pela primeira vez por Smânia (2003). Posteriormente os extratos foram pesados, etiquetados e armazenados em um dessecador por 48h, até as diluições dos bioensaios.

BIOENSAIO

As diluições dos extratos utilizadas nos bioensaios foi de 0,4 µg para ambos e diluídas em 20 µl de DMSO, posteriormente acrescido 1,96 ml de água destilada. As cepas bacteriológicas foram cedidas pelo laboratório de microbiologia da UEA-MBT (Universidade do Estado do Amazonas – MBT- Mestrado em Biotecnologia). Os microrganismos foram

semeados em tubos de ensaios contendo meio nutriente (NA) (glicose, peptona e caldo de carne), para o crescimento e mantidas em estufa á 37⁰C por 24h. Após o crescimento das bactérias o inóculo foi ajustado a partir da escala de Mac Farland, utilizando-se o tubo 0,5 da mesma concentração padrão, o que equivale a 1,5x10⁸ bactérias/ml. As cepas de *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris* foram semeadas nas placas de Petri 90x15mm contendo meio nutriente Mueller Hinton. Para preparar o meio utilizou-se 38 gr para 1000 ml de água destilada, posteriormente foi alto-clavado a 1atm por 20 min. a 121⁰ C, após a esterilização o mesmo foi vertido em placas de Petri 90x15mm previamente esterilizadas. O experimento foi realizado todo em triplicata, inoculou-se em 80 µl dos microrganismos a serem avaliados nas placas de Petri e com a utilização de uma alça de Drigalsk os mesmos foram plaqueados e separadas. Após esterilizar discos de difusão de ± 0,5 cm utilizou-se 4 discos por placa, onde em três adicionou-se 60 µl do extrato a ser avaliada e no quarto o grupo controle adicionou-se 60 µl de DMSO como controle negativo, em seguida as placas foram levadas a B.O.D. á temperatura de 37 °C por 24h para a observação de atividade do extrato nos microrganismos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

De acordo com os ensaios realizados, com as cepas testadas, evidenciou-se que de modo geral todos os tratamentos avaliados foram sensíveis os extratos da *Bryophyllum calycinum Salisb.* (Figura 02)

Tabela 01: Atividade antimicrobiana dos extratos da *Bryophyllum calycinum Salisb* exercida sobre os microrganismos *Proteus vulgaris* , *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus*.

Atividade Antimicrobiana	Bactéria	Halo (mm)
E x t r a t o a F r i o	<i>E.coli</i>	10,2
	<i>S.aureus</i>	7,5
	<i>P.vulgaris</i>	7,8
E x t r a t o S o x h l e t	<i>E.coli</i>	10,4
	<i>S.aureus</i>	7,5
	<i>P.vulgaris</i>	6,4

Vale salientar que no bioensaio de mensura a sensibilidade dos microrganismos Gram-positivo *S.aureus* foram obtidos resultados semelhante 7,5 mm de halo (Tabela 01), Mesmo com uso de técnicas de extração distintas.

Para o biensaio que com a cepa Gram-negativa *P.vulgaris* , este evidenciou uma ligeira diferença entre as técnicas de extração , para a técnica com o extrator Soxhlet mostrou-se inferior , quando comparados com a técnica de extração a frio, onde obteve-se halos de 6,4 e 7,5mm respectivamente. Isso, possivelmente em função do aparelho extrator soxhlet interferir causando alterações na estrutura conformacional das moléculas avaliadas ou ainda o extrato não difundir no meio de cultura. Ressalta-se, entretanto que o aquecimento contínuo do extrato pode levar a decomposição química das substâncias termicamente ou quimicamente instáveis e de baixa polaridade (HOSTETTMANN et. al; 1996).

Os processos de extração utilizados na presente pesquisa também merecem algumas considerações , os melhores resultados foram com obtidos com as cepas Gram-negativas *Escherichia coli*, atingindo halo de inibição de aproximadamente 10,3 mm, isso independentemente do extrator utilizado na presente pesquisa, evidenciado na (figura 02). Ressalta-se ainda que a composição da parede celular ,varia de acordo com o tipo de bactéria e origina diferenças de permeabilidade aos compostos, influenciando diretamente na ação do antibacteriano. O tamanho molecular e a estrutura química do antibacteriano também determinam e influenciam no seu modo de ação (Perez-Trallero e Iglesias, 2003; Bomono e Szabo, 2006).

Nos microrganismos Gram-negativos existem duas membranas, uma na face externa da parede celular e outra na face interna. Assim drogas com baixa lipossolubilidade têm maior dificuldade em agir sobre as bactérias Gram-negativas por causa da membrana externa (Fluhr et al., 2010). Contudo existem proteínas na membrana externa das bactérias Gram-negativas, denominadas porinas, que podem facilitar a passagem de substâncias para o espaço periplasmático (Eumkeb et al., 2010).

Outro ponto que merece nossas considerações é que exemplares pertencente a esta família apresentam substâncias químicas da planta são: flavonóides, cálcio, ácido succínico, ácido málico, triterpeno, esteróis, ácido cítrico e ácido láctico (GAIND e GUPTA,1973).

As folhas frescas de pirarucu são utilizadas na fitoterapia, com finalidade analgésica, antialérgica, antiartrítica, antibacteriana, antidiabética, antifúngica, antiinflamatória tópica, antilítica, anti-séptica, bactericida, cicatrizante, depurativa, diurética, emoliente e hemostática (NASSIS et al. 1992; ALMEIDA et al. 2000). É uma planta conhecida por ação cicatrizante e refrescante. As folhas frescas, quando tostadas são úteis nas cefalalgias, através da infusão das mesmas, ela é usada para combater os ergogitamentos linfáticos e inchaços por erisipela nas

pernas. O suco é usado contra calos, frieiras e queimaduras (ALBUQUERQUE, 1989). Madaleno (2007) cita o pirarucu como a planta medicinal mais cultivada em jardins e hortos de Belém.

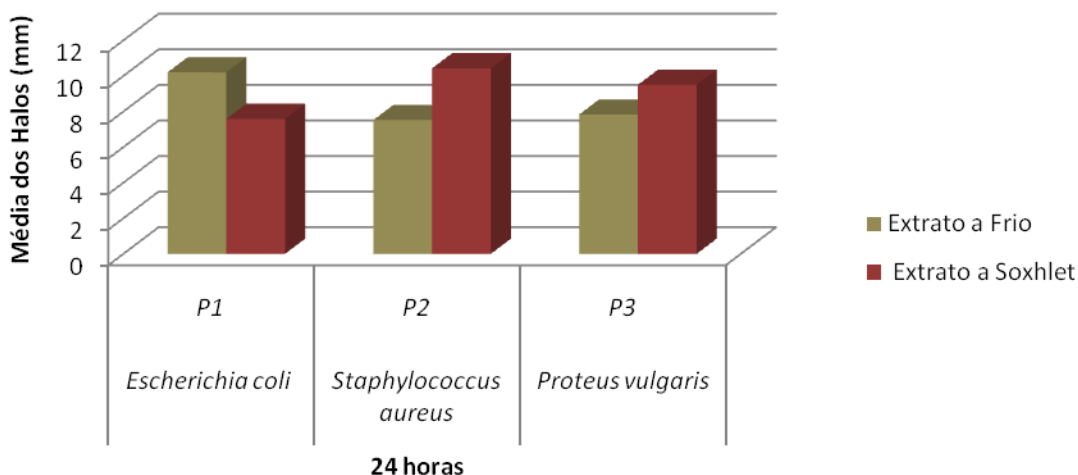
Ribeiro et al. (2009) observaram atividade antimicrobiana do extrato de *Bryophyllum calycinum* contra *S. aureus* e não revelaram atividade contra o fungo leveduriforme *C. albicans*.

Na determinação da concentração inibitória mínima, o extrato de pirarucu foi ativo até a concentração de 250 mg/mL frente a *P. aeruginosa* e 500 mg/mL contra *S. aureus*. Resultado também demonstrado em nossos experimentos, no entanto em uma concentração bem menor, o que sugere estudos futuros a fim da formulação de um produto final.

Da Silva (2007) também demonstrou atividade antibacteriana da folha de pirarucu frente a *S. aureus* resistente a meticilina. Resultados distintos dos atingidos na presente pesquisa, pois o micro-organismo *S. aureus*, foi sensível aos extratos avaliados, isso provavelmente em função de utilizarmos cepas não resistentes e ainda diferentes solventes para a retirada dos metabólitos.

Nassis et al. (1992) afirmaram que a planta possui várias propriedades medicinais como: analgésica, antibacteriana, antifúngica e antisséptica.

Sensibilidade dos Microrganismos aos extratos



As substâncias químicas da planta são: flavonóides, cálcio, ácido succínico, ácido málico, triterpeno, esteróis, ácido cítrico e ácido láctico (GAIND e GUPTA, 1973).

Menezes et al. (2009) não observaram atividade antifúngica do extrato de *Bryophyllum calycinum* (pirarucu) sobre *C. albicans*. Nassis et al. (1992) afirmaram que a planta possui várias propriedades medicinais como: analgésica, antibacteriana, antifúngica e antisséptica.

Resultados semelhantes também foram mensurados na presente pesquisa, corroborando assim com a literatura citada . Por tanto, as substâncias muito polares não podem sofrer tanto efeito da temperatura o que nos leva a considerar que por esse método de extração o efeito das mesmas é potencializado pelo aumento da concentração do extrato testado. Isto é de certa forma corroborada pelo melhor resultado que obtivemos no teste de atividade frente ao micro-organismo.

Os resultados obtidos neste trabalho devem ser incrementados em trabalhos futuros, como por exemplo, a utilização de outros solventes, metodologias e processos de extração dos metabolitos no sentido de detectar e purificar esses metabólitos que apresentam atividades antimicrobianas. Vale salientar ainda que foram utilizados extratos brutos por tanto urge a necessidade da busca contínua de novas substâncias, com o emprego da biotecnologia são vitais para proteger a saúde humana contra as bactérias resistentes e ainda na justificativa da manutenção da biodiversidade.

CONCLUSÃO

- De modo geral os extratos avaliados mostraram-se eficientes frente aos microrganismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*
- Ressalta-se ainda que a melhor atividade antimicrobiana foi atingida pelo extrato que usa a técnica de extração a frio frente aos microrganismos *Escherichia coli* , isso em ambas as técnicas de extração.
- Os melhores resultados foram obtidos com a cerpas de bactérias gram - negativa. *E. coli*, isso em ambas as técnicas de extração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas tóxicas no jardim e no campo**. Belem: Ministerio da Agricultura - FCAP Servicos de Documentacao e Informacao, 1980, 120p.
- ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. Sao Paulo: Hemus, 1993. p.225-226.ÁLVAREZ, E.R. et al. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos espécies del género *Vismia* (Gutiferae). **VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacêutica**, Universidad de Antioquia, Medellín, Colômbia, v. 15, n. 1, p. 165-172, 2008.
- BRASIL, PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinai s e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 23 jun. 2006.
- CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, NS. M.S.A.Q.;NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos.T&C Amazônia, Ano. V, n. 11, Jun. 2007.
- DA SILVA, J.G. Avaliação do potencial farmacológico de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.
- EUMKEB G., SAKDARAT S., SIRIWONG S. (2010) Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine. Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 29: 345-8.
- FLUHR J. W., DEGITZ K. (2010) Antibiotics, azelaic acid and benzoyl peroxide in topical acne therapy. *J DtschDermatolGes*. 1:24-30.
- GAIND, K.N.; GUPTA, R.L.P. Flavonoid glycosides from *Kalanchoe pinnata*. *Planta medica*, v. 20, p. 368-373, 1971.
- GAO. Technology transferi m taxol development. United States General Accounting
- GUPTA, D.; SINGH, J. Flavonoid glycosides from *Cassia alata*. *Phytochemistry* v.30, p. 2761- 2763, ago. 1991
- HOSTETTMANN,K; MARSTON,A; HOSTETTMANN,M; **Preparative Chromatography Tecni que. Applications in Natural products**. 2ed.switerland:springer Co.1997.

LAVABRE, M. Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Record; 1993.

MADALENO, I.M. Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a La globalización de Las prácticas de cura. **Cuadernos Geográficos**, 41 (2), 61-95, 2007.

MENEZES, R.O.A. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. Revista de Odontologia da UNESP, São Paulo, v. 38, p.184-191, set.2009.

MIGUEL C.; Delamare A. P. L.; Andrade L. B.; Laguna S. E.; Swapna, P.L.; Kannabiran, K. (2009). Atividade Antimicrobiana de Glicoalcalóides e Extratos de Espécies Nativas de *Solanum*. *XVII Encontro de Jovens Pesquisadores*, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.

NASSIS, C.Z.; HAEBISCH, E.M.A.B.; GIESBRECHT, A.M. Antihistamine activity of *Bryophillum calycinum*. Braz J Med Biol Res. 25:929-36. 1992.

PEIXOTO NETO, P. A. S., AZEVEDO, J. L., CAETANO, L. C. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS: STATUS ATUAL E PERSPECTIVAS. Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Julio, vol.3, número 004, Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica, Santiago-Chile, PP.69-72.

RIBEIRO, C.M. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas medicinais da Amazônia. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

STIERLE, A., STROBEL, G. A. and STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane*. Science. V. 260, 214-216p, 1993. STROBEL, G. A.

SMÂNIA, A. JR.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, EFA; GIL, ML; BENCHETRIT, LC; CRUZ, FS **Antibacterial actividade de uma substância produzida pelo fungo *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.** *J. Ethnopharmacil.* 45.177-181, 2003.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants; safecure? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, set. 2005.