ATIVIDADE DE EXTRATOS DE *TABERNAEMONTANA CATHARINENSIS* NO CONTROLE DE BIOFILMES BACTERIANOS

Lorena Miná Rodrigues (PROVIC), Profa. Dra. Mariza Boscacci Marques (Pesquisador)[1], Prof. Dr. Luis Antonio Esmerino (Orientador)[2], e-mail: esmerino@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa / Departamentos de Química[1] e Análises Clínicas[2]

Área do conhecimento 4.03.00.00-5 Farmácia e subárea do conhecimento 2.12.00.00-9 Microbiologia.

Palavras-chave: *Tabernaemontana catharinensis*, atividade antimicrobiana, atividade antibiofilme.

Resumo

Apesar da disponibilização de novos antibióticos, a resistência microbiana ocorre em ritmo crescente nos diferentes patógenos Gram positivos, Gram negativos, fungos e representa um grande desafio terapêutico, levando a uma necessidade premente de novas classes de substâncias antibacterianas, especialmente a partir de fontes naturais. Dentre as plantas medicinais com atividade antimicrobiana no Brasil destaca-se a *Tabernaemontana catharinensis*, popularmente conhecida como cobrina. Os resultados do presente estudo mostraram que o extrato metanólico das suas folhas possui características que podem viabilizar sua utilização como medicamento fitoterápico, em função da atividade antimicrobiana significante observada frente aos microrganismos *Candida albicans* ATCC 10231, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ação antibiofilme significante frente *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os resultados mostram a potencialidade antimicrobiana e antibiofilme de *Tabernaemontana catharinensis* e estudos complementares poderão resultar em novas substâncias com potencial antimicrobiano.

Introdução

De acordo com o metabolismo secundário dos vegetais superiores, o que aumenta a probabilidade de sobrevivência das espécies, eles possuem a capacidade de atuar na cura de diversas enfermidades, uma delas é a infecção por bactérias e ou fungos. Eles produzem substâncias ou compostos com atividade de defesa contra os microrganismos, insetos e herbívoros (NICOLA, 2013). Os antimicrobianos podem efetuar sua ação através da inibição da síntese do ácido nucléico, rompimento de membranas bacterianas e/ou inibição do metabolismo energético. É através destas constatações que se busca desenvolver novos medicamentos. As folhas da *Tabernaemontana catharinensis* contém compostos fenólicos e juntamente com os terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lecitinas, polipeptídeos, substâncias fenólicas, flavonoides, taninos e cumarinas, são os principais grupos com atividade antimicrobiana já estudado e comprovado (PIANA, 2012). Ainda há muito o que se descobrir acerca das atividades oferecidas pelas plantas, pois não se pode ter certeza do potencial tóxico das mesmas. Devido a todos os fatores envolvidos, é

fundamental conhecer as aplicações fitoterápicas e a fisiologia vegetal, para assim conseguir garantir uma maior segurança para o paciente. Este trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme *in vitro* do extrato metanólico das folhas de *Tabernaemontana catharinensis* frente aos microrganismos teste *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 e *Staphyloccocus aureus* ATCC 25923.

Materiais e Métodos

Para a pesquisa de atividade antimicrobiana foram utilizadas as técnicas de concentração inibitória mínima (CIM) adaptada do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) e a pesquisa do biofilme em microplaca corada com cristal violeta (STEPANOVIC et al (2000). O extrato metanólico das folhas de *Tabernaemontana catharinensis* foi cedido pela Profa. Dra. Mariza Boscacci Marques, do Departamento de Química da UEPG. Pesou-se 40,0 mg do extrato em 200 µL de dimetilsulfoxido (DMSO). Diluições seriadas em DMSO e os extratos apresentaram as concentrações de 20000 – 156,2 µg/mL. Na sequência os extratos foram diluídos 1:10 em caldo Muller-Hinton para bactérias e Caldo Muller-Hinton com 2% glicose para leveduras. Os extratos foram testados nas concentrações finais de 2000 – 15,6 µg/mL. As cepas foram preparadas em solução fisiológica estéril equivalentes ao padrão 0,5 da escala de MacFarland. Em seguidas foram diluídas 1:10; e 10µL microlitros foram adicionados as placas. Técnica: A CIM foi determinada pela técnica da microdiluição em placas de 96 cavidades. O crescimento microbiano e/ou sua inibição foram avaliados através da densidade óptica lida em 630 nm no leitor de placa SynergyH1 com software Gen5.2. A produção e/ou inibição do biofilme foi estudada através da técnica da microplaca corada com cristal violeta 0,5% e a placa foi lida em 570 nm. Para o cálculo foi feita a média das leituras descontando a média do branco correspondente. Para avaliação da atividade antimicrobiana e inibição do biofilme comparou-se as DO por análise estatística (ANOVA e pós teste Bonferroni - GraphPad Prism6). Para o cálculo da CIM a DO obtida com o crescimento do microrganismo teste foi equivalente a 100% e o crescimento e/ou inibição dos microrganismos frente as concentrações do extrato foram proporcionalmente calculadas.

Resultados e Discussão

Na comparação com o grupo controle o extrato de *Tabernaemontana catharinensis* frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mostrou atividade antimicrobiana ou redução do crescimento estatisticamente significante ($p<0.05$) nas concentrações de 2000 a 62,25 µg/mL. A redução do crescimento variou entre 30 e 40%. Resultados semelhantes foram relatados por Gonçalves et al (2011) observando atividade antimicrobiana in vitro do extrato das cascas do caule de *Tabernaemontana catharinensis* frente ao *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Guida et al (2011) relataram atividade antimicrobiana do extrato metanólico da casca de *Tabernaemontana catharinense* frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* ATCC 43300 e isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes. Assis et al (2009) observaram atividade antimicrobiana significante frente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 utilizando a fração etanólica do extrato bruto do caule de *Tabernaemontana angulata.* Para *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 a redução do crescimento foi estatisticamente significante até a concentração de 15,62

µg/mL sendo que nas concentrações entre 2000 e 250 µg/mL a redução do crescimento variou de 44 a 38% e entre as concentrações de 62,5 e 15,6 µg/mL de 21 a 12%. Gindri et al (2011) avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato bruto e frações das folhas de *Tabernaemontana brasiliensis* e observaram CIM (31,25 µg/mL) frente *Kocuria* sp. No nosso estudo não observamos a CIM, entretanto a atividade antimicrobiana foi estatisticamente significante até a concentração de 15,6 µg/mL. Para *Escherichia coli* ATCC 25922 o extrato não mostrou atividade antimicrobiana estatisticamente significante ($p>0,5$) em nenhuma das concentrações testadas. Guida et al (2003) estudou a atividade antibacteriana de extratos secos metanólicos e fracionados alcalóides da cortiça do tronco de *Tabernaemontana catharinensis* e detectou-se sensibilidade frente *Escherichia coli* e outros Gram negativos. As autoras argumentam que atividade antibacteriana é atribuível aos compostos alcalóides detectados por cromatografia. No nosso estudo não detectamos atividade antimicrobiana frente *Escherichia coli*. Alguns estudos foram realizados com as cascas do tronco e o nosso foi com as folhas. É possível que a casca contenha mais alcalóides. Para *Candida albicans* a redução do crescimento foi estatisticamente significante ($p<0.5$) até a concentração de 31,25 µg/mL. A CIM50 foi observada na concentração de 2000 µg/mL que inibiu 58% do crescimento. Nas concentrações entre 1000 - 31,25 µg/mL a inibição variou entre 43 a 32%. A análise estatística comparando o biofilme formado pelos microrganismos teste e a sua inibição mediante ação do extrato, nas diferentes concentrações mostrou que para *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 houve redução na formação do biofilme na concentração de 2000 µg/mL (redução de 68%) e 1000 µg/mL (redução de 30%), estatisticamente significantes. Para *Candida albicans* ATCC 10231 o extrato inibiu o biofilme em todas as concentrações testadas (2000 – 32,5 µg/mL. Não houve redução para *S. areus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 ($p>0.5$). O biofilme é uma comunidade microbiana complexa altamente resistente aos antimicrobianos. A formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. Estudos com extrato metanólico de plantas medicinais tem mostrado atividade inibindo a formação de biofilmes bacterianos (ANDRE, 2005). Sánches e colaboradores (2016) estudaram as atividades antimicrobiana e antibiofilme de extratos vegetais metanólicos frente a microrganismos de isolados clínicos.

Conclusões

De acordo com os resultados encontrados o extrato metanólico das folhas de *T. catharinensis* possui características que podem viabilizar sua utilização como medicamento fitoterápico, em função da atividade antimicrobiana significante observada frente aos microrganismos *Candida albicans*, *Kocuria rhizophila* e *Staphylococcus aureus* e ação antibiofilme significante frente *Kocuria rhizophila* e *Candida albicans*. Os resultados obtidos corroboram com os estudos previamente realizados. Sugere-se que se realizem estudos adicionais para investigar a atividade antimicrobiana e antibiofilme frente a outras espécies de microrganismos. A *T. catharinensis* se comportou como uma alternativa promissora para ser trabalhada em pesquisas mostrando potencial atividade antimicrobiana e antibiofilme, o que pode ser uma alternativa para o controle da formação de biofilmes microbianos.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Luis Antônio Esmerino pela orientação no projeto de Iniciação Científica e à Prof. Mariza Boscacci Marques que nos cedeu a planta *Tabernaemontana catharinensis* para que pudéssemos realizar os testes.
Agradeço também ao PIBIC, UEPG e Fundação Araucária.

Referências

ANDRE, C. **Adesão, Formação e Composição de Biofilme por *Staphylococcus aureus* em poliestireno na presença de nisina**. 2015, 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

ASSIS, C. M. et al. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcalóides majoritários de Tabernaemontana angulata Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.19(2B), p.626-631, Abr./Jun. 2009.

CLSI document M100-S24. 7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.

GINDRI, A.L.; BOLIGON, A.A.; MARIO, D.N.; FROHLICH, J.K.; BRUM, T.F.; ALVES, S.H.; ATHAYDE, M.L. Pontencial antimicrobiano do extrato bruto e frações das foçhas de Tabernaemontana catharinensis A. DC. Revista Contexto & Saúde. v.10, n. 20, p.1213-16, 2011.

GONÇALVES, D.M; ARAÚJO, J.H.B.; FRANCISCO, M.S.; COELHO, M.A. FRANCO, J.M. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Revista Contexto & Saúde. v. 10, n. 20, p: 1213-16, 2011.

GUIDA, A.; BATTISTA, G. de; BARGARDI S. Actividad antibacteriana de alcaloides de Tabernaemontana catharinensis A.DC. 1 **Ars Pharmaceutica**, v.44, n.2, p.167-173, 2003.

GUIDA, A. et al. Staphylococcus aureus meticilino-resistentes, sensibles a extractos de Tabernaemontana catharinense A.DC. **Acta Farmacéutica Bonaerense**. v.20, n.3 p. 205-208, 2011.

NICOLA, C. **Estudo fitoquímico e Avaliação das atividades Antioxidante e Anticolinesterásica de *Tabernaemontana catharinensis***. 2013, 61 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2013.

PIANA, M. **Avaliação etnofarmacológica de *Jatropha isabellei*, *Tabernaemontana catharinensis* e *Viola tricolor* visando desenvolvimento de formulação farmacêutica**. 2012, 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

SANCHÉS, E. et al. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2016; 2016: Published online 2016 Jun 27. doi: 10.1155/2016/1572697.