

Atividade moduladora de extratos etanólico das folhas de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Clusiaceae) sobre drogas antimicrobianas

Actividad moduladora de extractos de las hojas de *Clusia nemorosa* G. Mey (clusiaceae) sobre drogas antimicrobianas

Modulatory activity of ethanolic extracts of the leaves of *Clusia nemorosa* G. Mey (Clusiaceae) on antimicrobial drugs

Alison Honorio de Oliveira, Amanda Oliveira Andrade, Lilian Cortez Sombra Vandesmet, Maria Arlene Pessoa da Silva, Henrique Douglas Melo Coutinho, Marcos Aurélio Figueiredos dos Santos

Faculdade de Ciência Aplicadas Doutor Leão Sampaio. Juazeiro do Norte, Brasil.

RESUMO

Introdução: o rápido desenvolvimento de resistência às drogas e a desaceleração no desenvolvimento de novas drogas ativas, chamaram a atenção para o tratamento com combinação de drogas.

Objetivos: analisar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) frente a cepas padrões e multirresistentes bem como a ação moduladora com aminoglicosídeos amicacina, neomicina e gentamicina.

Métodos: o material vegetal (folhas), coletado na Chapada do Araripe, foi triturado e submerso em solvente etanol 96 % e submetido à destilação do solvente no aparelho evaporador rotativo para a produção do extrato etanólico bruto. Um ensaio de microdiluição foi realizado para verificar a atividade antibacteriana e as possíveis interações dos aminoglicosídeos associados às amostras estudadas, utilizando uma concentração sub-inibitória de 128 µg/mL (concentração inibitória mínima/8).

Resultados: a ação do extrato isolado frente às cepas padrões teve uma concentração inibitória mínima > 1024 µg/mL, a ação dos antibióticos foi modulada sinergicamente pelo extrato contra as bactérias multirresistentes Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusões: o extrato das folhas de *C. nemorosa* atuou como um agente modulador da atividade antimicrobiana. É sugerido que o extrato de *Clusia nemorosa* pode ser utilizado como uma fonte de produtos naturais na terapêutica antimicrobiana e no combate a multirresistência bacteriana.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana; *Cluisa nomerosa*; modulação de antibióticos.

RESUMEN

Introducción: el rápido desarrollo de resistencia de las drogas y la relentización en el desarrollo de nuevas drogas activas llaman la atención al tratamiento de combinación de drogas.

Objetivos: analizar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) frente a cepas multirresistentes y normas, así como la acción modulante con aminoglucósido amikacina, gentamicina y la neomicina.

Métodos: el material vegetal (hojas), colectado en el Araripe, fue triturado y sumergido en etanol 96 % como solvente. De inmediato, fue sometido a destilación del solvente en un evaporador rotativo para la producción de lo extrato etanólico bruto. Se llevó a cabo un ensayo de microdilución para verificar la actividad antibacteriana y las posibles interacciones de aminoglucósidos asociados con las muestras estudiadas, se utilizó una concentración sub-inhibitoria de 128 µg/mL (Concentración mínima inhibitoria/8).

Resultados: la actividad del extracto frente a las cepas aisladas patrones tenía una Concentración mínima inhibitoria > 1024mg/mL; la acción de los antibióticos fue modulada por el extracto de forma sinérgica contra multirresistente Gram-positivo *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram-negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El sinergismo del extracto de etanol se verificó mediante el método de microdilución.

Conclusiones: el extracto de las hojas de *C. nemorosa* actuaron como un agente modulador. Se sugiere que el extracto de *C. nemorosa* puede ser utilizado como una fuente de productos naturales en la terapia antimicrobiana y en el combate de la resistencia a múltiples fármacos bacterianos.

Palabras clave: actividad antimicrobiana; *Cluisa nemorosa*; modulación de antibióticos.

ABSTRACT

Introduction: the fast development of drug resistance and the slowdown of the development of new active drugs, drew attention to the treatment with the drug combination.

Objective: to analyze the antimicrobial activity of the ethanol extract of *Cluisa nemorosa* (Clusiaceae) against multiresistant strains and standards as well as the modulating action with aminoglycoside amikacin, gentamicin and neomycin.

Methods: the plant material (leaves) was collected in Araripe, crushed and put into ethanol 96 % as solvent. Distillation of the solvent was then performed in a rotary evaporator to produce the gross ethanol extrato. A microdilution assay was conducted to verify antibacterial activity and the possible interactions of aminoglycosides associated with the study samples. A sub-inhibitory concentration of 128 µg/mL (Minimum Inhibitory concentration/8) was used.

Results: the activity of the extract against the strains isolated patterns had an

Minimum Inhibitory concentration > 1024 mg/mL, the action of antibiotics was modulated synergistically by the extract against multidrug-resistant Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusions: the synergism of the ethanol extract was verified by microdilution method. Therefore, it is suggested that the extract of *Clusia nemorosa* be used as a source of natural products for antimicrobial therapy and to combat bacterial multidrug resistance.

Key words: antimicrobial activity; *Clusia nemorosa*; modulation of antibiotics.

INTRODUÇÃO

O uso excessivo e inadequado de antibióticos tem contribuído para o aumento da resistência microbiana. Embora o desenvolvimento da resistência seja um fenômeno espontâneo, as drogas atuam como agentes seletivos de amostras resistentes. Desse modo vão surgindo microrganismos resistentes a vários fármacos.¹

Esse uso indiscriminado de antibiótico e antifúngico resultou no desenvolvimento de drogas de amplo espectro de ação. O rápido desenvolvimento de resistência às drogas e a desaceleração no desenvolvimento de novas drogas ativas, chamaram a atenção para o tratamento com combinação de drogas.²

Estudos sobre a atividade antibacteriana de extratos vegetais e fitofármacos, avaliada frente a microrganismos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais, são bastante relevantes, permitindo concluir que a intensificação de pesquisas envolvendo sobre o uso terapêutico das plantas devem ser intensificados.³

A natureza produz a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. E os elementos do reino vegetal produzem metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos.⁴

Os flavonóides é uma classe de compostos fenólicos presente nas plantas, exercem a proteção contra raios ultravioleta, proteção contra insetos, vírus e bactérias, atração de polinizadores, ação antioxidante, agentes alelopáticos e inibição de enzimas algumas classes de metabólitos secundários foram descritas para este gênero, no presente estudo, incluindo os flavonóides.⁵

O Gênero *Clusia* que ocorre do sudeste da Florida ao sul do Brasil e é um grande gênero da família Clusiaceae.⁶ Este gênero abranger aproximadamente 300 espécies de ocorrência neotropical e subtropical. Suffredini avaliou a concentração inibitória mínima de espécies brasileiras, dentre elas, encontra-se uma das Clusiaceae gênero, de nome *Clusia columnares*, a qual inibiu o crescimento de bactérias Gram-negativa.⁷

Diante destas possibilidades este trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *Clusia nemorosa* G. Mey. (Gameleira) frente à bactéria e

fungos padrões e multirresistentes, e também a realização de uma prospecção das principais classes de metabólitos secundários.

MÉTODOS

Coleta do material botânico

As folhas de *Cluisa nomerosa* foram coletadas em uma área de Mata Úmida localizadas na Floresta Nacional do Araripe a 7°15'23,5"S e 39°29'30,8" W numa altitude de 963 m, no período da manhã. Foi coletado aproximadamente 1 kg de folhas de indivíduos adultos. Após a coleta o material botânico foi acondicionado em sacos plásticos com capacidade para 50 L, que imediatamente foram vedados para evitar a perda de umidade das folhas. A amostra foi identificada através de fichas próprias contendo nome popular, local e data, nome do coletor, coordenadas geográficas. O material foi conduzido ao Laboratório de Botânica Aplicada LBA da Universidade Regional do Cariri, para posterior utilização. A espécie foi identificada no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil e a exsiccata da mesma foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da URCA, sob número de registro 6930 (*C. nemerosa*).

Obtenção do Extrato Etanólico Bruto de *Cluisa nomerosa*

Para preparação do extrato etanólico bruto (EEB) foram trituradas com 500 g de folhas frescas de *Cluisa nomerosa*. Após a trituração o material foi submerso em 2L de etanol (P.A. 99,3 %) e submetido à agitação periódica. Após sete dias, o material foi filtrado, sendo o solvente evaporado em evaporador rotativo a vácuo (modelo Q-214M2 – Quimis, Brasil) e concentrado em banho Maria.

Prospecções dos Metabólitos Secundários

Os testes fitoquímicos foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN), da Universidade Regional do Cariri (URCA). Para a identificação das classes de metabólitos secundários seguiu-se a metodologia descrita por *Matos* (2009). Sendo observada a mudança de cor ou formação de precipitados após a adição de reagentes específicos.

Concentração Inibitória Mínima

O Extrato Etanólico de *C. nemerosa* (EECN) foi solubilizado inicialmente em DMSO (Merck, Darmstadt, Alemanha) e dissolvido em água estérea de forma a obter-se uma solução estoque de 1024 µg/mL. Foram diluídos separadamente 100 µL dos inóculos, previamente incubados a 37 °C durante 24 h, em *Brain Heart Infusion Broth* (BHI, Difco Laboratories Ltda.) a 10 %, para obter uma concentração final foi de 5×10^5 UFC/mL. Em seguida 100µL destes foram então distribuídos nos 96 poços de placas de microdiluição individuais para cada colônia, no sentido numérico, acrescido de 100 µL da solução estoque do EECN, no primeiro poço, e em seguida realizando diluições seriadas até o penúltimo poço, obtendo-se concentrações finais dos extratos de 8 à 512µg/mL. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C, durante 24h.⁸ A CIM é definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento microbiano for observado. A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) bacteriana foi visualizada com o auxílio do reagente resazurina sódica (Sigma) um indicador

colorimétrico de óxido-redução.⁹ E as cepas fungicas através da visualização da ausência ou presença de turvação.^{10,11}

Modulação de Drogas

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em BHI a 10 %, pelo método de microdiluição, usando uma suspensão de 10^5 UFC/mL, foi utilizado um inóculo de 100µL e uma quantidade de 100µL do extrato, sendo esta diluída de maneira seriada variando de 1024 µg/mL a 2 µg/mL.¹⁰ A CIM é definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento microbiano for observado. O teste de concentração inibitória mínima foi realizado utilizando as bactérias padrões e a modulação com as bactérias multirresistentes, os mesmos fungos foram utilizados no CIM e na modulação. Para a avaliação dos extratos como modificadores da resistência microbiana, a (CIM) dos antibióticos e antifúngicos foi determinado na presença e na ausência do produto, o qual estava em concentração sub-inibitória (CIM/8 = 1024 µg/mL/8 que é igual a 124 µg/mL). As concentrações adicionadas das drogas antimicrobianas usadas nestes ensaios variaram de 1024 µg/mL a 0,5 µg/mL, para os antifúngicos e extratos, já nos antibióticos a concentração utilizada variou de 5000 µg/mL a 2,5 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C.

RESULTADOS

Os ensaios antibacterianos e antifúngicos do extrato etanólico de *C. nemorosa* (EECN) em nossa pesquisa não demonstraram resultados clinicamente relevantes, como recomendado por Houghton,¹² com CIM \geq 1024 mg/mL. Entretanto, como mostra a tabela 1 a ação do EECN, frente as bactérias multirresistentes, *E. coli* 27 e *S. aureus* 358 modulou sinergicamente a ação da amicacina, neomicina, e gentamicina o mesmo também modulou a bactéria *P. aeruginosa* 03 com amicacina e gentamicina.

Tabela 1. Extrato etanólico das folhas de *C. nemorosa* (µg/mL) modulando a atividade antibacteriana de aminoglicosídeos

Modulação de Antibióticos por EECN						
	<i>E. coli</i> 27		<i>S. aureus</i> 358		<i>P. aeruginosa</i> 03	
Extrato/Antibiótico	CIM Ant.	EECN + Ant	CIM Ant.	EECN + Ant	CIM Ant.	EECN + Ant
EEFG/ Amicacina	19,53	4,88	39,06	9,76	156,25	39,06
EEFG/ Nomicina	156,25	39,06	156,25	39,06	1250	625
EEFG/ Gentamicina	9,76	2,44	312,5	19,53	39,06	9,76
Produto natural isolado (<i>C. nemorosa</i>) CIM \geq 1024 µg/ mL						

Ant.: Antibiótico; EECN: Extrato etanólico de *C. nemorosa*; CIM: Concentração Inibitória Mínima.

A prospecção fitoquímica mostrou que o principal grupo de metabólitos presente no extrato etanólico de *C. nemorosa* são os compostos fenólicos e especificamente os flavonóides, onde podemos encontrar flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis e flavononas. Compostos estes com atividade microbiológica comprovada, tabela 2.

Tabela 2. Caracterização fitoquímica do extrato etanólico de *C. nemorosa* (EECN)

Classes de metabólitos	Presença ou ausência
Alcalóides	-
Antocianidinas	-
Antocianinas	-
Auronas	-
Catequinas	-
Chalconas	-
Fenóis	+
Flavonas	+
Flavonóis	+
Flavononas	+
Flavononóis	+
Leucoantocianidinas	-
Taninos Flobabênicos	-
Taninos Pirogálicos	-
Xantonas	+

+ presença.
- ausência.

DISCURSÃO

Pesquisadores avaliando a atividade de compostos isolados e também de extratos polares provindos de *Clusia burllemarxii*,¹³ verificaram que houve atividade contra Gram-positivas dentre elas *S. aureus*, onde o extrato etanólico das folhas inibiu o crescimento microbiano com a uma CIM de 62,5 µg/mL embora não tenha observado atividade em Gram-negativas. Os resultados dos referidos autores corroboram com os obtidos em nossa pesquisa. Do mesmo modo,⁷ outros pesquisadores estudando os extratos etanólicos de *C. columnaris* frente a Cepas bacterianas encontrou uma CIM para a Gram-negativa *P. aeruginosa*, igual a 180µg/ml, mostrando similaridade com nossos resultados.

Os compostos fenólicos naturais têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*.¹⁴ Os flavonóides são sintetizados por plantas em resposta à infecção microbiana,¹⁵ e são eficazes contra uma ampla variedade de microrganismos. Tal atividade provavelmente se deve à sua capacidade de formar complexos com proteínas solúveis que se ligam à parede celular bacteriana. Alguns flavonóides lipofílicos podem também causar ruptura da membrana plasmática de microrganismos.¹⁶

O uso popular de espécies de *Clusia* está relacionado à presença de látex e resinas, sendo popularmente utilizados como febrífugas, anti-reumáticas, purgativas e para problemas estomacais.¹⁷ Muitas espécies desse gênero apresentam látex contendo terpenóides, benzofenonas, flavonóides e outros compostos fenólicos.^{18,19} Além disso, elementos da família Clusiaceae, possuem também outras propriedades farmacológicas como ação antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica e citotóxica.¹⁹

Os resultados nos permitem concluir que os dados obtidos no presente trabalho são pioneiros e promissores e poderão incentivar futuras pesquisas sobre os aspectos fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos de produtos naturais isolados de *C. nemorosa*, a fim de apoiar a sua possível utilização racional na terapêutica antimicrobiana e no combate à multirresistência bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Freitas AG, Farias ET, Lima MCA, Sousa IA, Ximenes, EA. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L. In: Revista Brasileira de Farmacognosia. 2002;12:64-5.
2. Keith CT, Borisy AA, Stockwell BR. Multicomponent therapeutics for networked systems. *Nat Rev Drug Discovery*. 2005;4:71-8.
3. Nascimento GGF, Lcatelli J, Freitas PC, Silva GLS. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Rio de Janeiro: Braz. J. Microbiol*. 2000;31(4):247-56.
4. Phillipson JD, Anderson LA. Ethnopharmacology and western medicine. *Journal Ethnopharmacology*. 1989;25:61-72.
5. Zuanazzi JAS, Montanha JA. Flavonóides. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS; 2004. p. 577-614.
6. Stevens PF. Clusiaceae-Guttiferae. In: K. Kubitzki, (ed.). *The families and genera of vascular plants*. Berlin: Springer. 2007;9:48-66.
7. Suffredini IB, Paciencia MLB, Nepomuceno DC, Younes RN, Varella AD. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts -Clusiaceae. *Rio de Janeiro: Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(3):287-90.
8. Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem*. 1996;39:3107-13.
9. Salvat A, Antonnacci L, Fortunato RH, Suarez EY. Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*. 2001;32(5):293-7.
10. CLSI. National committee for clinical laboratory standards. Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test, 8th ed. Atlanta, USA: CLSI; 2003. p. 2-8.
11. Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*. 2000;11:137-47.

12. Houghton PJ, Howes MJ, LEE CC, Steventon G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: Visualising an elephant. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:391–400.
13. Ribeiro PR, Ferraz CG, Guedes ML, Martins D, Cruz FG. A new biphenyl and antimicrobial activity of extracts and compounds from *Clusia burllemarxii*. *Fitoterapia.* 2011;82:1237-40.
14. Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J Nat Prod.* 1996;59:205-15.
15. Dixon RA, Dey PM, Lamb CJ. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology.* 1983;55:1–69.
16. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, et al. Comparative study on the antibacterial Activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology.* 1996;50:27–34.
17. Carmo RM, Franceschilene EV. Polinização e biologia floral de *Clusia arrudae* Planchon & Triana (Clusiaceae) na Serra da Calçada, município de Brumadinho, MG. *Revista Brasileira de Botânica.* 2002;25:505-13.
18. Lokvan J, Braddock JF, Reichardt RB, Clausen TP. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Phytochemistry.* 2000;55:29-34.
19. Pinheiro L, Cortez DAG, Vidotti GJ, Young MCM, Ferreira AG. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida da *Kielmeyera variabilis* Mart (Clusiaceae). *Química Nova.* 2003;26:157-60.

Recibido:8 de noviembre de 2014.

Aprobado: 20 de agosto de 2015.

Alison Honorio de Oliveira. Faculdade de Ciência Aplicadas Doutor Leão Sampaio.
Juazeiro do Norte, Brasil.
Correo electrónico: alisonhonorio@leaosampaio.edu.br