

# Estudo fitoquímico de extratos vegetais ativos contra *Enterococcus faecalis*

Felipe B. PESSOA (1); Juliana M.V.M de LUCENA (2); Maria de Fátima O. de ALMEIDA(3)

(1) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. 7 de setembro 1975 - Centro  
Manaus - Amazonas Cep: 69020-120, e-mail: fbpeessoa@gmail.com

(2) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Av. 7 de setembro 1975 - Centro  
Manaus - Amazonas Cep: 69020-120, e-mail: jlucena@ifam.edu.br

(3) Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Campus Universitário,  
Coroado I - Manaus/Amazonas, e-mail: falmeida0707@yahoo.com.br

## RESUMO

Extratos hidroalcóolicos de plantas medicinais obtidos por maceração segundo receita caseira foram testados previamente contra *Enterococcus faecalis*, bactéria resistente a diversos antimicrobianos, sendo uma das bactérias que pode estar presente em infecções dentárias crônicas. As espécies *Morus sp.* (Amoreira), *Pedilanthus sp.* (Coramina) e *Kalanchoe pinnata* (Corama) apresentaram melhores resultados contra *Enterococcus faecalis*. Assim buscou-se experimentalmente identificar os constituintes bioativos em extratos vegetais que apresentaram resultados positivos contra esta bactéria, através da técnica de extração de arraste por vapor d'água, a qual se obtêm substâncias voláteis (óleo essencial) e cromatografia de camada delgada (CCD), que indica os prováveis grupos químicos com atividade antimicrobiana. A espécie que apresentou um melhor resultado para os reveladores utilizados foi *Morus sp.* (Amoreira), sendo revelado através do revelador Godin o grupo químico das saponinas. Enquanto as duas outras espécies, *Pedilanthus sp.* (Coramina) e *Kalanchoe pinnata* (Corama), não apresentaram resultados satisfatório para este grupo. Num futuro próximo espera-se testar novos reveladores para outros tipos de grupos químicos que tenham a propriedade biológica contra este microrganismo.

**Palavras-chave:** microrganismo, extrato vegetais, substâncias antimicrobianas.

# 1 INTRODUÇÃO

As espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* são relatadas como a causa de várias infecções em humanos, do trato urinário aos túbulos dentinários. Este gênero é comensal em humanos, sendo adaptado a ambientes ricos em nutrientes. Presente no trato gastrointestinal, cavidade oral e vagina. Para as espécies pertencentes a este gênero atuarem como patógenos, necessitam primeiramente colonizar o hospedeiro, e está colonização envolve uma série de eventos. O primeiro evento, para que isso ocorra é a interação da bactéria com o hospedeiro, onde há uma forte ligação da superfície bacteriana com o tecido do mesmo. A bactéria deve ser capaz de utilizar o nutriente disponível no meio, competindo e cooperando com outras espécies de bactérias do ambiente em questão, além de lutar contra o mecanismo de defesa do hospedeiro (LOVE, 2001).

*Enterococcus faecalis* é uma bactéria gram-positiva, comensal dos tratos gastrointestinal e biliar, anaeróbica facultativa e resistente a diversos antimicrobianos, sendo responsável por 80-90% das infecções causadas pelo gênero *Enterococcus*. Presente nas infecções hospitalares e associado a uma alta frequência de casos de septicemia. Apresenta uma grande habilidade de adquirir resistência a antimicrobianos e transferi-la a outras bactérias através de plasmídeos. Vale lembrar também que é um importante agente de endocardite e de infecções no trato urinário, com ocorrência frequente em hospitais (BUDZIK & SCHNEEWIND, 2006; LOVE, 2001).

Plantas medicinais são uma alternativa para muitas populações ribeirinhas que não tem condições financeiras ou acesso à rede de saúde pública. Essas plantas são usadas para diversas patologias, desde um simples machucado a uma malignidade grave como, por exemplo, a malária (REVILLA, 2004). Os estudos sobre as plantas da região amazônica são ainda incipientes, levando-se em consideração o tamanho da floresta e a diversidade de espécies. A utilização de um produto a base de plantas medicinais contra *Enterococcus faecalis*, poderia auxiliar no combate a infecções causadas por esta bactéria, além de ser um produto de menor custo e mais acessíveis para todos os grupos sociais.

Na busca de plantas medicinais que tivessem efeito antimicrobiano contra *Enterococcus faecalis*, testou-se previamente três (03) espécies vegetais, *Morus* sp. (amoreira), *Pedilanthus* sp. (coramina) e *Kalanchoe pinnata* (corama), as quais apresentaram um resultado satisfatório (ALENCAR et al., 2009). Neste trabalho se propôs buscar e identificar os constituintes bioativos destes extratos vegetais que apresentaram resultados positivos contra *Enterococcus faecalis*. Através da técnica de arraste por vapor d'água utilizando um aparelho tipo Clevenger, verificando se havia ou não óleo essencial e por cromatografia de camada delgada (CCD), que indica os prováveis grupos químicos com atividade antimicrobiana.

## 2 METODOLOGIA

Segundo ALENCAR et al. (2009), extratos hidroalcoólicos de folhas frescas das espécies vegetais *Morus* sp. (amoreira), *Pedilanthus* sp. (coramina) e *Kalanchoe pinnata* (corama) testadas contra *Enterococcus faecalis* apresentaram resultados de inibição por disco-difusão e por diluição em caldo. Folhas frescas das espécies citadas anteriormente foram submetidas a dois processos de obtenção de extratos: arraste por vapor d'água utilizando um aparelho tipo Clevenger, e extração com solventes de polaridades crescentes utilizando aparelho de ultra-som a frio.

### 2.1 Coleta das Espécies Vegetais

Realizou-se duas (02) coletas dos espécimes vegetais em datas distintas. A primeira deu-se no dia 21 de setembro de 2009 para obtenção dos compostos químicos voláteis, e a segunda no dia 05 de Novembro de 2009 para obtenção dos compostos químicos fixos. Os três (03) espécimes vegetais, foram coletados em Manaus, em horta domiciliar no bairro Planalto, no período da manhã. As exsicatas anteriormente registradas desses mesmos exemplares encontram-se no herbário do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas.

## 2.2 Obtenção de Extratos com Constituintes Voláteis (Óleos Essenciais)

Após as coletas das amostras, selecionou-se as melhores folhas de cada espécie, lavando-as em água corrente. Em seguida, as folhas já lavadas foram cortadas em pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura própria, pesadas em balança semi-analítica, a qual foi aquecida previamente por 30 minutos, colocando-as em um balão volumétrico de 2000 ml e adicionando posteriormente 1500 ml de água destilada para cada amostra para a obtenção de óleo essencial. O aparelho extrator utilizado foi aferido previamente com amostras de folhas de espécime vegetal que apresenta óleo essencial (*Cymbopogon citratus*), apresentando resultado positivo. Abaixo, a quantidade de folhas utilizadas para obtenção de óleo essencial (Tabela 1). A técnica utilizada para obtenção dos constituintes voláteis dos espécimes foi a de arraste em vapor d'água utilizando um aparelho tipo Clevenger segundo SIMÕES *et al.* (2004).

**Tabela 1. Quantidade das amostras em grama utilizadas para obtenção dos compostos químicos voláteis.**

<b>Espécies selecionadas</b>	<b>Peso (g)</b>
<i>Morus sp</i>	163,06
<i>Pedilanthus sp</i>	255,64
<i>Kalanchoe pinnata</i>	400,00

## 2.3 Obtenção de Extratos com Constituintes Fixos

Após os procedimentos de coleta, e lavagem das folhas das espécies selecionadas, as mesmas foram estocadas para secagem em estufa de ar-circulante modelo tipo A65EDAF com potência 220 W (marca Deleo equipamentos para laboratório), na faixa de temperatura de 45°C a 50°C, por 24h (*Morus sp.*) e 48h (*Pedilanthus sp.* e *K. pinnata*), sendo monitoradas 04 em 04 horas. Após este procedimento, as mesmas foram trituradas em um liquidificador, pesadas em balança semi-analítica (Tabela 2) e colocadas cada uma em erlenmeyers individuais de 1000 ml (*Morus sp.*) e 500 ml (*Pedilanthus sp.* e *K. pinnata*) adicionando-se o solvente extrator. A extração foi feita na ordem crescente de polaridade do solvente. Assim, o primeiro foi hexano, seguido de acetato de etila e metanol.

**Tabela 2. Quantidade de amostras utilizadas para obtenção dos compostos químicos fixos .**

<b>Espécies selecionadas</b>	<b>Peso (g)</b>
<i>Morus sp</i>	77,0
<i>Pedilanthus sp</i>	44,2
<i>Kalanchoe pinnata</i>	18,5

Para obtenção dos extratos com constituintes fixos foi adotado o método de extração por ultra-som a frio (modelo USC- 2.800, com frequência 40 kHz e potência de 154W, marca unique), pois segundo COTTA *et al.* (2009), FLORES *et al.*, (2009), ALMEIDA (2008), STARK & NUNOMURA (2007) e NASCIMENTO *et al.*, (2006), este é um dos métodos que apresenta um melhor rendimento e menor tempo de obtenção dos extratos em comparação com a maceração. Cada extração foi programada por 15 minutos, seguida de filtração do sobrenadante a vácuo e concentrada em evaporador rotatório. O solvente coletado em evaporador rotatório foi aproveitado para a próxima extração. Este procedimento foi repetido (03) vezes consecutivas para cada solvente. Após o término da extração com o primeiro solvente, o extrato foi transferido para um

recipiente previamente pesado e identificado. Deixando-o secar a temperatura ambiente. Em seguida, o mesmo foi pesado em balança analítica. O rendimento foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{Rendimento \%} = \text{massa obtida/massa total} \times 100 \quad [\text{Eq.01}]$$

Este procedimento foi repetido para os outros solventes extratores. O volume de cada solvente extrator utilizado para cada espécie vegetal é descrito na Tabela 3.

**Tabela 3. Volume de solvente extrator utilizado para obtenção dos compostos químicos fixos.**

Espécies selecionadas	Solventes extratores		
	Hexano (ml)	Acetato de etila (ml)	Metanol (ml)
<i>Morus sp</i>	200	200	250
<i>Pedilanthus sp</i>	250	350	250
<i>Kalanchoe pinnata</i>	100	100	100

## 2.4 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Para realização do perfil cromatográfico foi necessário conhecer o sistema de solvente ideal, ou seja, saber quais os melhores solventes extratores e em quais proporções adequadas para o arraste dos grupos de substâncias de interesse. Foram testadas várias combinações de solventes, dentre elas: hexano (100%), hexano/acetato de etila (1:1), hexano/acetato de etila (8:2), hexano/acetato de etila (6:4) e hexano/acetato de etila (7:3). Sendo todas as placas visualizadas em luz U.V no comprimento de onda de 264nm e 365nm. Se a placa apresentasse alguma banda cromatográfica nestes comprimentos de luz, as mesmas eram submetidas ao reagente de Godin (vanilina e ácido sulfúrico 5% na proporção de 1:1) e aquecidas por três (03) ou cinco (05) minutos a 100°C. Este reagente foi utilizado, por ser um revelador universal que indica através da visualização da cor rosa ou azul a presença de saponinas (WAGNER & BLADT, 1996).

## 3 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

### 3.1 Obtenção de Óleos Essenciais

Para os espécimes selecionados não se obteve óleo essencial.

### 3.2 Obtenção de Extratos com Constituintes Fixos

Foram obtidos nove (09) extratos diferentes com constituintes fixos. Três (03) tipos de extratos para cada espécie vegetal selecionada. Os rendimentos de cada espécie é mostrado na Tabela 4.

### 3.3 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As três amostras foram submetidas ao sistema de solvente hexano/acetato de etila na proporção 7:3, sendo utilizado os reveladores luz ultravioleta (U.V) nos comprimentos de onda de 264nm e 365nm e Godin. A amostra que deu resultado para este sistema de solvente e que confirmou a banda cromatográfica vista em luz ultravioleta (U.V) e no revelador Godin foi *Morus sp* (Tabela 5).

**Tabela 4. Rendimento dos extratos com compostos químicos fixos.**

Espécies vegetais	Rendimento dos extratos (%)		
	Hexano	Acetato de etila	Metanol
<i>Morus sp.</i>	4,15	2,32	11,62
<i>Pedilanthus sp.</i>	4,50	0,58	7,53
<i>K. pinnata</i>	0,84	1,38	6,00

**Tabela 5. Resultados do perfil cromatográfico das três (03) amostras testadas contra *E. faecalis*.**

Reveladores	Amostras		
	<i>Morus sp.</i>	<i>K. pinnata</i>	<i>Pedilanthus sp.</i>
U.V 264nm	SIM	NÃO	NÃO
U.V 365nm	SIM	NÃO	SIM
Reagente Godin	SIM	NÃO	NÃO

Há relatos que mostram que óleos essenciais são constituídos por um grupo de compostos que apresentam atividade antimicrobiana (SIMÕES *et al.*, 2004). As espécies estudadas não apresentaram óleo essencial para o tipo de método empregado. Num futuro próximo, espera-se testar outros métodos de extração de óleo essencial para as amostras usadas.

A espécie que apresentou um melhor resultado para todos os reveladores utilizados foi *Morus sp.* (amoreira). Revelando a presença do grupo químico das saponinas, moléculas que possuem uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e a outra parte hidrofílica (açúcares). Este grupo apresenta algumas propriedades biológicas tais como a ação sobre membranas, desorganizando-as, ação antifúngica e anti-helmíntica (SIMÕES *et al.*, 2004). *Pedilanthus sp.* (coramina) apresentou resultado positivo apenas para o comprimento de onda de 365nm, enquanto para os outros reveladores não apresentou qualquer resultado, ou seja, não apresentou bandas cromatográficas para saponinas. *Kalanchoe pinnata* (corama) não apresentou qualquer resultado para os reveladores utilizados. As duas últimas espécies de plantas não apresentaram resultados satisfatórios provavelmente devido a concentração do sistema de solventes não ser apropriada para as mesmas. Vale lembrar que, a concentração do sistema de solventes é feita por tentativa ou baseada em estudos já realizados. Como as espécies apresentadas neste trabalho ainda foram pouco estudadas não se encontrou o sistema ideal para separação dos grupos químicos em cromatografia de camada delgada (CCD). Assim, espera-se em estudos posteriores testar outros tipos de concentração de solventes e verificar quais os prováveis grupos de compostos químicos antimicrobianos presentes nestas amostras.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As três (03) amostras de espécies vegetais que apresentam atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* foram submetidas a procedimentos fitoquímicos em busca de bioativos que poderão servir como base para o desenvolvimento de um fármaco com ação antimicrobiana contra *E. faecalis*. O perfil cromatográfico feito neste trabalho indicou a presença do grupo de composto químico das saponinas em *Morus sp.* Espera-se que num futuro próximo, que as mesmas amostras sejam submetidas a outros tipos de testes fitoquímicos, obtendo assim informações de outros grupos químicos presentes nas mesmas.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, BCM; LUCENA, JMVM; AGUIAR, LCS. Estudo da capacidade de adesão microbiana a superfícies tratadas com diferentes extratos de origem vegetal. **Anais**. IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica. Belém, Pará, 2009.
- ALMEIDA, M. de F. O. **Contribuição ao estudo fitoquímico de *Gustavia elliptica* (LECYTHIDACEAE)**. Dissertação. Universidade Federal do Amazonas. Instituto de Ciências exatas, Departamento de Química, Programa de pós-graduação em Química, Manaus, Amazonas, 2008.
- BUDZIK, J. M.; SCHNEEWIND, O. 2006. Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis. **The Journal of Clinical Investigation**. 2582.
- COTTA, J. A. O.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D. **Avaliação de solventes de extração por ultrassom usando-se cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em solos contaminados**. Quím. Nova, vol. 32, n.8, 2026-2033, 2009.
- FLORES, R.; NICOLoso, F. T.; BRONDANI, D.; MALDANER, J.; CEZAROTTO, V.; GIACOMELLI, S. R. **Extração de ecdisterona em raízes de ginseng brasileiro**. Ciência rural, Santa Maria, v.39, n.4, p.1223-1226, jul, 2009.
- LOVE, R. M. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. **International Endodontic Journal**, 2001 (34):399-405
- NASCIMENTO, C. B.; MOURA, C. J.de; CRUVINEL, F. W. O.; PAULA, Y. O. Extração com solventes e quantificação dos curcuminóides a partir do pó de rizomas do açafrão (*Curcuma Longa L.*) de Mara Rosa-GO. Resumo. **Anais** da 58ª Reunião Anual da SBPC-Florianópolis, SC, 2006.
- REVILLA, Juan. **Cultivando a saúde em hortas caseiras e medicinais**. 5ª ed. Manaus: Sebrae, 2004.
- STARK, G.; NUNOMURA, S.M.; NUNOMURA, R.C.S. Desenvolvimento de perfis cromatográficos de guaraná por CLAE. Resumo. **Anais** da 30ª Renião da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo, 2007.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed.rev.ampl. Porto alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.
- WAGNER, H; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. Berlin: Springer, 1996.