

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS FOLHAS DE *UNCARIA TOMENTOSA* (WILLD) D.C.
(RUBIACEAE) E *PTHIRUSA PYRIFOLIA* (LORANTHACEAE) SOBRE
ENTEROCOCCUS FAECALIS.**

**Bruna ALENCAR (1); Juliana LUCENA (2); Lucilene PAES (3) Marina NETA (4) Ari
HIDALGO (5)**

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, brunaifam@gmail.com (1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. Sete de Setembro, 1975, Centro, jlucena@ifam.edu.br (2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, luci@ifam.edu.br (3) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. Sete de Setembro, 1975, Centro, marininha17@hotmail.com (4) Universidade Federal do Amazonas. Rua General Rodrigo Otávio, s/n, Japiim, hidalgo@ufam.edu.br (5).

RESUMO

Muitas substâncias armazenadas nas estruturas foliares de plantas amazônicas apresentam potencial biotecnológico, merecendo especial destaque aqueles que sugerem atividade antimicrobiana. A presente pesquisa teve como objetivo investigar a atividade inibitória de extratos hidroalcóolicos de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. e *Phthirusa pyrifolia* (H.B.K.) utilizadas popularmente na Amazônia como medicinais. Os extratos hidroalcóolicos foram obtidos por maceração de folhas frescas por períodos de descanso de 7 e 14 dias, após o que foram testados contra *Enterococcus faecalis*. (ATCC 29212). Os parâmetros dos testes de atividade biológica utilizados foram: formação de halos de inibição, inspeção visual da turbidez após 24 horas e a contagem de células (CB/ml). Os extratos de *U. tomentosa* (Willd) D.C. e *P. pyrifolia* (H.B.K.) não apresentaram formação de halo inibitório, houve inibição do crescimento bacteriano proporcional ao aumento da concentração para os extratos de *U. tomentosa* (Willd) D.C. e *P. pyrifolia* (H.B.K.). Em todos os casos foi observado aglutinação celular, reduzindo drasticamente o número de células por campo. Os resultados indicaram a presença de compostos ativos com ação antimicrobiana, sendo necessários outros estudos para determinar as classes de compostos presentes nesses extratos.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*, potencial antimicrobiano, extratos vegetais.

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos resistentes aos antibióticos usuais são considerados uma das maiores dificuldades nos tratamentos das infecções. Muitos organismos como o coco Gram positivo *E. faecalis*, possuem grande habilidade de adquirir resistência a antimicrobianos e transferi-la a outras bactérias através de plasmídios. Preparos simples e de baixo custo da medicina popular podem auxiliar no controle do biofilme formado por *E. faecalis* e indicar novas fontes alternativas de princípios ativos para a fabricação de antimicrobianos. O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial antimicrobiano de extratos hidroalcoólicos de *U. tomentosa* (Willd) D.C. e *P. pyrifolia* (H.B.K.), espécies vegetais da Amazônia utilizadas como medicinais.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Biofilme é o termo utilizado para designar o crescimento microbiano (bactérias, fungos e protozoários) de modo isolado ou em combinação, ligados por um polissacarídeo viscoso (matriz extracelular) a superfícies sólidas secretado pelas bactérias e que auxilia na fixação dos microrganismos e modo menos atrativo, pode ser chamado também de camada viscosa. Esses microrganismos crescem em pequenos aglomerados denominados microcolônias que são separados por uma rede de canais de água (JAY, 2005; BURTON, 2005; FORSYTHE, 2002).

A bactéria *E. faecalis* é uma espécie mais freqüente do gênero *Enterococcus* porque se tornou um dos agentes mais importantes de infecção hospitalar com o agravante de ter adquirido resistência à maioria dos antibióticos, incluindo a vancomicina (TRABULSI, 2005). *E. faecalis* é um importante agente de endocardite e de infecções no trato urinário. É uma bactéria comensal dos tratos gastrointestinal e biliar, podendo causar hemorragia e infecções no trato urinário (BUDZIK & SCHNEEWIND, 2006).

O gênero *Enterococcus* está associado a uma alta freqüência de casos de septicemia, comprovadamente por contribuir para o aumento da resistência aos antimicrobianos de cepas bacterianas de diferentes espécies através da transferência de plasmídios (RICHARDS et al. 2000). Dentre os principais microrganismos resistentes ao tratamento endodôntico, *E. faecalis* tem sido relatado como um dos mais freqüentes (LOVE, 2001; WARREN & JAWETZ, 2005). As lesões resultantes de uma infecção dentária não tratada ou, se tratada, não curada podem estar associadas a outras doenças sistêmicas devido a disseminação hematogênica dos microrganismos presentes nessas lesões, mesmo em indivíduos aparentemente saudáveis (BRINCAT et al. 2006).

A sobrevivência de o gênero *Enterococcus* no ambiente hospitalar deve-se à sua resistência intrínseca a vários antibióticos utilizados comumente e talvez, mais importante ainda seja sua habilidade de adquirir resistência aos antibióticos empregados atualmente. O gênero apresenta resistência intrínseca e moderadas concentrações de aminoglicosídeos, o que ocorre em todas as espécies e decorre de uma baixa penetração do antimicrobiano pela parede bacteriana (HORNER et al., 2005).

Muitos esforços têm sido feitos para descobrir novos compostos antimicrobianos de vários tipos de fontes como o petróleo, microrganismos, animais e plantas. A investigação científica e a informação do potencial terapêutico das plantas são limitadas. Apesar da existência de potentes agentes antibióticos e antifúngicos, os resistentes ou multiresistentes estão continuamente aparecendo, impondo a necessidade de uma busca permanente e desenvolvimento de novos medicamentos (PAREKH & CHANDA, 2006).

Estudos sobre a medicina popular vêm merecendo atenção cada vez maior devido ao contingente de informações e esclarecimentos que vem sendo oferecido à Ciência. Esse fenômeno tem propiciado o uso de chás, decoctos, tisanas e tinturas fazendo com que, na maioria dos países ocidentais, os medicamentos de origem vegetal sejam retomados de maneira sistemática e crescente na profilaxia e tratamento das doenças, ao lado da terapêutica convencional (FRANÇA et al, 2007).

O tratamento de doenças com uso de plantas conduz à cura, através de um grupo de substâncias ativas, que atuam no organismo de maneira mais lenta e nem sempre de maneira direta. Os diversos metabólitos das plantas trabalham em conjunto, alguns estimulando funções vitais, outros atacando os agentes causadores da doença e outros amenizando os impactos tóxicos (REVILLA, 2004).

3. METODOLOGIA

3.1 Espécies vegetais selecionadas: Realizou-se o estudo e coleta das espécies vegetais cujo uso popular indicava o tratamento de doenças infecciosas. A coleta foi realizada no viveiro de plantas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) Manaus. Foram confeccionadas exsiccatas das espécies selecionadas, a saber, *U. tomentosa* e *Phthirusa pyrifolia*. As exsiccatas foram depositadas no herbário do IFAM.

3.2 Obtenção dos extratos: Para a obtenção de extratos hidroalcoólicos a partir da maceração, folhas de *U. tomentosa* e *P. pyrifolia* foram pesadas, trituradas em almofariz de porcelana e armazenadas em frascos âmbar por 7 e 14 dias à temperatura ambiente. Como solvente foi utilizada uma solução de álcool 70% na proporção de 20 ml para 10g de matéria prima fresca. Decorrido o período de maceração, o material foi filtrado, para remoção de resíduos sólidos. Após filtração, os extratos foram acondicionados em pequenos frascos âmbar, previamente limpos e secos, e imediatamente utilizados na etapa seguinte de testes biológicos (Figura 1).



Figura 1 - Preparo de extratos hidroalcoólicos por maceração.

3.3 Cepa bacteriana: Utilizou-se neste estudo a linhagem bacteriana padronizada de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) obtida junto ao INCQS da Fiocruz (Rio de Janeiro).

3.4 Testes de atividade biológica: Para avaliar a capacidade dos extratos de inibir o crescimento bacteriano foram realizados dois testes:

3.4.1 Disco-difusão: 100µl de suspensão de *E. faecalis* (10^8 CB/ml) foram inoculados sobre ágar Mueller-Hinton, e discos de filtro estéreis embebidos nos extratos de 7 e 14 dias foram depositados sobre o mesmo. Os resultados foram medidos quanto à formação ou não de halos de inibição após 24 h;

3.4.2 Teste de Diluição: 20 tubos contendo 5ml de suspensão de *E. faecalis* em caldo BHI, receberam diferentes alíquotas de cada extrato de 7 e 14 dias nos volumes de extrato: 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 ml, resultando nas concentrações volume/volume, respectivamente, de 4,76%, 9,09%, 16,67% e 28,57%. Um tubo foi mantido como controle positivo. Além da inspeção visual da turbidez após 24 horas, foi realizada a contagem de células bacterianas (Log CB/ml) utilizando câmara de Neubauer em microscópio de campo escuro. A incubação foi feita por um período de 7 e 14 dias em estufa bacteriológica a 37° C e a cada 24h procedeu-se agitação leve de cada um dos tubos. No sétimo dia foi determinado o número de células (Log CB/ml) em suspensão (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das concentrações volume/volume utilizadas no teste de diluição de extratos vegetais em suspensão de *E. faecalis* em caldo BHI.

Amostra	Volume do meio de cultura (ml)	Volume do inóculo (ml)	Volume do extrato vegetal adicionado (ml)	Concentração em v/v%
Controle (+)	5ml de BHI	0,1 de <i>E. faecalis</i>	-	-
2	5ml de BHI	0,1 de <i>E. faecalis</i>	0,25 ml	4,90 %
3	5ml de BHI	0,1 de <i>E. faecalis</i>	0,5 ml	9,80 %
4	5ml de BHI	0,1 de <i>E. faecalis</i>	1 ml	19,60 %
5	5ml de BHI	0,1 de <i>E. faecalis</i>	2 ml	39,22 %

4. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE DADOS

No teste de disco-difusão não houve formação de halos inibitórios. Assim também o solvente utilizado, álcool 70%, não formou halo, demonstrando do mesmo modo que não possui nenhuma atividade antimicrobiana frente à *E. faecalis*.

O teste de diluição resultou em inibição do crescimento bacteriano proporcional ao aumento da concentração para os extratos hidroalcoólicos de ambas as espécies vegetais. (Figuras 2 e 3).

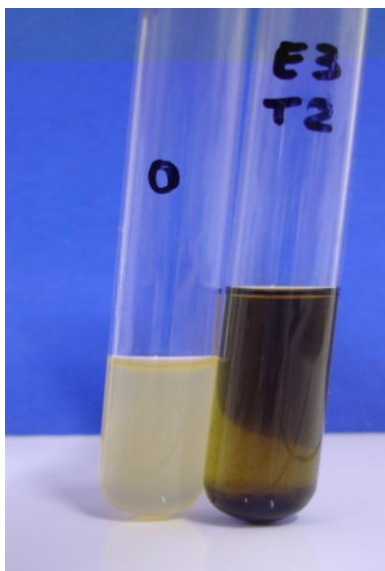


Figura 2 - Comparação da turbidez entre o tubo do controle positivo (à esquerda) e o tubo contendo extrato hidroalcoólico na concentração de 39,22% de *U. tomentosa* (à direita).

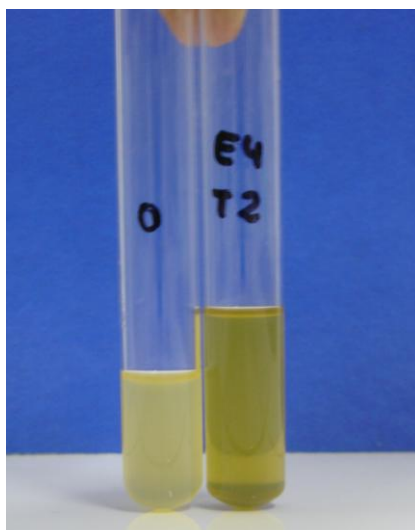


Figura 3 - Comparação da turbidez entre o tubo do controle positivo (à esquerda) e o tubo contendo extrato hidroalcoólico na concentração de 39,22% de *P. pyrifolia* (à direita).

Em todas as amostras foi observada aglutinação celular, o que reduziu o número CB/ml em comparação com o controle positivo. Nas concentrações mais altas a aglutinação observada foi mais intensa e o número de células foi próximo a zero (Tabelas 2 e 3).

Em relação aos dois períodos de descanso da maceração, observou-se que o extrato de *U. tomentosa* obtido após 7 dias foi mais eficaz do que o extrato obtido após 14 dias. O primeiro foi capaz de inibir totalmente *E. faecalis* já na concentração de 9,8%, enquanto, o segundo precisou chegar à concentração de 19,6% para atingir o mesmo resultado. Aparentemente, os princípios ativos contra *E. faecalis* obtidos logo na primeira semana de extração utilizando álcool etílico como solvente, sofrem algum tipo de alteração química que resulta na diminuição de sua eficácia.

Ao contrário, o extrato hidroalcoólico de *P. pyrifolia* mostrou maior eficácia após o período de repouso de 14 dias, quando foi capaz de inibir totalmente o crescimento da bactéria na concentração de 9,6%. Nesse caso, pode-se inferir que os princípios ativos contra *E. faecalis* precisaram de um período mais longo para serem extraídos das estruturas foliares e se tornarem disponíveis para agir contra a bactéria.

Tabela 2 - Teste de diluição: Número de células bacterianas (Log CB/ml) após 24h de incubação de *E. faecalis* em caldo BHI com extratos hidroalcoólicos de *U. tomentosa* ou *Phthirusa pyrifolia*.

Concentração v/v%	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd) D.C.	<i>Phthirusa</i> <i>pyrifolia</i> (H.B.K.)
4,90%	3,25*	3,76*
9,80%	0	2,24*
19,60%	0	0
39,22%	0	0

Controle positivo = 7,9 Log CB/ml

* As amostras apresentaram aglutinação celular.

Tabela 3 - Teste de diluição: Número de células bacterianas (Log CB/ml) após 24h de incubação de *E. faecalis* em caldo BHI com extratos hidroalcoólicos de 14 dias de *U. tomentosa* e *P. pyrifolia*.

Concentração v/v%	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd) D.C.	<i>Phthirusa pyrifolia</i> (H.B.K.)
4,90%	6,34*	5,28*
9,80%	3,28*	0
19,60%	0	0
39,22%	0	0

Controle positivo = 7,8 Log CB/ml

* As amostras apresentaram aglutinação celular.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram a presença de substâncias bioativas nos extratos das plantas testadas contra *E. faecalis*. Estas são capazes de inibir seu crescimento e confirmam a ação antimicrobiana resultante do preparo de macerações segundo costumes populares. Foi demonstrado que preparos simples e de baixo custo podem auxiliar no controle do biofilme formado por *E. faecalis* e indicar novas fontes alternativas de princípios ativos para uso como antimicrobianos na área de saúde. Indica-se a necessidade de isolamento e identificação dos constituintes ativos através de estudos fitoquímicos, e reforça-se a importância dos produtos naturais como fonte de descoberta de novos medicamentos com propriedades antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

- BLACK, J. G. **Microbiologia: Fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- BRINCAT, M. ; Savarrio, L. ; Saunders, W. **Endodontics and infective endocarditis – is endodontic chemoprophylaxis required?** International Endodontic Journal, (39) 671-682, 2006.
- BUDZIK, J. M. ; Schneewind, O.. Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. **The Journal of Clinical Investigation**. 2582, 2006.
- BURTON, G. R. W. **Microbiologia para as ciências da saúde** – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 426p.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar** – Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.
- FRANÇA I.S.X. de, Batista, J.A, Britto, R. S et al.. **Medicina popular: Benefícios e malefícios das plantas medicinais**. Brasília, v. 61, n. 2, Apr. Revista Brasileira de Enfermagem, 2007.
- HÖRNER R, Liscano, M.G.H., Maraschin, M. M., et al . **Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria**. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, Dec, 2005, 19p.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2005, 712p.
- LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **International Endodontic Journal**, (34):399-405, 2001.

PAREKH, J.; Chanda, S. In-vitro Antimicrobial Activities of Extracts of *Launaea procumbens* Roxb. (Labiateae), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae). **African Journal of Biomedical Research**, Vol. 9 ; 89 -93, 2006.

REVILLA, J. **Cultivando a saúde em hortas caseiras e medicinais**. 5ª ed. Manaus: Sebrae, 2004.

RICHARDS, M.J. Edwards et al. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** (21):510–515, 2000.

TRABULSI, L. R.; Alterthum, F. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

WAREN & JAWETZ. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7 ed. Porto alegre: Artmed, 2005.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio das bolsistas do grupo de pesquisa, Luciana Aguiar e Laís Vilhena e ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas.