

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *TABERNAEMONTANA* *CATHARINENSIS* A. DC.

Amanda Leitão Gindri¹
Aline Augusti Boligon¹
Débora Nunes Mario²
Janaina Kieling Frohlich¹
Thiele Faccim de Brum¹
Sydney Hartz Alves²
Margareth Linde Athayde¹

RESUMO

A atividade antimicrobiana de plantas medicinais tem sido pesquisada em diversas espécies, tanto no Brasil quanto em outros países. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano do extrato bruto e das frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *Tabernaemontana catharinensis* e determinar sua concentração inibitória mínima (CIM) sobre amostras de *Micrococcus sp.*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* utilizando a técnica de microdiluição em caldo. Somente a fração *n*-butanol apresentou-se ativa frente às cepas testadas, nessa fração são extraídos os compostos de natureza polar podendo ser estes os compostos responsáveis pelo resultado obtido.

Palavras-chave: *Tabernaemontana catharinensis*; atividade antimicrobiana; cobraína.

¹ Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Departamento de Farmácia Industrial. Avenida Roraima, n. 1000. CEP: 97105-200. Santa Maria – RS. E-mail: alineboligon@hotmail.com;

² Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Avenida Roraima, n. 1000. CEP: 97105-200. Santa Maria – RS

INTRODUÇÃO

O uso de plantas como recurso terapêutico vem sendo descrito em toda a história da humanidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial utilizam plantas medicinais como principal recurso no atendimento básico de saúde. Incluem-se as populações que usam *in natura* (por opção ou por ser a única alternativa disponível) e os sistemas de medicina que empregam plantas processadas em formulações medicamentosas, como a medicina chinesa (YUNES; CECHINEL, 2001). Graças à sua atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microorganismos, insetos e herbívoros. Terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lecitinas e polipeptídeos, substâncias fenólicas, como fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonóis e flavonóides, taninos e cumarinas, são os principais grupos de compostos, extraídos de plantas com propriedades antimicrobianas relatadas (HATANO *et al.*, 2005; ESQUENAZI *et al.*, 2002).

O gênero *Tabernaemontana* pertence à família Apocynaceae. Recentemente, 99 espécies deste gênero foram registradas, das quais 44 ocorrem na América. Várias espécies do gênero *Tabernaemontana* são utilizadas na medicina popular contra diversos tipos de enfermidades: diarreia, doenças de pele, verrugas, sífilis, herpes, hanseníase, câncer, picadas de insetos e ainda, como hemostática, hipotensora e cardiotônica. Os principais constituintes químicos do gênero *Tabernaemontana* são alcalóides indólicos, segundo Federici *et al.* (2000) os alcalóides indólicos são substâncias com amplo espectro de atividades farmacológicas: analgésica, antiinflamatória, bactericida, estrogênica, estimulante e depressora do sistema nervoso central e com função hipotensora e atividade muscular relaxante.

Dentro das espécies existentes no Brasil destaca-se a *Peschiera fuchsiaeifolia*, recentemente reclassificada como *Tabernaemontana catharinensis* A. DC., popularmente conhecida pelos nomes de “cobri-na”, “leiteira”, “leiteiro” ou “leiteiro de vaca”, por produzir látex nas folhas, caules e frutos, com muita abun-

dância. Seus usos relatados são como antídoto para mordedura de serpentes, como calmante em dor de dentes e para o tratamento de verrugas (ALMEIDA *et al.*, 2004). Levando-se em consideração as técnicas de extrativismo utilizadas pela população em geral e, em particular, o uso das cascas e folhas de *T. catharinensis*, o presente estudo tem como objetivo a verificação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações das folhas de *T. catharinensis* pelo método da microdiluição em caldo, determinando-se a Concentração Inibitória Mínima frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

MÉTODOS

As folhas de *Tabernaemontana catharinensis* foram coletadas em setembro de 2009, no município de Bossoroca, no estado do Rio Grande do Sul (coordenadas: latitude 28°65'93'' S, longitude 55°01'27'' W). O material testemunho está depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM catalogado sob o número de registro SMBD 12.355. As folhas foram secas em temperatura ambiente e posteriormente trituradas em moinho de facas. A seguir, o material (1080 g de pó das cascas) foi colocado em maceração com etanol (70%) a temperatura ambiente por sete dias com agitação diária. O extrato foi filtrado e evaporado para remoção do etanol obtendo-se o extrato aquoso, sendo este particionado sucessivamente com solventes orgânicos de polaridade crescente: diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (*n*-BuOH), segundo metodologia usual em nosso laboratório. O extrato bruto e as três frações foram testados individualmente contra um painel de microorganismos: *Micrococcus sp.*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas sp.*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. O protocolo M7-A5 (NCCLS) foi empregado para determinação das CIMs para os patógenos bacterianos, a metodologia foi adaptada substituindo-se os antibacterianos pelos extratos da planta. Os antibacterianos ampicilina, cefoperazona e imipenem foram utilizados como referência.

RESULTADOS

Os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e das três frações estão apresentados na Tabela 1. A fração *n*-butanol foi efetiva frente à *Micrococcus sp.* (CIM = 31,25 mg/mL), *Aeromonas sp.* (CIM = 250,00 mg/mL), *Proteus mirabilis* e *Enterococcus faecalis* (CIM = 62,50 mg/mL), o extrato bruto e as demais frações apresentaram MIC > 1000mg/mL para todas as bactérias testadas.

DISCUSSÃO

Existem várias razões que levam os pesquisadores da área fitoquímica e também microbiologistas a buscarem a ação antimicrobiana de metabólitos secundários de plantas. Uma delas é o aumento da resistência bacteriana frente aos antibióticos tradicionais utilizados na terapêutica, causada, entre outros fatores, pelo uso indiscriminado destes. Os microrganismos utilizados neste ensaio abrangeram a classe dos Gram-positivos (*S. aureus*; *E. faecalis*; *Micrococcus sp.*), os Gram-negativos (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Aeromonas sp.*, *P. mirabilis*, e *E. coli*). O menor valor de CIM (31,25 mg/mL) foi observado com o uso da fração *n*-butanol, a fração mais polar, frente a *Micrococcus sp.*, sendo que para o mesmo microorganismo as outras frações resultaram em CIM > 1000 mg/mL. A fração *n*-butanol apresentou bons resultados frente a *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* (CIM = 62,50 mg/mL) e a *Aeromonas sp.* (CIM = 250,00 mg/mL). A resistência aos microrganismos Gram-negativos é justificada, uma vez que estes apresentam particularidades estruturais que dificultam a penetração dos antimicrobianos, como a camada externa de lipopolissacarídeos, que determina propriedades de superfície, tais como permeabilidade e susceptibilidade a antibióticos (YOKOTA; FUJII, 2007).

A fração *n*-butanol extraí os compostos mais polares, como fenólicos, flavonóides e taninos, estes compostos podem estar relacionados com a atividade antimicrobiana encontrada neste ensaio. A

presença de flavonóides foi detectada na triagem fitoquímica preliminar por TLC. Compostos fenólicos, especialmente flavonóides, possuem atividade antibacteriana (PEREIRA *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2007), esse fato pode explicar, pelo menos em parte, a atividade antimicrobiana descrita neste estudo. Eles podem atuar como agentes antibacterianos por meio de pelo menos três ou mais mecanismos: inibição da síntese de ácido nucléico, rompimento de membranas bacterianas e/ou inibição do metabolismo energético (COWAN, 1999).

A atividade atraente demonstrada pela fração mais polar especialmente contra *Micrococcus sp* indica que essas frações é promissora para pesquisa, possibilitando o emprego de fracionamento bioquímico para um ensaio microbiológico. Estes resultados fornecem informações para a potencial utilização desta fração e para isolar compostos antimicrobianos ativos da planta.

CONCLUSÕES

Os resultados indicam que somente a fração *n*-butanol apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas testadas, nessa fração são extraídos os compostos de natureza polar podendo ser estes os compostos responsáveis pelo resultado obtido.

LITERATURA CITADA

ALMEIDA, L.; CINTRA, A. C. O.; VERONESE, E. L. G.; NOMIZO, A.; FRANCO, J. J.; ARANTES, E. C.; GIGLIO, J. R.; SAMPAIO, S. V. Anticrotalic and antitumoral activities of gel filtration fractions of aqueous extract from *Tabernaemontana catharinensis* (Apocynaceae). *Comp Biochem Physiol Part C*. v. 137, p. 19-27, 2004.

CLSI National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast: approved standard, document M27-A2 and Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard; 5th ed. NCCLS document M7-A5, Wayne, PA.

- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews, Clin Microbiol Rev.* v. 12, p. 564-582, 1999.
- ESQUENAZI, D; WIGG, M.D; MIRANDA, M.M.F.S; RODRIGUES, H.M; TOSTES, J.B.F; ROZENTAL, S; SILVA, A.J.R; ALVIANO, C.S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. *Research in Microbiology.* v. 53, p. 647-652, 2002.
- FEDERICI, E.; PALAZZINO, G.; NICOLETTI, M.; GALEFFI, C. Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaeifolia*. *Planta Medica.* v. 66, p. 93, 2000.
- HATANO, T; KUSUDA, M; INADA, K; OGAWA, T; SHIOTA, S; TSUCHIYA, T; YOSHIDA, T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry.* v. 66, p. 2047-2055, 2005.
- OLIVEIRA, I.; SOUZA, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; FERREIRA, I.C.R.F.; FERRERES, F.; PEREIRA, J.A. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry.* v. 105, p. 1018-1025, 2007.
- PEREIRA, J.A.; PEREIRA, A.P.G.; FERREIRA, I.C.F.R.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; BENTO, A. Table olives from Portugal: Phenolic compounds, antioxidant potential and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v. 54, p. 8425-8431, 2006.
- YOKOTA, S; FUJII, N. Contributions of the lipopolysaccharide outer core oligosaccharide region on the cell surface properties of *Pseudomonas aeruginosa*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases.* v. 30, p. 97-109, 2007.
- YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (eds.). Chapecó: Argos. *Plantas medicinais sob a óptica da química medicinal moderna.* p.17-46, 2001.

Tabela 1: Potencial antimicrobiano das folhas de *Tabernaemontana catharinensis*, frente a oito diferentes microorganismos.

Microorganismo	Extrato bruto	CH ₂ Cl ₂	AcOEt	n-BuOH
CIM (µg/mL)				
<i>Micrococcus sp.</i>	>1000	>1000	>1000	31,25
<i>Proteus mirabilis</i>	>1000	>1000	>1000	62,5
<i>Escherichia coli</i>	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Aeromonas sp.</i>	>1000	>1000	>1000	250
<i>Enterococcus faecalis</i>	>1000	>1000	>1000	62,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	>1000	>1000	>1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1000	>1000	>1000	>1000

*Antibióticos utilizados como controle: ampicilina (8,0 ìg/mL), cefoperazona (16,0 ìg/mL) e Imipenen (0,06 ìg/mL).