

POTÊNÇIAL ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DOS METABÓLITOS PRODUZIDOS PELA *VISMIA GUIANENSIS* (AUBL.) CHOISY, FRENTE AOS MICRO-ORGANISMOS *ESCHERICHIA COLLI*, E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E *PROTEUS VULGARIS*.

1 – Charles Barbosa dos Reis.

2 - Andrey Azedo Damasceno

1-Acadêmico do 8º Período de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas - CEST/UEA

2- Graduado em Ciências Biológicas, Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Amazonas UFAM.

RESUMO

As espécies *Vismia guianensis* (Aubl.), conhecidas popularmente por lacre é encontrada na região Amazônica, sendo bastante utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas moléstias, principalmente infecções e dermatomicoses. Diante do exposto, o presente trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos da presente espécie, obtido a partir das folhas e utilizando distintas técnicas de extração de seus metabólitos. A Coleta foi realizada no município de Tefé-AM, estes foram desidratados á 35⁰C por 48horas, sendo triturados em liquidificador industrial, Para cada 30 gramas do material triturado foi acrescido 250 ml do solvente álcool 70%, utilizando como extrator o Soxhlet. Para o extrato a frio utilizou-se as mesmas proporções de material biológico e de solvente deixado em repouso por um período de 72h em um recipiente âmbar.As diluições dos extratos utilizadas foram 0,4 µg para ambos e diluídas em 20µl de DMSO, posteriormente acrescido 1,96 mL de água destilada.Os micro-organismos foram cultivados meio nutriente (NA), por 24h em estufa á 37⁰C . O crescimento das bactérias foi ajustado a partir da escala de Mac Farland, utilizando-se o tubo 0,5 da mesma concentração padrão, o que equivale a 1,5x10⁸ bactérias/ml. As cepas de *E. colli*, e *S. aureus* e *P.vulgaris* foram semeadas nas placas de Petri 90x15mm contendo meio nutriente Mueller Hinton.O experimento foi realizado em triplicata, foi adicionado em 80 µl dos micro - organismos a serem avaliados nas placas de Petri 90x15mm e semeados com uma alça de Drigalsk. Utilizou-se a técnica de difusão de discos de ± 0,5 cm foram usados 4 discos por placa, em três adicionou-se 60 µl do extrato a ser avaliada e no quarto o grupo controle adicionou-se 60 µl de DMSO como controle negativo, posteriormente as placas foram a B.O.D.a temperatura de 37 °C por 24h para a observação de atividade do extrato. De modo geral os extratos avaliados mostraram-se eficientes frente aos micro-organismos *Escherichia colli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus*

vulgaris, Ressalta-se entretanto que os melhores resultados foram frente aos micro - organismos Gran-negativos *Escherichia coli*, isso para ambas as técnicas de extração.

Palavras-Chaves: Lacre; Extrato; Antibacteriana

ABSTRACT

The species *Vismia guianensis* (Aubl.), popularly known as seal is found in the Amazon region, being widely used in folk medicine to treat various diseases, especially infections and dermatomycoses. Given the above, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the extracts of this species, obtained from different extraction techniques metabolites. A collection was held in the city of Tefé-AM, they were dehydrated for 48 hours will 350C, being crushed in industrial blender, For every 30 grams of crushed material was added 250 ml of 70% ethanol solvent, such as using the Soxhlet extractor. To the cold extract was used the same proportions of biological material and solvent allowed to stand for a period of 72 hours in a container âmbar.As dilutions of the extracts were used for both 0.4 mg and diluted in 20µl of DMSO subsequently plus 1.96 mL water destilada.Os microorganisms were cultured nutrient medium (NA) for 24h in an oven at 370C. The growth of bacteria was adjusted from the range of Mac Farland, using the same tube of 0.5 standard concentration, equivalent to 1.5 x10⁸ bacteria / ml. The strains of *E. coli* and *S. aureus* and *P.vulgaris* were sown in Petri dishes containing nutrient medium 90x15mm Mueller Hinton. O experiment was performed in triplicate, was added at 80 µl of microorganisms to be evaluated in Petri dishes and seeded with a 90x15mm handle Drigalsk. It was used the technique of diffusion disks ± 0.5 cm were used four disks per plate, were added in three 60 µl of extract to be evaluated and fourth control group was added 60 µl of DMSO as negative control later the plates were Boda temperature of 37 ° C for 24 hours for observation of activity of the extract. Generally the extracts evaluated were effective against the microorganisms *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris*, should be noted however that the best results were against microorganisms Gran-negative *Escherichia coli*, that for both extraction techniques .

Key Words: Seal; Extract; Antibacterial

INTRODUÇÃO

Conhecida popularmente como “lacre”, pau-de-lacre, árvore-da-febre, caapia e caopia, pertence a família Clusiaceae (também denominada Guttiferae) (DISTASI;HIRUMA-LIMA, 2002). A família Clusiaceae compreende aproximadamente 1370 espécies, distribuídas em 45 gêneros de ocorrência em regiões tropicais. No Brasil ocorrem em todo o território, somando 131 espécies que estão distribuídas em 21 gêneros. Os gêneros são distribuídos em três subfamílias (Hypericoideae, Calophylloideae e Bonnetioideae), destacando-se alguns com importância medicinal no Brasil, como *Hypericum*, *Vismia*, *Clusia*, *Calophyllum*, *Garcinia* e *Kielmeyera*. Além da importância medicinal, esses gêneros apresentam importantes espécies econômicas para a produção de madeira, gomas, pigmentos, óleos essenciais e resinas (DISTASI;HIRUMA-LIMA,2002).

A espécie *Vismia guianensis* encontra-se comumente nas capoeiras, não tendo sido vista em abundância nas matas. É encontrada nas regiões do Norte e Nordeste do Brasil. Trata-se de arbusto ou árvore pequena, com folhas ovais,oblongas, inflorescência em panículas terminais e frutos globosos, carnosos e indeiscentes (ALMEIDA, 1993). Seus diásporos são dispersos por animais (zooecoria) (PINHEIRO; RIBEIRO, 2001) e utilizada pela aplicação de seu látex e da infusão das folhas, no combate das afecções dermatológicas denominadas “impingens” causadas por fungos, além de outras aplicações, como purgativo (ALBUQUERQUE, 1980). O decocto e infusão das suas folhas e cascas são utilizados para reumatismo, como tônico e Antitérmico (ALMEIDA, 1993). Estudos tem revelado a atividade de *Vismia guianensis* no combate a células cancerígenas. Pasqua e colaboradores (1995) mostraram que a vismiona, metabolito presente em *Vismia guianensis* e em outras espécies do gênero, mostrou atividade *in vitro* contra linhagem de tumores experimentais – carcinoma de ovário M5076 e melanocarcinoma B16. Suffredini e colaboradores (2007) mostraram uma acentuada atividade letal dos extratos orgânicos e aquosos de *V. guianensis* frente a linhagem MCF-7 de adenocarcinoma de mama humana. Em *Vismia guianensis* foi detectada a presença de diversos compostos, como a vismiona e a ferruginina; além de xantonas, antraquinonas, benzofenonas e benzocumarinas. A vismiona apresenta potencial atividade antimalarica (DISTASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Se o e colaboradores (2000), a partir de extratos das raízes de *Vismia guianensis* isolaram cinco benzofenonas ,vismiaguiononas e duas benzocumarinas. Monache e colaboradores (1980), identificaram na composição química dos frutos de *V. guianensis* dois antranoides prenilados (g-hidroxi-ferruginina A e g,g-dihidroxi-ferruginina A).Mais recentemente, compostos fenólicos presentes nos extratos dos frutos de *V. guianensis*

tem mostrado atividade antioxidante, como e o caso dos antranoides prenilados ferruginina A e g-hidroxiferruginina e da antraquinona vismiona A (ALVAREZ et al., 2008). Por tanto devido ao uso popular e a escassez de pesquisas realizadas com extratos de *Vismia guianensis* (Aubl.), por tanto o presente trabalho tem como objetivo avaliar a sensibilidade dos micro-organismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*, aos extratos hidroalcoolicos obtidos a partir das folhas da *Vismia guianensis* (Aubl.), utilizando diferentes técnicas de extração dos metabólitos produzidos, de modo a gerar resultados para pesquisas biotecnológicas futuras evidenciando assim o conhecimento da biodiversidade Amazônica.

MATERIAL E MÉTODO

As coletas foram realizadas na estrada da Agrovila, Km 8, nos mês de agosto 2012 no Município de Tefé-Am . Os exemplares obtidos foram processados segundo os métodos usuais em taxonomia vegetal (Bridson & Forman 1998) e incorporados ao Herbário da universidade Federal do Amazonas - UFAM. A presente pesquisa foi desenvolvida no Centro de Estudos Superiores de Tefé (CEST) , no laboratório de Biologia. Foi utilizado como solvente álcool 70% para retirada dos componentes bioativos presente nas folhas dos exemplares. Após a coleta do material estes foram previamente selecionados e desidratados á temperatura de 35⁰ C na estufa por 48 horas, posteriormente foram triturados em liquidificador industrial e passados em peneira de 60 mesh. Para cada 30 gramas do material biológico triturado foi acrescido 250 ml do solvente e utilizado como extrator o Soxhlet para extração a quente dos compostos Bioativos . Para o extrato a frio utilizou-se as mesmas proporções de material biológico e de solvente (30g para 250 ml) e deixado em repouso por um período de 72 h em um recipiente âmbar, para evitar possíveis reações com a luz. Os extratos obtidos foram concentrados em fluxo forçados em capela de exaustão em temperatura ambiente 28 – 30° C, até se obter um concentrado. Essa metodologia foi descrita pela primeira vez por Smânia (2003). Posteriormente os extratos foram pesados, etiquetados e armazenados em um dessecador por 48h, até as diluições dos bioensaios.

BIOENSAIO

As diluições dos extratos utilizadas foram de 0,4 µg para ambos e diluídas em 20 µl de DMSO, posteriormente acrescido 1,96 ml de água destilada. As cepas bacteriológicas foram cedidas pelo laboratório de microbiologia da UEA-MBT (Universidade do Estado do Amazonas – MBT- Mestrado em Biotecnologia). Os micro-organismos foram semeados em

tubos de ensaios contendo meio nutriente (NA) (glicose, pepetona e caldo de carne), para o crescimento e mantidas em estufa á 37⁰C por 24h. Após o crescimento das bactérias o inoculo foi ajustado a partir da escala de Mac Farland, utilizando-se o tubo 0,5 da mesma concentração padrão, o que equivale a 1,5x10⁸ bactérias/ml. As cepas de *Escherichia colli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*, foram semeadas nas placas de Petri 90x15mm contendo meio nutriente Mueller Hinton. Para preparar o meio utilizou-se 38 gr para 1000ml de água destilada, posteriormente foi alto-clavado a 1atm por 20 min. a 121⁰ C, após a esterilização o mesmo foi vertido em placas de Petri 90x15mm previamente esterilizadas. O experimento foi realizado todo em triplicata, posteriormente inoculou-se em 80 µl dos micro-organismos a serem avaliados nas placas de Petri e com a utilização de uma alça de Drigalsk os mesmos foram plaqueados individualmente .Após esterilizar discos de difusão de ± 0,5 cm utilizou-se 4 discos por placa, onde em três adicionou-se 60 µl do extrato a ser avaliada e no quarto o grupo controle adicionou-se 60 µl de DMSO como controle negativo, em seguida as placas foram levadas a B.O.D. á temperatura de 37 °C por 24h para a observação de atividade do extrato nos micro-organismos.

RESULTADO E DISCUSSÃO

A *Vismia guianensis* (Aubl.), conhecida popularmente como lacre é de fácil acesso na floresta Amazônica, sendo freqüentemente empregada na medicina popular no tratamento de dermatofitoses, afecções dermatológicas e micoses. No teste geral de atividade antimicrobiana, os ensaios realizados, evidenciou-se que de modo geral todos os tratamentos avaliados foram sensíveis os extratos da *Vismia guianensis* (Aubl.), resultado mostrado na (Figura 01). Outro aspecto importante foram as técnicas de extração utilizadas neste processo, onde ficou evidenciado uma ligeira sensibilidade das cepas de bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, obtendo halo de inibição de aproximadamente 8,5mm. No ensaio que mensura a sensibilidade de cepas Gram-negativas, obteve-se um resultado superior, tanto para *Escherichia colli*, com halos de 9,0mm ,quanto para *Proteus vulgaris*. Esta cepa evidenciou uma maior sensibilidade aos metabólitos produzidos pela *Vismia guianensis*, atingindo uma média de aproximadamente 9,7mm (Figura 01), outro ponto importante que pode também ter influenciado na presente pesquisa sendo que, nos micro-organismos Gram-negativos existem duas membranas, uma na face externa da parede celular e outra na face interna. Assim drogas com baixa lipossolubilidade têm maior dificuldade em agir sobre as bactérias Gram-negativas por causa da membrana externa (Fluhr *et al.*, 2010). Contudo existem proteínas na membrana

externa das bactérias Gram-negativas, denominadas porinas, que podem facilitar a passagem de substâncias para o espaço periplasmático (Eumkeb *et al.*, 2010).

Sensibilidade dos Micro - organismos frente ao Extrato obtido a partir da Técnica de Extração a frio

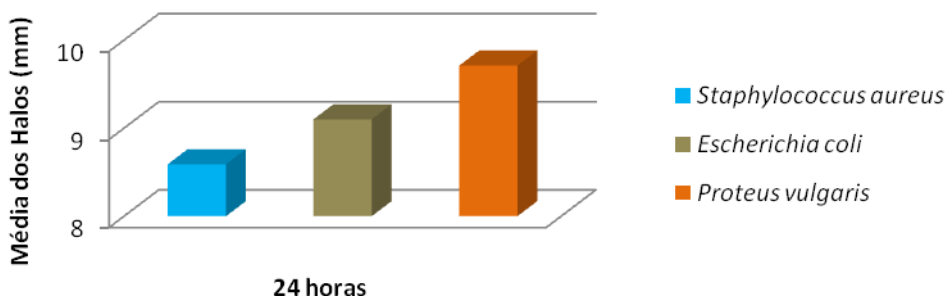


Figura01: Atividade antimicrobiana dos extratos da *Vismia guianensis* (Aubl.), obtido a partir da técnica de extração a frio, frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*.

Sensibilidade dos Micro - organismos frente ao Extrato obtido a partir do Extrator Soxhlet

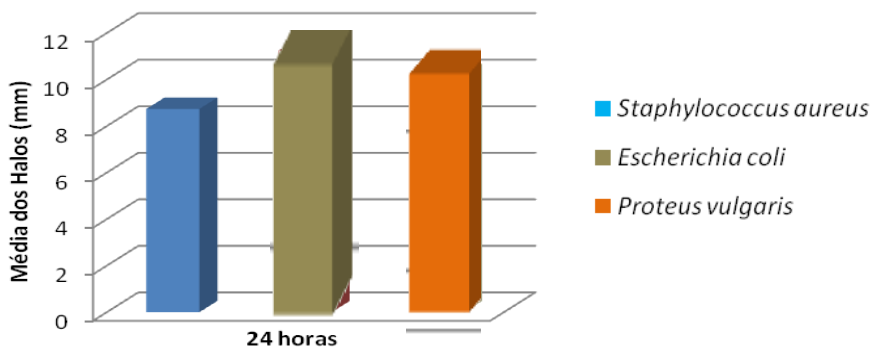


Figura02: Atividade antimicrobiana dos extratos da *Vismia guianensis* (Aubl.), utilizando o extrator Soxhlet, frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*.

Para o processo utilizando o extrator Soxhlet a atividade mensurada foi ligeiramente superior ao da extração a frio, para cepa Gram-negativa *E.coli*. Por outro lado para a cepa *P.vulgaris* em ambas metodologias de extração obteve-se resultados semelhantes (figura 02), resultados distintos foram mostrados frente aos micro-organismos *P.vulgaris*, onde na técnica de extração a frio ficou evidenciado um grau de sensibilidade superior quando comparado ao

com o extrator Soxhlet, obtendo halos de 9,6 e 9,0mm respectivamente. Provavelmente o presente resultado possa ter sofrido a influencia da A emodina também tem sido mencionada por exibir propriedades antiinflamatórias, pela redução da produção de citocinas em linfócitos T humanos e células endoteliais (KUMAR et al. 1998; KUO et al. 2001).

Os efeitos antibacterianos da emodina em *Escherichia coli* são explicados em razão de esta interferir na respiração e também no transporte de solutos nas membranas (CHAN et al. 1993). Ressalta-se no entanto que os metabólitos produzidos pela *Vismia guianensis* (Aubl.), possivelmente tenham influenciado no presente resultado. Segundo Politi e colaboradores (2004) estão presentes quatro classes de metabólitos secundários como componentes principais para as folhas da *V. guianensis*: antraquinonas, flavonóides, xantonas e benzofenonas, sendo a classe das antraquinonas o composto que apresentou o maior número de componentes encontrados, cujo esqueleto base dessa classe é a emodina: 1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona (Figura 3 - C).

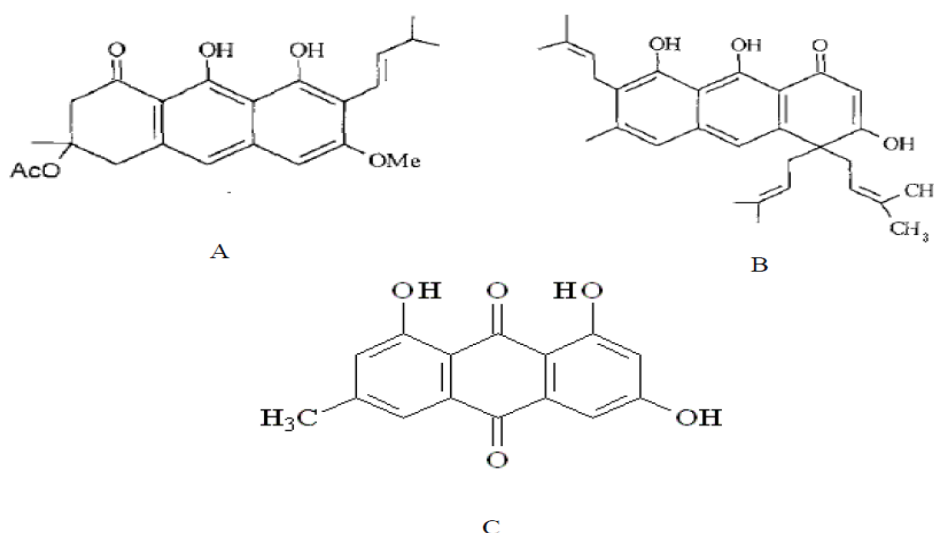


Figura 03: Compostos fenólicos Vismionina (A); Ferrunginina (B) e Antraquinona Emodina (C)

Outro ponto que merece nossa consideração é que possivelmente em função do aparelho extrator soxhlet poder interferir causando alterações na estrutura conformacional da molécula, ou ainda o uso de solventes orgânicos podem otimizar o processo de extração das biomoléculas. Ressalta-se, entretanto que o aquecimento contínuo do extrato pode levar a decomposição química das substancias termicamente ou quimicamente instáveis e de baixa polaridade (HOSTETTMANN et. al; 1997). Para o grupo controle as cepas de microorganismos cresceram normalmente não formando halo algum, e isso nos leva a crer que a concentração de 10% de DMSO não interferiu no presente resultado. Os estudos de Santos e colaboradores (2007) utilizando o método de difusão em meio sólido, confirmaram a ação antimicrobiana da fração hexânica da casca e dos extratos etanólicos bruto da raiz e da casca

da *V. guianensis* frente aos seguintes micro-organismos: *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Por tanto isso nos leva a crer que o uso destes solventes orgânicos extrairiam outros metabólitos e por tanto otimizariam o presente resultado. Ressalta-se ainda que foram realizados testes de sensibilidade com as folhas o que sugere pela literatura o uso da raiz, caule e frutos. Poucos estudos foram realizados até então para extratos contendo as folhas de *V. guianensis*, mas alguns metabólitos secundários já foram isolados: antraquinonas (GONZALES et al. 1980; POLITI et al. 2004) mistura de diantronas, vismiona A, triterpenos como o lupeol (SANTOS et al. 2007), β -amirina, e β -sitosterol (GONZALES et al. 1980), além de flavonóides, benzofenonas e xantonas (POLITI et al. 2004). Devido aos seus constituintes químicos tanto o seu potencial anti-cancerígeno quanto antimicrobiano vem sendo constantemente estudado e confirmado. A vismiona, um constituinte pertencente a essa espécie têm sido reportado como um antineoplásico, apresentando forte atividade contra certos tumores, como o carcinoma de ovário e melanocarcinoma B16 (CASSINELLI et al. 1986). As benzofenonas e as benzocumarinas apresentaram uma moderada citotoxicidade contra a linha celular KB (carcinoma epidermóide oral) (SEO et al. 2000).

Apesar dos resultados favoráveis a presente pesquisa mostrou algumas lacunas que devem ser contempladas para melhor entendimento da possibilidade de formulação de um produto final.

CONCLUSÃO

De modo geral os extratos avaliados mostraram-se eficientes frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris*.

- Ressalta-se ainda que a melhor atividade antimicrobiana foi atingida pelo extrato que usa a técnica de extração a frio frente aos micro-organismos *Escherichia coli*, isso em ambas as técnicas de extração.
- Nossos melhores resultados foram obtidos frente aos micro-organismos Gram-Negativos *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de microbiologia da UEA-MBT (Universidade do Estado do Amazonas – MBT- Mestrado em Biotecnologia), que cedeu as cepas bacteriológicas; A Universidade Federal do Amazonas - UFAM pela Identificação Botânica.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, J.M. **Plantas tóxicas no jardim e no campo**. Belem: Ministerio da Agricultura - FCAP Servicos de Documentacao e Informacao, 1980, 120p.
- ALMEIDA, E.R. **Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos**. Sao Paulo: Hemus, 1993. p.225-226.ÁLVAREZ, E.R. et al. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos espécies del género *Vismia* (Gutiferae). **VITAE, Revista de La Faculdade de Química Farmacêutica**, Universidad de Antioquia, Medellín, Colômbia, v. 15, n. 1, p. 165-172, 2008.
- ALVAREZ I, GÓMEZ-GESTEIRA M, de Castro M, Dias JM (2008a) Spatiotemporal evolution of upwelling regime along the western coast of the Iberian Peninsula. *J Geophys Res* 113: C07020 doi: 10.1029/2008JC004744
- CASSINELLI, G. et al. Cytotoxic and antitumor activity of vismiones isolated from *Vismieae*. **Journal of natural Products**, n. 49, p. 929-931, 1986.
- CHAN, T.C. et al. Selective inhibition of the growth of ras-transformed human bronchial epithelial cells by emodin, a protein-tyrosine kinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 193, p. 1152–1158, 1993.
- CUENDET M, HOSTETTMANN K, Potterat O & Dyatmiko (1997) Iridoidglucosides with free radical scavenging properties from *Fagraeablumei*. *Helv. Chim. Acta* 80: 1144 1152.
- Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA 2002. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: Editora UNESP, p.323-330.
- EUMKEB G., SAKDARAT S., SIRIWONG S. (2010) Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. *Phytomedicine. Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 29: 345-8.

FLUHR J. W., DEGITZ K. (2010) Antibiotics, azelaic acid and benzoyl peroxide in topical acne therapy. *J DtschDermatolGes.* 1:24-30.

GONZALES, J.G. et al. Chemistry of the genus *Vismia*. Part VII. Vismione A from the leaves of *Vismia guianensis*. **Planta Médica**, v. 40, p. 347-350, 1980. GROSSE, B.K., KUMAR, R.; PHILIP, A, Modified Transdermal Technologies: Breaking the Barriers of Drug Permeation via the Skin. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 633-644, mar. 2007.

MONACHE, F.D.; TORRES, F.F.; MARINI-BETTOLO, G.B.; LIMA, R.A. Chemistry of *Vismia* genus. Note V: g-hidroxi and g,g-dihidroxi-ferruginina A. **J. Nat. Prod.**, v.43,n.4, p.487-494, 1980.

Pinheiro, F.; Ribeiro, J.F. 2001. **Síndromes de Dispersão em Matas de Galeria do Distrito Federal**. In: Cerrado: **caracterização e recuperação de matas de galeria**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. p. 315-328.

PASQUA, G. et al. Accumulation of vismione A in regenerated plants of *Vismia guianensis* D.C. **Protoplasma**, 189, n. 1-2, p. 9-16, 1995.

POLITI, M. et al. HPLC-UV/PAD and HPLC-MS Analyses of leaf and root extracts of *Vismia guianensis* and isolation and identification of two new bianthrone. **Phytochemical Analysis**, V.15, p. 355-364, 2004.

SANTOS, A.L.; et al. Ensaio microbiológico dos extratos e frações da *Vismia guianensis*. *Clusiaceae*. (Aubl.) Pers. In: 30º Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Águas de Lindóia - SP. **Anais** Livro de resumos do 30º RASBQ, v. único. Águas de Lindóia - SP : SBQ, 2007.

SEO, E.K. et al. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 35-42, 2000.

SUFFREDINI, I.B. et al. In *vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia**, v. 78. p. 223-226, 2007.

SMÂNIA, E. **Esteróis e Triterpenos Isolados da Espécie de *Ganoderma karstense* sua Atividade Antimicrobiana**. 112p. 2003. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SRINIVAS, G. et al. Emodin induces apoptosis of human cervical cancer cells through poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and activation of caspase-9. **European Journal of Pharmacology**, v. 472, p. 117-125, 2003.