

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Sphagneticola trilobata* (L. C. RICH.) PRUSKI EM *Pseudomonas aeruginosa* (SCHROETER) MIGULA

Camila Carvalho Pimentel da Cruz*

RESUMO: A avaliação da atividade antimicrobiana determina a sensibilidade de um determinado microrganismo em concentrações conhecidas de drogas. O uso de extratos vegetais e fitoquímicos de conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir significado nos tratamentos terapêuticos. Estudos desenvolvidos com *Sphagneticola trilobata* (sin. *Wedelia paludosa*) indicaram que a mesma apresenta vários compostos de interesse medicinal. *Pseudomonas aeruginosa* são bacilos gram-negativos, aeróbios, ubíquos de comportamento oportunista que produzem um pigmento extracelular azul-esverdeado. A resistência das *Pseudomonas* à maioria dos antibióticos tem sido uma fonte de preocupação médica. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Sphagneticola trilobata* (L. C. Rich.) Pruski, na cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853. Foram coletadas folhas da planta em estudo no Parque Ecológico INDES, em Vila de Sauípe, no município de Mata de São João - BA, para preparo do extrato hidroalcoólico. Os testes para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados através do método de diluição do extrato em Ágar Mueller Hinton. Os resultados demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *S. trilobata* (L. C. Rich.) Pruski inibiu o crescimento da cepa de *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853 nas concentrações acima de 2mg/mL. Os resultados confirmaram a capacidade de inibição do crescimento bacteriano *in vitro* pelo extrato das folhas de *S. trilobata* (L. C. Rich.) Pruski sobre *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853 podendo tornar-se uma alternativa antibacteriana de origem natural, eficaz e econômica.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; *Sphagneticola trilobata*; *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUÇÃO

A atividade antimicrobiana é medida *in vitro*, para determinar a sensibilidade de determinado microrganismo em concentrações conhecidas de drogas (JAWETZ et al., 1989).

Desde os primórdios da sua existência, os homens utilizam vegetais para a proteção da saúde. As plantas com propriedades terapêuticas sempre foram usadas tradicionalmente, passando o conhecimento de geração para geração (JACOBY et al., 2002).

A fitoterapia é definida como a ciência que trata os problemas de saúde utilizando vegetais, sendo contemporâneo ao início da civilização (PANIZZA, 2003). Constituindo uma forma de terapia medicinal que vem crescendo notadamente nestes últimos anos, ao ponto que atualmente o mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de aproximadamente 22 bilhões de dólares (YUNES et al., 2001).

Nos últimos anos, tem sido verificado um grande avanço científico envolvendo estudos fitoquímicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isso pode ser observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta

* Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Católica do Salvador – UCSal; Bolsista de Iniciação Científica – FAPESB; ccpcruz@yahoo.com.br. Orientador: Juan Carlos Rossi Alva, Doutor em Bioquímica pela UFRJ; Pesquisador do LEMA/UCSal / FAPESB / CNPq; jcrossi@ucsal.br. Co-orientadora: Luzimar Gonzaga Fernandez, Doutora em Biologia Molecular Estrutural pela UPC – Barcelona, Espanha; Coordenadora e Pesquisadora do LEMA/UCSal; Professora do ICS-UFBA; luzimar@ucsal.br.

área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos científicos sobre produtos naturais (CECHINAL FILHO & YUNES, 1998).

Entre os principais produtos de origem vegetal com atividade antimicrobiana, estão os extratos, que são produtos obtidos pelo tratamento de substâncias vegetais por um solvente apropriado que será evaporado até que seja alcançada a consistência desejada (COUTINHO et al., 2004). O uso de extratos vegetais e fitoquímicos de conhecida atividade antimicrobiana podem adquirir um notório significado nos tratamentos terapêuticos (LOGUERCIO et al., 2005; COUTINHO et al., 2004).

Sphagneticola trilobata (sin. *Wedelia paludosa*) pertencente a família Asteraceae, muitas vezes usada tradicionalmente no tratamento de doenças, conhecida popularmente conhecida como **védélia**, é uma planta ornamental, de hábito herbáceo, perene, prostrada, muito ramificada, estolonífera, de 40-60 cm de altura, nativa de quase toda a costa do Brasil (LAAR, et al. 2001). Estudos desenvolvidos em laboratórios com esta planta indicaram que a mesma apresenta vários compostos de interesse medicinal (CECHINEL FILHO, 2000; WERPACHOWSKI et al., 2004; SILVA et al., 2004).

Pseudomonas são microrganismos ubíquos, encontrados no solo, na matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água. Também podem ser encontrados em ambientes hospitalares como em reservatórios úmidos, equipamentos de tratamento respiratório e até mesmo em soluções de desinfetantes. Possui comportamento oportunista, relacionado às várias manifestações clínicas no homem e em animais (TANAKA et al., 2002; MURRAY et al., 2002).

Pseudomonas aeruginosa são bacilos gram-negativos retos ou ligeiramente curvados móveis devido à presença de flagelos polares, não são fermentadores, ocorrem isolados, aos pares e, ocasionalmente, em pequenas cadeias, normalmente aeróbios podendo crescer anaerobicamente, produzem um pigmento extracelular solúvel, azul-esverdeado (MURRAY et al., 2000; MURRAY et al., 2002; TORTORA et al., 2003; JAWETZ et al., 1989). A identificação baseia-se na morfologia das colônias, na oxidase-positiva e na presença de pigmentos característicos, seu crescimento a 42°C ajuda a diferenciá-la de outras espécies de *Pseudomonas* (JAWETZ et al., 1989).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Sphagneticola trilobata* (L. C. Rich.) Pruski em *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853.

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho de pesquisa foi realizado no LEMA/UCSal (Laboratório de Estudos em Meio Ambiente).

Material vegetal

A coleta do material botânico foi realizada no dia 21 de agosto de 2004, no Parque Ecológico INDES (Instituto de Desenvolvimento Sustentável do Litoral Norte da Bahia), localizado no Município de Mata de São João, na Vila de Sauípe, no Km 76 da Linha Verde entre as coordenadas 12°33'16'' latitude Sul e 037°55'27'' longitude Oeste (Magellan – GPS 315).

A identificação da espécie do material botânico foi realizada pela Dr^a Hortência Pousada Bautista através de uma exsicata da planta e depositada no Herbário RadamBrasil (HRB) sob o número de registro de 51540.

Preparo do extrato

Ao chegar o material vegetal ao Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA) da Universidade Católica do Salvador (UCSal), este foi imediatamente colocado para secar em estufa a 35°C, para a eliminação da umidade (CAMPOS, 1991). Após esse período, as folhas foram trituradas (CARVALHO et al., 2002).

O preparo do extrato bruto foi feito através do método de maceração alcoólica sendo mantido à temperatura ambiente por 48 horas. Após esse período, o extrato foi filtrado em um pano fino e posteriormente em papel filtro com auxílio de uma Bomba de Vácuo. O solvente do extrato foi evaporado utilizando um Rotaevaporador e o “Air dryer”. Posteriormente, o extrato foi pesado e mantido no dessecador até o preparo das soluções (MATOS, 1988).

Microrganismos

A confirmação da integridade e da pureza da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853 foi realizada através da coloração de Gram e a prova de oxidase (OPLUSTIL et al., 2000). A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853 foi mantida em tubos de cultura devidamente identificados contendo 4mL de meio TSA (Tryptic Soy Agar - Merck). Antes do repique, o meio passou pelo teste de esterilização na estufa a 37°C. O repique foi feito retirando algumas colônias da matriz com auxílio da alça de platina, os tubos foram fechados e encubados a 37°C por 18-20 horas e, após este período, os repiques foram conservados a 4°C (OPLUSTIL et al., 2000).

Preparo das concentrações

As concentrações testadas foram baseadas no trabalho de Andrews (2001). Na placa controle 1 (branco), não foi adicionado nem extrato nem etanol 70%. Na placa controle 2 (etanol), foi adicionado 1mL de etanol 70%. Nos testes 1 “Tabela 1” e 2 “Tabela 2”, a concentração foi de 1mg de extrato bruto para 1mL de etanol 70%, no teste 3 “Tabela 3” de 2mg de extrato bruto para 1mL de etanol 70% e no teste 4 “Tabela 4” de 60mg de extrato bruto para 1mL de etanol 70%.

Tabela 1 - Concentrações do extrato hidroalcoólico (1mg de extrato bruto/ml de etanol) testadas em placas de Petri com 70 mm de diâmetro.

Placa	Concentração (mg/mL)	Massa final (mg x Placa)	Vol. de extrato (µL)
1 (Branco)	0,000	0,000	0
3	0,001	0,010	10
4	0,002	0,020	20
5	0,004	0,040	40
6	0,008	0,080	80
7	0,016	0,160	160
8	0,032	0,320	320
9	0,064	0,640	640
14	0,128	1,280	1280

Tabela 2 - Concentrações do extrato hidroalcoólico (1mg de extrato bruto/ml de etanol) testadas em placas de Petri com 90 mm de diâmetro.

Placa	Concentração (mg/mL)	Massa final (mg x Placa)	Vol. de extrato (µL)
1 (Branco)	0,000	0,000	0
8	0,032	0,640	640
9	0,064	1,280	1280
10	0,080	1,600	1600
11	0,088	1,860	1860
12	0,096	1,920	1920
13	0,112	2,240	2240
14	0,128	2,560	2560
15	0,160	3,200	3200

Tabela 3 - Concentrações do extrato hidroalcoólico (2mg de extrato bruto/ml de etanol) testadas em placas de Petri com 90 mm de diâmetro.

Placa	Concentração (mg/mL)	Massa final (mg x Placa)	Vol. de extrato (µL)
1 (Etanol)	0,000	0,000	0
10	0,080	1,600	800
11	0,088	1,760	880
12	0,096	1,920	960
13	0,112	2,240	1120
14	0,128	2,560	1280
15	0,160	3,200	1600

Tabela 4 - Concentrações do extrato hidroalcoólico (60mg de extrato bruto/ml de etanol) testadas em placas de Petri com 90 mm de diâmetro.

Placa	Concentração (mg/mL)	Massa final (mg x Placa)	Vol. de extrato (µL)
1 (Branco)	0,000	0,000	0
2 (Etanol)	0,000	0,000	0
16	1,000	20,000	334
17	2,000	40,000	667
18	3,000	60,000	1000

Teste para avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi feita em duplicata pelo método da diluição do extrato em Ágar Mueller Hinton (Biobrás). Os meios de cultura foram preparados utilizando-se um volume final de 10 ou 20mL conforme o diâmetro da placa, os meios foram autoclavados em erlenmeyers individuais. Após ser esterilizado, a temperatura do meio foi equilibrada a 45°C em banho-maria, foi adicionado volume adequado do extrato hidroalcoólico com a finalidade de

obter as concentrações previamente determinadas. Este material passou por um teste de esterilização na estufa a 37°C.

Os inóculos foram obtidos a partir da cepa de *P. aeruginosa* ATCC 27853 crescidas a 37°C por 18-20 horas em meio TSA; preparou-se em solução fisiológica suspensões padronizadas pela turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala MacFarland. As placas foram semeadas até 30 minutos do preparo do inóculo (ANDREWS, 2001; BRITO et al., 2001).

Foi adicionado 100µL da suspensão bacteriana com o auxílio da micropipeta e semeado no meio com a alça de Drigalski e nos testes 3 e 4 foi utilizado “swab”. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por 18-20 horas. Segundo Oplustil e colaboradores (2000), a leitura é feita pela presença ou ausência de crescimento de colônias na superfície do ágar. Sendo realizada com 24 horas após a semeadura.

A coloração de Gram e a prova de oxidase confirmaram a integridade e a pureza da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853.

Os testes foram realizados testando 16 concentrações com a finalidade de avaliar a inibição do crescimento da cepa *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853. Nas placas controle 1 (branco) e controle 2 (etanol), não houve inibição do crescimento bacteriano.

Nos testes 1, 2, 3 e 4 onde foram avaliadas as concentrações do extrato hidroalcoólico entre 0,001 e 1,000mg/mL não apresentou atividade antibacteriana, ou seja, não houve inibição do crescimento da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853 com leitura após 24 horas de incubação “Tabela 5”. Nas figuras 1 e 2, são apresentadas placas de Petri com Ágar Mueller Hinton contendo o extrato hidroalcoólico de *Sphagneticola trilobata* nas concentrações de 0,0320mg/mL “Figura 1a”, 0,080mg/mL “Figura 1b”, 0,096mg/mL “Figura 2a” e 0,128mg/mL “Figura 2b”.

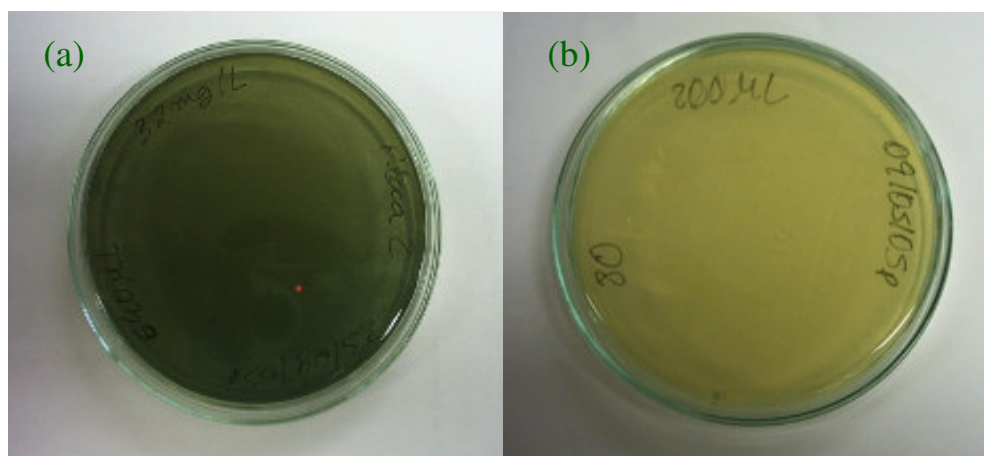


Figura 1 - Ágar Mueller Hinton contendo extrato hidroalcoólico de *Sphagneticola trilobata* semeado com *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de (a) 0,032 e (b) 0,080mg/ml.

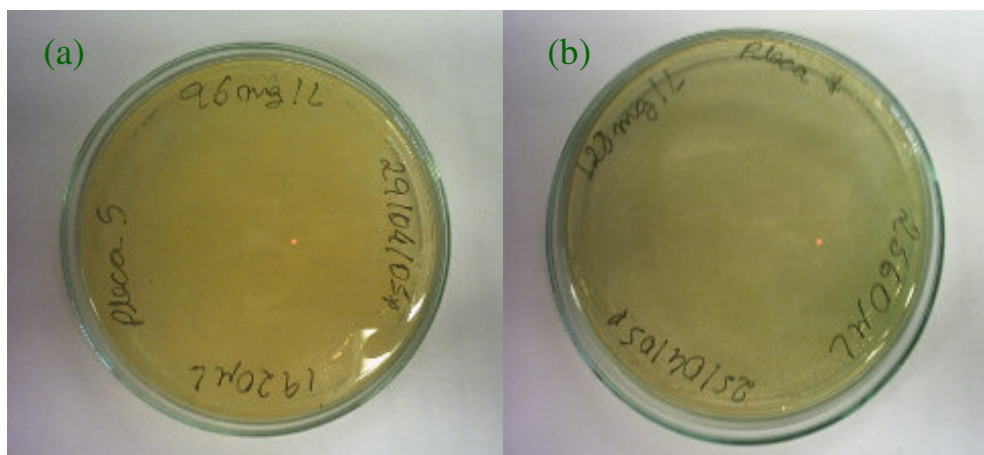


Figura 2 - Ágar Mueller Hinton contendo extrato hidroalcoólico de *Sphagneticola trilobata* semeado com *Pseudomonas aeruginosa* nas concentrações de (a) 0,096 e (b) 0,128mg/ml.

Quando avaliada, a concentração de 2,000mg/mL foi observado um início de inibição, a qual foi obtida totalmente com a concentração de 3,000mg/mL. Na tabela 5, são mostradas as concentrações em que não houve e na única que existiu inibição do crescimento, e a avaliação foi feita após 24 horas em estufa a 37°C. Os resultados evidenciaram a susceptibilidade da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula ATCC 27853 ao extrato hidroalcoólico de *Sphagneticola trilobata* (L. C. Rich.) Pruski.

Tabela 5 - Avaliação da inibição do crescimento de *P. aeruginosa* utilizando diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de *Sphagneticola trilobata*.

Placa	mg/mL	Inibição das cepas (24 horas)
1 (Branco)	0	Não inibiu
2 (Etanol)	0	Não inibiu
3	0,001	Não inibiu
4	0,002	Não inibiu
5	0,004	Não inibiu
6	0,008	Não inibiu
7	0,016	Não inibiu
8	0,032	Não inibiu
9	0,064	Não inibiu
10	0,080	Não inibiu
11	0,088	Não inibiu
12	0,096	Não inibiu
13	0,112	Não inibiu
14	0,128	Não inibiu
15	0,160	Não inibiu
16	1	Não inibiu
17	2	Não inibiu
18	3	Inibiu

A concentração encontrada para a inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* foi maior que a esperada provavelmente pelo seu alto grau de resistência aos antibióticos. Outros trabalhos comprovam a ineficiência de diversos antibióticos sejam fitoterápicos ou quimioterápicos. Porém o resultado positivo obtido neste trabalho faz de *Sphagneticola trilobata* (L. C. Rich.) Pruski uma provável solução para tratamento de doenças causadas por *P. aeruginosa*.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos e nas condições em que foi conduzida a presente pesquisa, pode-se sugerir que existem substâncias com atividade antibacteriana sobre bactérias gram-negativas nas folhas de *Sphagneticola trilobata* (L. C. Rich.) Pruski.

Faz-se necessária a continuidade do trabalho para avaliação de novas concentrações, utilizando também outros métodos para o preparo do extrato, para o estudo fitoquímico e toxicológico assim como o isolamento dos princípios ativos desta planta, para um futuro uso do extrato ou dos princípios ativos no controle de bactérias resistentes a antibióticos convencionais.

REFERÊNCIAS

ANDREWS, J.M. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 5-16, 2001.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração Mínima Inibitória de Dez Antimicrobianos para Amostras de *Staphylococcus aureus* Isoladas de Infecção Intramamária Bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 53, n. 5, out. 2001.

CAMPOS, J.M. **Guia Prático de Terapêutica Externa: Métodos e Procedimentos Terapêuticos de Grande Simplicidade e Eficácia**. São Paulo: Cultrix/Pensamento, 1991. p. 183, 187,189.

CARVALHO, A.A.T.; SAMPAIO, M.C.C.; SAMPAIO, F.C.; MELO, A.F.M.; SENA, K.X.F.R.; CHIAPPETA, A.A.; HIGINO, J.S. Atividade Antimicrobiana *in vitro* de Extratos Hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre Bactérias Gram-Negativas. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 21, n. 4, p. 255-258, set. 2002.

CECHIEL FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a Partir de Plantas Medicinais. Conceito sobre Modificação Estrutural para Otimização da Atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CECHIEL FILHO, V.C. Principais Avanços e Perspectiva na Área de Produtos Naturais Ativos: Estudos Desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.

COUTINHO, H.D.M.; BEZERRA, D.A.C.; LÔBO, K.; BARBOSA, I.J.F. Atividade Antimicrobiana de Produtos Naturais. **Conceitos**, Paraíba, n. 10, jun. 2004. Disponível em:

<http://www.adufpbjp.com.br/publica/conceitos/10/art_11.pdf>. Acessado em: 15 de março de 2005.

JACOBY, C.; COLTRO, E.M.; SLOMA, D.C.; MÜLLER, J.; DIAS, L.A.; BERUSKI, P.. Plantas Medicinais Utilizadas pela Comunidade Rural de Guamirim, Município de Irati, PR. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 4, n. 1, p. 79-89, jul. 2002.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 18 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. p. 185.

LAAR, M.; SOUZA, C.; PAIVA, V.L.A.; NISETE, A.A.; TAVARES, S.; GROMME, W.F.; GUSMÃO, F.; KÖHLER, M.; SCHIMIDT, M. Estudo de Aplicação de Plantas em Telhados Vivos Extensivos em Cidades de Clima Tropical. Encontro Nacional de Amigos CePECS - **ENAC 2001** Disponível em: <<http://www.fh-nb.de/lu/mankoebler/download/encac-telhadoverde-fp.doc>> Acessado em: 27 de maio de 2005.

LOUGUERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A.C.; HENZEL, A.; WITT, N.M. Atividade Antibacteriana de Extrato hidro-alcoólico de Folhas de Jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar./abr. 2005.

MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. Fortaleza: EUFC, 1988. 86p.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiología Médica**. 4 ed. Madrid: Elsevier Science, 2002. p. 293-298.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 215-218.

OPLUSTIL, C.P. ; ZOCCOLI, C.M. ; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Savier, 2000. p.165-180.

PANIZZA, S. **Fitoterapia**. Meta Design. São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.fitoterapia.com.br>> Acessado em: 30 de maio de 2005.

SILVA, R.; MAIA, S. S. S.; CARDOSO, PINTO, E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Rendimento de Extratos e Triagem Fitoquímica de Ponta Livre (*Wedelia paludosa* D. C). In: Congresso Brasileiro de Olericultura -CBO 2004 – **Associação Brasileira de Horticultura**, 1999. Disponível em: <<http://www.horticiencia.com.br/anais/anais.asp?id=1661>> Acessado em: 26 de maio de 2005.

TANAKA, E.M.; RIBEIRO, M.G.; MEGID, J.; LISTONI, F.J.P. Tris-EDTA no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana *in vitro* em Amostras de *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 3, jun. 2002.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ed. Porto Alegre: ArtMed, 2003. p. 299, 549-550.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A Necessidade do Desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

WERPACHOWSKI, J. S.; VARASSIN, I.G.; GOLDENBERG, R. Ocorrência de Apomixia e Partenocarpia em Algumas Espécies Subtropicais de Asteraceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 3, p. 607-613, jul./set., 2004.