

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Eugenia dysenterica* DC (MYRTACEAE)

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ETHANOL EXTRACT OF *Eugenia dysenterica* DC (MYRTACEAE)

GONÇALVES, Thaís Paula Rodrigues^{1*}; LIMA, William Gustavo¹; SILVA, Izabela Caputo Assis¹. PARREIRA, Adriano Guimarães²; LIMA, Luciana Alves Rodrigues dos Santos¹.

¹ Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Centro Oeste Dona Lindu,

² Universidade do Estado de Minas Gerais.

* Autor correspondente

e-mail: thaispaula.rgs@outlook.com

Received 06 February 2019; received in revised form 18 May 2019; accepted 19 May 2019

RESUMO

A grande variedade de espécimes vegetais encontradas no Brasil com potencial medicinal ainda inexplorado, associado ao aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos tradicionalmente empregados, abre um importante campo de pesquisa voltado à prospecção de novos fármacos. Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano de *Eugenia dysenterica* e caracterizar seu perfil fitoquímico. Foram obtidos extratos etanólicos através de secagem, trituração, turbo-extração e liofilização das folhas do vegetal. Os testes CIM e CBM foram realizados para avaliação do potencial antimicrobiano sobre as seguintes cepas: *Proteus mirabilis* ATCC 15290, *Echerichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. *E. dysenterica* apresentou ação bactericida a 2mg.ml⁻¹ frente a *S. aureus* e bacteriostática a 1mg.ml⁻¹ frente a *P. mirabilis*. Na triagem fitoquímica foram detectados diversos compostos fenólicos, e a presença destes podem justificar o potencial biológico desse vegetal.

Palavras-chave: Vegetais, medicinal, resistência, fitoquímica.

ABSTRACT

The large variety of plant specimens found in Brazil with still unexplored medicinal potential, combined with the increase in bacterial resistance to antimicrobials traditionally employed, opens an important field of research aimed at prospecting new drugs. In this context the objective of this work was to evaluate the antibacterial potential of *Eugenia dysenterica* and to characterize its phytochemical profile. Ethanolic extracts were obtained by drying, grinding, turbo-extraction and lyophilization of the leaves of the plant. The CIM and CBM tests were performed to evaluate the antimicrobial potential on the following strains: *Proteus mirabilis* ATCC 15290, *Echerichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. *E. dysenterica* presented bactericidal action at 2mg.ml⁻¹ against *S. aureus* and bacteriostatic at 1mg.ml⁻¹ against *P. mirabilis*. Several phenolic compounds were detected in the phytochemical screening, and the presence of these compounds may justify the biological potential of this plant.

Keywords: Vegetables, medicinal, resistance, phytochemistry.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o posto de principal nação entre os países detentores de maior biodiversidade do planeta, destacando-se pela enorme riqueza de flora e fauna, especialmente no Bioma Cerrado. Borges e Felfili (2003) afirmam que a flora do Cerrado aponta ampla diversidade de plantas, sendo que grande parte destas espécies são úteis ao homem, por serem alimentícias, ornamentais, medicinais, produtoras de madeira, cortiça, fibras, óleo, tanino e material para artesanato.

No Brasil a espécie *Eugenia dysenterica* recebe o nome popular de 'cagaita', e pertence à família Myrtaceae, constituindo uma das mais importantes famílias de Angiospermas, é conhecida por sua elevada riqueza de espécies e por seu importante papel na fitossociologia das florestas do Sul e Sudeste do Brasil (CRUZ & KAPLAN 2004). A planta é encontrada no Cerrado Brasileiro e as folhas são parte de preparações usadas para tratamentos medicinais tradicionais contra estados diarréicos e disenteria. A família Myrtaceae apresenta grande potencial econômico, muitas de suas espécies são utilizadas na alimentação, como por exemplo a *Eugenia uniflora* L. "pitanga", (LORENZI et al., 2006); na ornamentação destaca-se a espécie *Eugenia sprengelii* DC (LORENZI et al. 2001), e como medicinais destaca-se o *Eucalyptus globulus* L., o "eucalipto", empregado no tratamento da gripe, congestão nasal e sinusite, e ainda foram relatadas atividades antimicrobianas para óleos essenciais e extratos de outras espécies do gênero *Eugenia*, incluindo cepas dermatófitas isolado de pacientes com dermatofitoses (LIMA et al., 1993).

O fruto de *E. dysenterica* é considerado uma boa fonte de polifenóis, principalmente flavonóides (GENOVESE, et al. 2008). Diferentes atividades foram associadas à presença de polifenólicos compostos em alimentos, como antioxidantes (ZHANG et al., 2017), e antimicrobianos (KOLODZIEJCZYK et al. 2013). Assim, a presença de compostos fenólicos em *E. dysenterica* pode ter potencial terapêutico, visto que estes metabólitos são os principais responsáveis pelas ações farmacológicas dos vegetais (GRACE et al., 2014; SELCUK & ERKAN, 2015). Apesar da grande importância na medicina tradicional da espécie *E. dysenterica*, estudos que comprovem a eficácia da mesma são escassos, principalmente pesquisas relativas à atividade antifúngica e antibacteriana.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 80% da humanidade não têm acesso ao atendimento primário de saúde, por estarem muito distantes de unidades de atenção básica ou por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos prescritos. Para essa população, as terapias alternativas são as principais formas de tratamento, e as plantas medicinais, os principais medicamentos (MENDONÇA-FILHO & MENEZES, 2003).

O aparecimento de resistência a drogas antimicrobianas é um dos grandes problemas mundiais de saúde pública e se refere a aqueles microrganismos cujo crescimento e multiplicação não se inibem pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou aqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado ao qual não havia uma adequada resposta clínica quando usado como tratamento (VIEIRA et al., 2017). Os antimicrobianos atuam como agentes seletivos, podendo ser bactericidas (matam os microrganismos) ou bacteriostáticas (impedem o crescimento) (GOLL & FARIA, 2014).

A Europa e América do Norte já descreviam, na década de 90, cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* não susceptível à penicilina (PNSSP), enterococos resistentes à vancomicina (VRE), entre outros (CASADEVALL, 1996). De acordo com Lullmann et al. (2008), certos patógenos desenvolvem mecanismos de resistência associados ao aumento da virulência, o que contribui para elevação dos índices de infecções humanas por microrganismos multirresistentes influenciando em um maior número das hospitalizações e contágios por bactérias. (SANTOS & NITRINI, 2004).

A descoberta de novos extratos vegetais com ação antimicrobiana merecem destaque neste contexto. Rotineiramente, desenvolvem-se inúmeros estudos em diferentes países com vistas a avaliar e comprovar a eficácia antimicrobiana, dentre outros efeitos medicinais, dos mais variados extratos vegetais (SILVA, 2010; AL-ASMARI, 2016; GANDHI, 2016). Fitoquimicamente, além do metabolismo primário que garante a produção dos nutrientes básicos à sobrevivência, as plantas apresentam também o chamado metabolismo secundário. Enquanto no metabolismo primário as plantas realizam a síntese de compostos como açúcares, aminoácidos e nucleotídeos, como elementos fundamentais de seu metabolismo, alguns

vegetais possuem habilidade de produzirem metabólitos secundários; substâncias que servem como mecanismos de defesa contra predação por microrganismos, insetos ou herbívoros, reprodução e dispersão de sementes (SIMÕES, *et al.* 2017). Assim muitos caracterizam por diferentes usos e aplicações farmacêuticas.

O uso de extratos vegetais com propriedades antimicrobianas pode ser de grande importância em tratamentos medicinais, sendo que essa atividade normalmente ocorre por combinações sintetizadas no metabolismo secundário da planta, principalmente pela produção de flavonoides, terpenos, saponinas e alcaloides (BONAA, *et al.* 2013). Geralmente os compostos naturais com ação antimicrobiana atuam na desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula. Mas nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios ser afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

Neste contexto o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano do extrato etanólico das folhas de *Eugenia dysenterica* bem como a determinação fitoquímica da amostra obtida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e extração

Espécimes de *E. dysenterica* (figura 1) foram coletados na cidade de Divinópolis-MG no bairro Belvedere entre as coordenadas: 20°10'19.088"S 44°53'41.73"W. Após as coletas, as espécies foram identificadas e seus exemplares depositados no herbário da empresa de Pesquisa e Agropecuária de Minas Gerais (PAMG 56415).

Os extratos etanólicos das folhas do vegetal, foram obtidos a partir de secagem em estufa a 50°C por 7 dias, trituração das folhas coletadas em moinho mecânico de facas, diluição em álcool 70° e turbo-extração nas proporções de 9:1 (solvente: planta). Depois a amostra obtida foi filtrada e liofilizada para secagem total do solvente obtendo como produto final um pó fino da droga vegetal.



Figura 1. (1) Árvore de *E. dysenterica* localizada na região de Divinópolis-MG; (2) Folhas.

2.2. Teste de Concentração Inibitória Mínima

Foram determinadas a CIM (concentração inibitória mínima) e CBM (concentração bactericida mínima) empregando-se os métodos descritos em CLSI (2012). As amostras secas foram dissolvidas em água e DMSO 10% agitadas em vórtex, sendo utilizados 20µL da solução obtida para os testes antibiogramas. A padronização dos inóculos foi determinada pela turvação do tubo a 0,5 da escala de McFarland, pela diluição em Solução Salina a 0,9%, obtendo-se um valor entre 5×10^5 UFC/mL e 5×10^4 UF/microrganismos. (CLSI, 2012). Em seguida, a CIM foi realizada em microplacas de 96 poços através de uma série de micro diluições em caldo Mueller Hinton (MH) da droga vegetal, obtendo-se concentrações decrescentes em $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,062; 0,031; 0,015 e 0,007 frente a 100 µL do padrão inoculado, e por final as placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24h.

Para o teste de Concentração Bactericida Mínima, um total de 10µL dos poços sem crescimento no ensaio CIM, foram aliqüotados e transferidos para uma placa contendo meio ágar MH. O material foi semeado pela técnica de spread-plate e, em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24h para posterior leitura dos resultados.

2.2. Triagem Fitoquímica

O extrato foi submetido à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários por meio de reações químicas que resultam no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias (tabela 1). Realizada seguindo os métodos

colorimétricos descritos por Goyal *et al.*, (2010) para a observação de taninos, saponinas, flavonoides, antraquinonas e alcaloides.

Tabela 1. Triagem fitoquímica

Metabólito Secundário	Reagentes	Característica Positiva
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Coloração amarela, marrom ou laranja.
Saponinas	Água Destilada	Espuma persistente
Taninos	FeCl ₃	Coloração azul ou verde
Alcaloides	Solução Dragendorff	Precipitado ou turvação
Cumarinas e Antraquinonas	NaOH	Coloração amarela ou violeta
Esteroides e Terpenoides	H ₂ SO ₄ + Anidrido Acético	Coloração azul (fase superior) ou halo interfásico vermelho, violeta ou rosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Extratos foliares de *E. dysenterica* apresentaram ação bactericida a 2 mg.ml⁻¹ nos testes quantitativos CIM/CBM frente a *S. aureus* e *P. mirabilis*, e ação bacteriostática a 1 mg.ml⁻¹ frente a *P. mirabilis* (tabela 2). Não foram encontradas atividades antimicrobianas do extrato frente a *S. epidermidis* e *E. coli* nas concentrações testadas. Na triagem fitoquímica foram detectados diversos compostos do metabolismo secundário da planta, principalmente compostos fenólicos, sendo representado na tabela 3.

A presença de flavonoides, saponinas e alcaloides podem justificar o potencial antimicrobiano encontrado neste estudo, já que estes compostos apresentam diversas ações terapêuticas comprovadas entre, antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas e anticancerígenas (REDDY *et al.* 2003; MUTOH *et*

al. 2000; MACHADO *et al.* 2008).

Couto *et al.* (2009) na caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica*, notaram alto teor de taninos e flavonoides observados, uma vez que estes totalizaram cerca de 53,7 e 3,45%, respectivamente, dos compostos fenólicos totais encontrados. Dados que corroboram na quantificação deste estudo reafirmando o alto percentual presente dos compostos aqui encontrados.

No trabalho de Gonçalves (2007), as cepas de *Escherichia coli* apresentaram-se resistentes a ampicilina (10g) e cefalotina (30g), no entanto ao submetê-lo ao extrato hidroalcolico de *Eugenia uniflora* estes microrganismos mostraram-se sensíveis em teste de disco-difusão com halos de inibição de 14mm, demonstrando o potencial antimicrobiano deste extrato pertencente à família Myrtaceae, que assim como *E. dysenterica* podem servir como protótipos na antibioterapia.

Tabela 2. Resultado das atividades antibacterianas de *E. dysenterica* analisadas pelos testes CIM/CBM expresso em mg.mL⁻¹.

Microrganismos	CIM/CBM	mg.mL ⁻¹
	<i>E. dysenterica</i>	Amoxicilina
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	-	0,5
<i>P. mirabilis</i> ATCC15290	1 (2)	0,007
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	0,06
<i>S. aureus</i> ATCC29213	2 (2)	0,01

Tabela 3. Resultado da triagem fitoquímica de extratos etanólicos de *Eugenia dysenterica*.

Classes de Compostos	Extrato Etanólico
Flavonoides	+
Saponinas	+
Taninos condensados	+
Taninos Hidrolisáveis	-
Alcaloides	+

Cumarinas	-
Antraquinonas	-
Esteroides	+
Terpenoides	-

4. CONCLUSÕES

Foi possível confirmar com este trabalho o potencial antimicrobiano de extratos foliares etanólicos de *E. dysenterica* frente a duas cepas bacterianas de interesse clínico, sendo *S. aureus* e *P. mirabilis*. Nota-se a importância de aprofundar os estudos com os extratos de plantas do Cerrado, sobretudo visando o isolamento de substâncias com potencial antimicrobiano em um contexto de resistência microbiana crescente frente aos fármacos tradicionalmente empregados.

5. REFERÊNCIAS

- Borges, F. H. C., Felfili, J. M. *Rev. Árvore*, **2003**, 27, 735-745.
- Cruz, A.V.M., Kaplan, M.A.C. *Floresta e Ambiente*, **2004**, 11, 47-52.
- Lorenzi, H., Bacher, L., Lacerda, M., Sartori, S. *Instituto Plantarum: Nova Odessa*, **2006**.
- Lorenzi, H., Souza, H. M. *Instituto Plantarum: Nova Odessa*, **2001**.
- Lima, E.O., Gompertz, O.F., Giesbrecht, A.M., Paulo M.Q. *Mycoses* **1993**,36, 333-336.
- Genovese, M., Pinto, M. D. S., Gonçalves, A. D. S. S., Lajolo, F. *Food Sci. Technol. Int.*, **2008**,14, 207–214.
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R.; Tsao, R. *Food Chemistry*, **2017**, 172, 862–872.
- Kołodziejczyk, K., Sójka, M., Abadias, M., Vinas, I., Guyot, S., Baron, A. *Ind. Crops Prod.*,**2013**, 51, 279–288.
- Grace, M. H., Yousef, G. G., Gustafson, S. J., Truong, V. D., Yencho, G. C., Lila, M. A. *Food Chem*, **2014**,145,717–724.
- Selcuk, N., Erkan, M. *Postharvest Biol. Tec.*, **2015**, 99, 9–19.
- Mendonça-Filho, R.F.W., Menezes F.S. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **2003**,13, 55-58.
- Vieira, P. N.; Vieira, S. L. V. *Arq. Cienc. Saúde*, UNIPAR, Umuarama, **2017**, 21, 209-212.
- Goll, A.S., Faria, M.G.I. *BJSCR.*, **2014**, 5, 69-72.
- Casadevall A. *Emerg. Infect. Dis*, **1996**, 2, 200-208.
- Lullmann, H., Mohr K., Hein L. *Farmacologia: Atlas e Texto*. **2008**, 5ed.
- Santos, V., Nltrini, S. M. O. O. *Rev. Saúde Pública*, **2004**, 38, 819-826.
- Silva, N.C.C. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, **2010**.
- Al-asmari, A., Manthiri, R.A., Abdo, N., Al-duaiji, F.A., Khan H.A. *Saudi J Biol Sci.*, **2017**, 24, 1204-1211.
- Gandhi, G.R., Barreto, P.G., Lima, B.D., Quintan, J.S., Araújo, A.A., Narain, N., Quintans-Júnior; L.J., Gurgel, R.Q. *Phytomedicine*, **2016**, 15, 1830-1842.
- Simões, O.M.C., Schenkel, P.E., Mello, P.C.J., Mentz, A.L., Petrovick, R.P. *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*.1ed. Porto Alegre: Artmed, **2017**, 486p.
- Bonaa, E.A.M., Pinto, F.G.S., Borgesa, A.M.C., Scurec, M.C., Fruet, T.K., Weberc, L.D., Alvesd, L. F.A., Mouraef, A.C. *Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, **2013**, 15, 41-46.
- Burt, S. *Int J Food Microbiol*, **2004**, 94,223–253.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 22. ed. Informational Supplement. CLSI document M100-S22. **2012**.Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Goyal, A. K., Middha, S. K., Sen, A. J. *Nat. Pharm.*, **2010**, 1, 40-45.

25. Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K. D. *Pharmacol. Ther.*, **2003**, 99, 1-13.
26. Mutoh, M., Takahashi, M., Fukuda, K. *J. Cancer Res.*, **2000**, 91, 686-91.
27. Machado, H., Nagem, T. J., Peters, V. M., Fonseca, C. S., Oliveira, T. T. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, Juiz de Fora, **2008**, 27, 33-39.
28. Couto, R.O., Valgas, A.B., Bara, M.T. F., José, R.P. *Rev. Eletronica Farm.*, **2009**, 6, 59-69.
29. Gonçalves, A. L. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, **2007**.