

## AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E ANTIFÚNGICA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

**Renata Duarte Fernandes<sup>1</sup>, Delci de Deus Nepomuceno<sup>1</sup>, Miliane Moreira Soares de Souza<sup>2</sup>, Francisco de Assis Baroni<sup>2</sup>, Sérgio Gaspar de Campos<sup>2</sup>, Maria de Fátima Agra<sup>3</sup>, Mário Geraldo de Carvalho<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro/Departamento de Química-ICE, Br 465 KM 07, Seropédica-RJ, mgeraldo@ufrj.br

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro / Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária-IV

<sup>3</sup>Universidade Federal da Paraíba/Centro de Ciências da Saúde, LTF, João Pessoa -PB, 58051-970

**Resumo-** O extrato dos galhos de uma variedade de *Ouratea hexasperma* (var. *planchonii* engl.) obtido com metanol, foi submetida a testes de avaliação antibacteriana e antifúngica. Para a avaliação da atividade antibacteriana foi realizado um experimento utilizando três amostras de microorganismos, sendo duas de *Staphylococcus aureus* e uma de *Escherichia coli*. Para a avaliação da atividade antifúngica foi realizado três experimentos e os microorganismos utilizados no experimento foram *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula*, *Malassezia pachydermatis* (fungos unicelulares) e *Aspergillus niger* (fungo filamentoso). O extrato apresentou atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. E atividade antifúngica contra *Rhodotorula* spp e contra *Candida albicans* nos extratos preparados com DMSO.

**Palavras-chave:** *Ouratea hexasperma*, atividades antibacteriana e antifúngica.

**Área do Conhecimento:** Ciências Exatas e da Terra.

### Introdução

Desde o início da civilização, o homem faz uso das plantas, pela necessidade de sobrevivência. Tal comportamento traz como consequência a descoberta das possíveis aplicações terapêuticas de determinadas espécies (SANTOS *et al.*, 2007). Muitos anos se passaram desde a revolução causada pela descoberta da penicilina no tratamento de microorganismos, em especial bactérias. No entanto, após tantos anos, ao contrário do que se poderiam imaginar, os microorganismos em questão não desapareceram, nem tiveram sua capacidade de causar doenças diminuída, evoluíram e resultaram numa ampla gama de microorganismos resistentes derivadas do descaso ou descuido na utilização dos antibióticos.

A busca por novas alternativas terapêuticas, com a utilização de substâncias naturais e extratos de plantas tem sido uma das melhores opções para o tratamento de doenças causadas por microorganismos (JAWETZ, 2000). Entre as espécies que se destacam no desenvolvimento de perfis de resistência aos antimicrobianos estão *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, utilizadas no presente trabalho (JAWETZ, 2000).

O gênero *Ouratea* pertence à família Ochnaceae, ocorre em todo território Nacional, destacando-se Rio de Janeiro, Nordeste e Minas Gerais. As espécies de *Ouratea* espalhadas pelo país recebem designações específicas como

Angelim (*Ouratea vaccinoides*), Caju Bravo (*Ouratea floribunda* e *Ouratea salicifolia*) e Coração de Bugre (*Ouratea parviflora*). *Ouratea floribunda* e *Ouratea castanaefolia* são empregadas em ornamentação urbana (SUZART *et al.*, 2007). São utilizadas na medicina popular como adstringentes, tônicas, estomáquicas, vermífugas (BRAGA, 1960), em distúrbios gástricos, reumatismo e na cicatrização de feridas (MBING *et al.*, 2003; BARROSO, 1986)

O objetivo deste trabalho é avaliar a possível atividade antimicrobiana e antifúngica do extrato metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. coletada em área de restinga, no município de Conde, praia de Jacumã, à beira da estrada em área de restinga. Foi identificada pela D<sup>ra</sup> M. F. Agra tendo uma exsiccata [M. F. Agra *et al.* 6747 (JPB)] depositada no herbário da Universidade da Paraíba, João Pessoa-PB. O fracionamento deste extrato conduziu à identificação dos biflavonóides, agatisflavona e 7"-O-metilagatisflavona, sitosterol glicosilado e de mistura de triterpenos (Fernandes, 2008)

A avaliação antimicrobiana foi realizada nas dependências do Laboratório de Bacteriologia Veterinária do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRuralRJ. O ensaio de atividade antifúngica foi realizado no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária- IV da UFRuralRJ.

## Metodologia

### Preparação do extrato

O extrato metanólico de galhos de *Ouratea Hexasperma var. planchonii* Engl. foi obtido através de maceração a frio e o solvente foi removido através de destilação em evaporador rotativo sob vácuo.

### Atividade antibacteriana

Foram utilizadas 3 amostras de microrganismos, sendo duas de *Staphylococcus aureus* e uma de *Escherichia coli*.

Para *S. aureus*, foram utilizados isolados clínicos oriundos de quadros de mastite bovina, sendo um dos isolados resistente aos antibióticos usuais.

O isolado clínico de *E. coli*, de mesma origem, foi classificado como sensível.

**Inoculação em Caldo Enriquecido:** Os isolados bacterianos estocados em freezer a -20°C foram replicados em caldo enriquecido, e posteriormente incubados em estufa a 37°C por 24 horas, para ativação de seu metabolismo.

Após o crescimento, foi realizada uma bateria de identificação presuntiva consistindo na coloração de Gram, realizada após o período de incubação de 24 horas, para observação das características morfotintórias, e no teste da catalase, para observação da quebra do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pela enzima catalase (KONEMAN et. al, 2001). Como as amostras já haviam sido previamente identificadas, estes procedimentos foram realizados para garantir que não houve contaminação das amostras.

As amostras bacterianas foram inoculadas em caldo enriquecido, e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas antes da realização dos ensaios, para que todas estivessem em fase exponencial de crescimento durante o experimento.

Após o período de incubação, o crescimento deveria ser equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo a uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ ml, ideal para os ensaios de avaliação de antimicrobianos, obedecendo às recomendações do órgão responsável pela aceitação de testes como padrão, o Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para realização do ensaio de difusão, 50mL de uma solução do material-teste na concentração de 500 mg/mL foi inoculada em um poço feito no centro da placa contendo o ágar Mueller Hinton, como postulado pelo CLSI, semeado com 100 µL de caldo de cultura do microorganismo previamente identificado. Na incubação, o extrato se difunde radialmente em todo o ágar em volta do poço enquanto o microorganismo está crescendo no ágar. Isto resulta em uma zona de inibição de crescimento ao redor de cada disco de aplicação (TRUJILLO, 2002).

O dimeltilsulfóxido (DMSO), veículo utilizado nas amostras-testes, foi testado separadamente para verificação de uma possível atividade antimicrobiana.

### Atividade fúngica

Para a avaliação antifúngica os microorganismos utilizados no experimento foram *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula*, *Malassezia pachydermatis* (fungos unicelulares) e *Aspergillus niger* (fungo filamentoso). Utilizou-se três experimentos.

Para o primeiro experimento utilizou-se o meio Sabouraud dextrose a 3% acrescido do extrato da planta. A fórmula do Sabouraud, normalmente feita para 100mL foi preparada para 60mL e os 40mL restantes de H<sub>2</sub>O destilada que completariam o volume foram esterilizados em autoclave e usados para diluir 3 gramas do extrato recebendo, após a diluição, exposição a ultra-violeta em capela de segurança biológica nível II. O meio Sabouraud (60mL) foi esterilizado por autoclavagem (120°C por 20 minutos). Após esterilização o meio foi resfriado a 50°C e misturado com o extrato diluído. Desta forma, foi obtida um meio com concentração de 3% de extrato.

Anteriormente, foram preparados vários frascos contendo 50mL de Sabouraud que também foram esterilizados previamente e resfriados a 50°C.

Do frasco com a concentração 3%, foram retirados metade do volume que foi imediatamente distribuída em tubos de ensaio previamente esterilizados. Estes tubos foram dispostos de modo que o meio solidificasse no modo "inclinado". A outra metade do meio Sabouraud contida em frasco de Erlenmeyer foi acrescida de mais 50mL de Sabouraud puro, tornando a concentração igual a 1,5%. O material foi homogeneizado, separando-se 50mL que foram imediatamente distribuídos em tubos de ensaio que também foram inclinados. Este procedimento foi repetido de forma a obtermos uma sequência de concentrações que sempre correspondiam à metade da anterior, a saber : 3%, 1,5%, 0,75%, 0,375%, 0,187% e 0,093%.

Foram preparadas suspensões salinas (NaCl em água destilada, 0,9%, estéril) de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* padronizadas de acordo com o grau 0,5 da escala de Mac Farland e suspensão padronizada de *Aspergillus niger*. Uma alíquota de 100 microlitros de cada uma destas suspensões foi semeada nos tubos com as concentrações diferentes. Foram empregados quatro tubos de cada concentração para cada suspensão microbiana. Os tubos correspondentes às leveduras foram incubados em estufa microbiológica a 37°C enquanto os

tubos correspondentes ao fungo filamentosos foram incubados em temperatura ambiente. O tempo de observação foi de 5 dias. Todo o procedimento foi realizado em capela, na proximidade de bico de Bunsen.

Para o segundo experimento utilizou-se o extrato da planta (1 grama) diluído em 25mL de etanol, obtendo-se então uma concentração de 4%.

Foram preparados discos de papel, a partir de círculos de pré-filtros semelhantes aos discos empregados nas provas de antibiograma. O diâmetro foi de 1cm. Cada disco foi embebido várias vezes com 50µL da diluição do extrato. As aplicações foram efetuadas até o momento em que os discos apresentassem sinal de saturação. Grupos de 5 a 10 discos foram separados e receberam cargas diferentes de aplicações. Considerando que cada alíquota de 50µL corresponde a 2mg do extrato e que o etanol evapora, obtivemos vários discos com concentrações variáveis desde 8mg até 30mg (4 a 15 aplicações).

Numa segunda etapa, foram preparadas placas de Petri contendo meio Sabouraud dextrose (3%). As placas em quadruplicata foram semeadas com suspensões salinas preparadas como no experimento anterior para os seguintes microrganismos: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula* spp e *Aspergillus niger*. A suspensão de cada um destes microrganismos foi semeada na superfície das placas de Petri, utilizando-se um swab estéril para cada uma das amostras. Após esta etapa, os discos foram aplicados na superfície, utilizando-se uma pinça estéril para a tarefa. Todo o procedimento foi realizado em capela de segurança, na proximidade de bico de Bunsen.

As placas foram incubadas em temperatura de 37°C (exceção para *Aspergillus niger*) por cinco dias com observações a partir das primeiras 24 horas.

Para o terceiro experimento, foram preparadas placas de Petri contendo meio Sabouraud dextrose numa altura de 3 mm. As placas foram semeadas com uma suspensão salina de mesma concentração do experimento anterior preparada com *Aspergillus* spp, *Rhodotorula* spp, *Malassezia pachydermatis*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Em seguida, foram criados 5 poços em cada placa de Petri, mediante perfuração com a boca de tubos de ensaio esterilizados (7 mm de diâmetro), retirando-se a parte cortada. Os poços foram preenchidos com o extrato da planta preparado de duas formas (extrato diluído em H<sub>2</sub>O estéril a 4% e extrato diluído em DMSO a 4%). Controles foram realizados com DMSO puro. A incubação ocorreu nos moldes anteriores.

## Resultados

O extrato apresentou atividade frente ao isolado testado de *Escherichia coli* e a um isolado de *Staphylococcus aureus*. O segundo isolado testado de *Staphylococcus aureus* não apresentou halo de inibição nos ensaios realizados. O mesmo extrato não apresentou atividade frente aos fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus niger*.

A tabela 1 demonstra as atividades dos microorganismos frente ao extrato metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl.

**Tabela 1:** Efeito do extrato de *O. hexasperma* var. *planchonii* Engl in vitro sobre o crescimento de bactérias e fungos.

Micro organismos	Atividade <sup>1</sup>			Antibióticos / Antifúngicos
	1 e 2	3		
		H <sub>2</sub> O	DMSO	
<i>Staphylococcus aureus</i> (resistente)	+	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (sensível)	-	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	+
<i>Escherichia coli</i>	+	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-	+
<i>Malassezia pachydermatis</i>	-	-	-	+
<i>Rhodotorula</i> spp	-	-	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	+

<sup>1</sup>Atividade nos experimentos 1, 2 e 3

<sup>2</sup>NA = Não Avaliado

(+) presença de atividade e (-) ausência de atividade

## Discussão

Para a avaliação da atividade antibacteriana observou-se que na realização dos ensaios com o veículo, foi comprovada sua inatividade sobre o crescimento bacteriano, permitindo o prosseguimento dos testes com as diluições do extrato. Foi possível detectar a formação de halo de inibição nos ensaios frente ao isolado testado de *Escherichia coli* e a um isolado de *Staphylococcus aureus* que já se mostrara resistente aos antibióticos de eleição. No entanto, o outro isolado testado de *Staphylococcus aureus*

não apresentou halo de inibição nos ensaios realizados.

A avaliação da atividade antifúngica nos dois primeiros experimentos revelou crescimento em todos os tubos e placas e em nenhuma placa foi observado qualquer halo que demonstrasse efeito inibitório do extrato aplicado nos discos sobre os microrganismos cultivados.

Especificamente com relação aos discos, é possível que o extrato impregnado nos mesmos não consiga difundir-se para o meio de cultivo, como se esperava, uma vez que o extrato apresenta, depois de diluído em etanol, uma consistência serosa.

No terceiro experimento, realizado com poços, foi verificada atividade antifúngica contra *Rhodotorula* spp e contra *Candida albicans* somente nos extratos preparados com DMSO e nas alíquotas de 300µL aplicados. Dos seis controles realizados com DMSO puro, dois apresentaram efeito inibitório sobre as amostras de *Rhodotorula* e *Candida albicans*.

### Conclusão

O extrato metanólico de *Ouratea hexasperma* var. *planchonii* Engl. Inibiu o crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Este extrato foi ativo para apenas duas cepas fúngicas. Avaliações adicionais devem ser feitas para confirmar a atividade antibacteriana e antifúngica uma vez que existe a possibilidade da ação ser dependente do tipo de diluente empregado, fato este que deve ser investigado criteriosamente.

### Referências

- BARROSO, G. M.; Sistemática de Angiosperma do Brasil, UFV-MG, 130, 1986.
- BRAGA, R.. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. Fortaleza: Imprensa Oficial. 1960
- FERNANDES, R. D. Estudo Químico e Atividades Biológicas de *Ouratea Hexasperma* var. *planchonii* Engl., *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós-graduação em Química, UFRuralRJ, 2008.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*. 21a ed., Editora Guanabara-Koogan, 2000.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. & SCHRECKENBERGER, P.C. & WINN JR., W.C. *Diagnóstico Microbiológico*. 5ª.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDSI, 2001.
- MBING, J. N.; PEGNYEMB, D. E.; GHOGOMU TIH, R.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO,

B. Two biflavonoids from *Ouratea flava* stem bark. *Phytochem.*, 63, 427-431, 2003.

- SANTOS, P.O.; BARBOSA JUNIOR, A.M.; MÉLO, D. L. F. M.; TRINDADE, R. C. Investigação da atividade antimicrobiana do látex da mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES) Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.9, n.2, p.108-111, 2007.

- SUZART, L. R.; DANIEL, J. F. DE S.; CARVALHO, M. G. Biodiversidade Flavonoídica E Aspectos Farmacológicos Em Espécies Dos Gêneros *Ouratea* E *Luxemburgia* (OCHNACEAE) *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 4, 984-987, 2007

- TRUJILLO, E. C. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Revista Chilena de Infectología*, v.19, supl.2, Santiago, 2002.