

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO *Heliotropium indicum* L. FRENTE AOS MICRORGANISMOS *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*.

¹Eliénias Barbosa de Souza

²Andrey Azedo Damasceno

¹ Graduando de Licenciatura em Ciências Biológicas – Universidade do Estado do Amazonas, Centro de Estudo Superiores de Tefé, 69470-000, Tefé-Am, Brasil.

²Doutorando em Biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM

Resumo

As plantas são utilizadas para os mais variados fins, e entre os principais está a sua utilização como medicamento, devido a essa propriedade as plantas têm se tornado alvo de estudo dos laboratórios das indústrias farmacêuticas e Universidades para o isolamento de novos princípios ativos, os quais podem ser utilizados na produção de novos fármacos. Além disso, um grande número de pessoas utiliza plantas medicinais como recurso terapêutico, seja por opção ou porque este é o seu único recurso. Por tanto o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade dos Micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*, frente aos metabólitos produzidos pela espécie *Heliotropium indicum* L, estes obtidos a partir de diferente técnicas de extração de seus metabólitos. A Coleta foi realizada no bairro do Abial, no Município de Tefé-AM, estes foram desidratados á 35⁰C por 24 horas, sendo triturados em liquidificador industrial, Para cada 40 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 72h em um recipiente âmbar. As diluições dos extratos utilizadas foram 0,4 µg para ambos e diluídas em 20µl de DMSO e posteriormente acrescido 1,96 mL de água destilada, sendo avaliados utilizando a técnica de difusão de discos. 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 Gram-negativos *Escherichia coli*, isso para ambas as técnicas de extração.

Palavras-chaves: *Heliotropium indicum* L; Extratos; Antimicrobiano

Abstract

Plants are used for various purposes, and is among the top its use as a medicine, due to this property the plants have become the subject of study from the laboratories of pharmaceutical industries and universities for the isolation of new active principles, which can be used in the production of new pharmaceuticals. Moreover, a large number of people use medicinal plants as a therapeutic resource, either by choice or because this is your only recourse. Therefore the present study was to evaluate the sensitivity of micro-organisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris*, compared to metabolites produced by species *Heliotropium indicum L*, obtained from these different techniques for different extraction technique metabolites. The Gathering was held at the abial neighborhood in the city of Tefé-AM, they were dehydrated will 35⁰C for 24 hours, being crushed in industrial blender, For every 30 grams of crushed material was added 250 ml of 70% ethanol solvent, using as 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 0.2 µg and diluted in 20µl of DMSO and subsequently plus 1.96 ml distilled water, and were evaluated using the disc diffusion technique. 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 µ 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 µ l of extract to be evaluated and fourth control group was added 60 µ 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 Gram-negative *Escherichia coli*, that for both extraction techniques.

Keywords: *Heliotropium indicum L*; **Extracts; Antimicrobial**

INTRODUÇÃO

As primeiras evidências do uso de plantas com fins terapêuticos datam de 460 a.C. No entanto, as primeiras informações sobre o uso sistemático de plantas como medicamentos datam da Índia Antiga (OLIVEIRA, 1986 & CARVALHO, 2002).

No Brasil, assim como em vários outros países da América Latina, a fitoterapia constitui uma alternativa econômica quando relacionada aos medicamentos alopáticos (CARVALHO, 2002). De modo que, nos últimos anos, a fitoterapia atingiu um notável crescimento, assim como, também, o estudo dos metabólitos secundários ou metabólitos especiais produzidos pelas plantas, os quais desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da química sintética. Sobre este prisma, a busca de novos compostos vegetais com ação antimicrobiana se apresenta como um modelo experimental, ecologicamente correto, para se produzir substâncias que sejam eficazes e menos agressivas ao meio ambiente e aos homens, contribuindo, assim, com a melhoria da qualidade de vida (CONSERVA, 1985).

A vasta biodiversidade vegetal pode ser uma forma alternativa no combate as infecções microbianas (LOCHER, 1995). Contudo, os avanços nessa área têm esbarrado na carência de dados referentes à forma de uso, vias de administração, a ação biológica, composições químicas e controle de qualidade. Atualmente, muitas cepas são resistentes a quase todos antimicrobianos e a perspectiva de aparecimento de uma cepa resistente a todos os antimicrobianos constitui uma séria preocupação (SCHAECHTER, 2002). A necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas para serem estudadas no combate a esses microrganismos representam um desafio no tratamento de infecções (PEREIRA, 2004).

A *Heliotropium indicum* L. (Boraginaceae) é um subarbusto que atinge até 70 cm de altura, é amplamente distribuído geograficamente. A espécie é conhecida como fedegoso na região norte e nordeste. Alcalóides pirrolizidínicos são considerados de interesse farmacológico, biológicas e funções quimiotaxonômico grande (J. ETHNOPHARMACO, 2002 & FITOQUÍMICA 1988). Estes metabólitos têm sido isolados a partir de uma grande variedade de plantas, especialmente de gêneros pertencentes à família Boraginaceae, uma fonte que é bem conhecida de alcalóides tais e outros compostos menores, tais como flavonóides e derivados aromáticos geranílicos, é

constituída de cerca de 250 espécies representadas por ervas e arbustos, distribuídos por todo o globo terrestre GONZÁLEZ-COLONA, (2001).

Diante do potencial biológico desta espécie este trabalho objetiva avaliar a sensibilidade dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*, aos extratos hidroalcolólicos obtidos a partir da espécie *H. indicum L.*

MATERIAL E MÉTODO

Para a realização do presente trabalho as coletas de *H. indicum L.*, foram realizadas no Bairro do Abial, Município de Tefé-Am, entre os meses agosto e setembro de 2012.

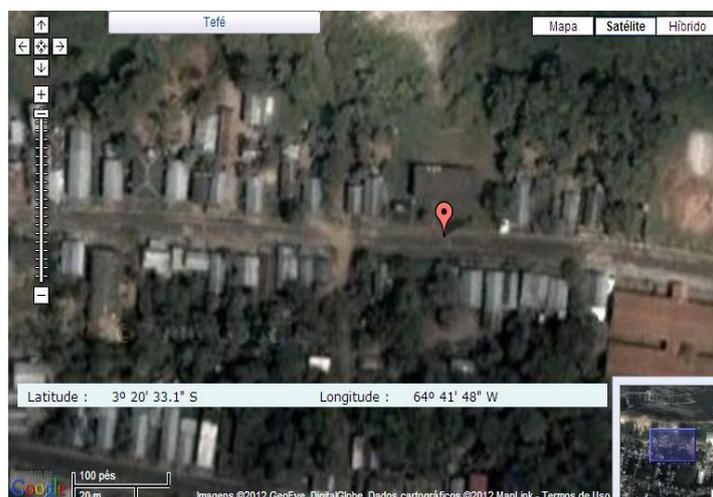


Figura 01: imagem do local de coleta do *Heliotropicum indicum L.* Tefé – Am.
Fonte: Google Earth.

Os espécimes obtidos foram processados segundo os métodos usuais em taxonomia vegetal (Bridson & Forman 1998) e incorporados ao Herbário da universidade Federal do Amazonas - UFAM. A presente pesquisa foi desenvolvida no Cento de Estudos Superiores de Tefé (CEST-UEA), no laboratório de Biologia. Foi utilizado como solvente álcool 70% para retirada dos componentes bioativos presente na folhas dos espécimes. Após a coleta do material estes foram previamente selecionados e desidratados á temperatura de 35⁰C na estufa por 24 horas, posteriormente foram triturados em liquidificador industrial e passados em peneira de 60 mesh. Para cada 40 gramas do material biológico triturado foram acrescido 250 ml do

solvente e utilizado como extrator o Soxhlet para extração a quente dos compostos Bioativos, o período de extração leva em média 8 horas de duração. Para o extrato a frio utilizaram-se as mesmas proporções de material biológico e de solvente (40g 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 até as diluições dos bioensaios.

BIOENSAIO

A diluição dos extratos utilizada 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 é 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 *E. coli*, e *S. aureus* foi semeadas nas placas de Petri 90x15mm contendo meio nutriente Mueller Hinton. Para preparar o meio utilizou-se 38 gr para 1000ml 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. Posteriormente, inoculou-se 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

Tabela 01: Avaliação da atividade antimicrobianas folhas da *Heliotropium indicum L.* frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*. Após 24h de exposição.

Atividade Antimicrobiana	Bactéria	Halo (mm)
E x t r a t o a F r i o	<i>E.coli</i>	10,4
	<i>S.aureus</i>	7,1
	<i>P.vulgaris</i>	7,2
E x t r a t o S o x h l e t	<i>E.coli</i>	9,3
	<i>S.aureus</i>	5,4
	<i>P.vulgaris</i>	5,1

O teste de sensibilidade antimicrobiana, utilizando as folhas do referido exemplar da *H. indicum L.*, foram realizadas utilizando diferentes agentes patogênicos, (Tabela01).

O Brasil é um dos países mais ricos em biodiversidade vegetal e um grande fornecedor deste tipo de matéria-prima, porém o desenvolvimento tecnológico de medicamentos fitoterápicos no país ainda é incipiente, necessitando de um controle de qualidade mais rigoroso e eficiente. Várias empresas nacionais empregam matéria-prima vegetal diretamente na elaboração de seus medicamentos. No Brasil 20% da população é responsável por 63% do consumo dos medicamentos fitoterápicos disponíveis DI STASI, (1996). Atualmente, o uso de plantas medicinais tem despertado o interesse de órgãos governamentais na tentativa de utilizar esses produtos como recurso terapêutico, porém é essencial que o medicamento fitoterápico passe por todo processo de avaliação da eficácia, toxicidade, testes microbiológicos, ou seja, um rigoroso controle de qualidade para depois ser comercializado como produto terapêutico. A resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada como um problema inerente à terapia antimicrobiana, por este motivo é preciso sempre à busca de novas fontes terapêuticas os quais sejam mais eficientes para o tratamento de infecções, como as bacterianas. Os produtos naturais são uma alternativa extremamente viável,

uma vez que sempre foram importantes para o descobrimento de novas drogas, sendo fornecedoras de princípio ativo e por ser também uma alternativa mais econômica no controle de doenças para países em desenvolvimento, onde a maioria das drogas é importada XU & LEE,(2001).

Pode-se observar que de modo geral, os microrganismos foram sensíveis ao extrato avaliados. No entanto cabe mencionar que para os extratos obtidos com a técnica de extração a Frio.

Os resultados foram mais expressivos atingindo halos de inibição de 10,4 mm, para a cepa patogênica Gram-negativa *E. coli*, e para *S. aureus*, com média aproximadamente de 7,1mm, resultado discretamente inferior foi mensurado para *Proteus vulgaris*, com media de halos de 5,1 mm. Os resultados aqui apresentados também corroboram com outra avaliação prévia da ação antimicrobiana do extrato metabólico obtidos por MACIEL (2011), que obteve resultados 7,8mm de inibição, estes inferiores, quando comparados com a presente pesquisa (Tabela 01).

A partir da espécie *H. indicum L*, foram isolados os compostos lupeol, β -sitosterol, β -sitosterol glicosilado, β -amirina glicosilado PANDEY *et al.*, 1996; SINGH *et al.*, (2003).

Entretanto, o ponto merece também nossas considerações, como a espécie em estudo neste trabalho (*H. indicum*), possui a substância amirina na sua composição (SINGH *et al*, 2003), sugere-se que esta substância possa contribuir para a atividade antimicrobiana. A importância do extrato bruto de *H. indicum L*. em apresentar inibição no crescimento da cepa de *S. aureus* está relacionado principalmente ao fato dessa espécie de bactéria ser responsável por causar abscessos e várias infecções patogênicas em humanos e ainda mais de 90% destes cocos gram-positivos contêm plasmídeos que codificam lactamase, uma enzima que degrada muitas penicilinas disponíveis para tratamento LEVINSON & JAWETZ (2005). Hughes (1976) e Mason (1991), citado por Carlos, (2007) ao encontrarem apenas 15% de cepas sensíveis, consideraram inadequada a terapia com penicilinas para este micro-organismo, (Zavadnack-Netto *et al.* (2001).



Figura02: Atividade antimicrobiana dos extratos da *Heliotropium indicum L.*, obtido a partir das técnicas de extração a frio e com o extrator Soxhlet, frente aos microrganismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*.

Cabe ainda mencionar que os processos de extração utilizados na presente pesquisa também merecem algumas considerações. Sendo que através destes experimentos pode-se obter os melhores resultados no teste de sensibilidade dos microrganismos *S. aureus* e *E. coli* e *P. vulgaris*, nos extratos obtidos a partir do processo de extração a frio, para o processo de extração utilizando o extrator Soxhlet.

A atividade mensurada foi inferior, 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 resultados confirmam o uso etnomedicinal com finalidade antimicrobiana destas plantas. Os extratos vegetais testados apresentam atividade antimicrobiana para microrganismos *E. coli*, *S. aureus* e *P. vulgaris*.

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 e partes constituintes do exemplar como caule e raiz, isso no sentido de detectar e purificar esses metabólitos que apresentam atividades antimicrobianas. Vale salientar que foram utilizados extratos brutos por tanto surge a

necessidade da busca contínua de novas substâncias, com o emprego da biotecnologia são vitais para proteger a saúde humana contra as bactérias patogênicas.

CONCLUSÃO

Assim pode-se concluir que o extrato hidroalcoólico de *H. indicum L.*, apresenta atividade antibacteriana *in vitro* sobre os microrganismos *S. aureus* e *E. coli* e *P. vulgaris*.

Cabe ainda mencionar que os extratos obtidos a partir da técnica de extração a Frio, mostraram-se melhor quando comparado com o extrato obtido a partir do processo com o extrator Soxhlet, isso para as cepas avaliadas. Ressalte-se, entretanto que o microrganismo Gram-negativo *Escherichia coli*, foi o mais sensível aos metabólitos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela saúde e por me manter de cabeça erguida nos momentos de dificuldades frente aos problemas enfrentados.

À minha querida esposa Fr^{ca}. Solange de A. Cardoso, pelo apoio, incentivo e por está sempre disponível nos momentos que precisei.

Ao Prof^o. MsC. Andrey Azedo Damasceno, meu agradecimento pela oportunidade em realizar esta pesquisa, amizade, orientação e confiança durante a realização deste trabalho.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pelo laboratório de Biologia cedido na realização deste trabalho.

Ao laboratório de microbiologia da UEA-MBT (Universidade do Estado do Amazonas – MBT- Mestrado em Biotecnologia), pelas cepas de bactérias cedidas.

BIBLIOGRAFIA

Birecka, H.; Frohlich, MW; Hull, L.; Chaskes, MJ;. *Fitoquímica* **1980**, *19*, 421 [Ligações]

CONSERVA, A. M. Constituintes químicos e ensaios farmacológicos de *Aristolochia birastris* Ducht. João Pessoa. (Mestrado em Produtos Naturais) Universidade Federal da Paraíba. 192p. 1985.

CARVALHO, A. A .T.; SAMPAIO, M. C. C.; SAMPAIO, F. C.; MELO, A .F .M.; Catalfamo, JL; Martin Jr., WB; Birecka, H.; *Fitoquímica* **1982**, *21*, 2669 [. Ligações] 4. Birecka, H.; Frohlich, MW; Hull, L.; Chaskes, MJ;. *Fitoquímica* **1980**, *19*, 421 [Ligações]

Davicino, JG; Pestchanker, MJ; Giordano, OS; *Fitoquímica* **1988**, *27*, 960 [. Ligações]

DI STATI, L.C. (org.) Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 230p, 1996.

FILE Jr.,T. M. Visão Geral Sobre Resistência Bacteriana nos Anos 90. In: PLE CHEST The Cardiopulmonary and Critical Care Journal (edição em português). Suplemento 2:1(3-9), 2000.

LOCHER, C.P. et al. Antimicrobial activity and anticomplement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.49, n.1, p.23-32, 1995.

MACIEL, R.L.; MOREIRA-AMPOS, L.M.; SILVA, B.C.; BRANDÃO, M.G.L. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de *Arnica lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Vol. 16 (1): 99-104, Jan/Mar, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G. Ação farmacológica sobre o sistema nervoso central de alcalóides da *Solanum pseudo-quina* St. Hil. João Pessoa (Mestrado Produtos Naturais). Universidade Federal da Paraíba. 97p. 1986.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JOGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Rev. Saúde Pública*, 38 (2): 326-328, 2004.

REDDY, JS; RAO, RP; REDDY, MS; *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 249. [Ligações]

SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A A; HIGINO, J. H. Atividade Antimicrobiana “in vitro” de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. *Acta Farm.Bonaerense* 21 (4):255-8, 2002.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Microbiologia. 3ªEd.Guanabara Koogan: 120-127. 642p. 2002.

SMÂNIA, E. **Esteróis e Triterpenos Isolados da Espécie de *Ganoderma karsten* e sua Atividade Antimicrobiana.** 112p. 2003. (Tese Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003).

VILLARROEL, L.; TORRES, R.; URZÚA, A.; REINA, M.; CABRERA, R.; GONZÁLEZ-COLONA, A., *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1123. [Ligações]

Xu HX, Lee F 2001. Song activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res* *15*: 39-43.

ZAVADNACK-NETTO, M.; HERREIRO, F.; BANDEIRA, C.O.P.; ITO, Y.; CIORLIN, E.; SAQUETI, E.E.; ANSILEIRO, I.J.; GONSALVEZ, L.; SIQUEIRA, V. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. *Acta Scientiarum*, v.23, p.709-712, 2001.