

Estudo *in vitro* da atividade antimicrobiana *Aristolochia Galeata Mart. & Zucc. (Aristolochiaceae)* frente as bactérias gram positivas e gram negativas.

CARVALHO F.S²; ALEIXO A.A.¹; MIRANDA V.C¹; CARVALHO R.S¹; CAMARGOS V.N¹; HERRERA K.M.S¹; MAGALHÃES J.T¹; SANTOS K.M¹; RIBEIRO R.I.M. A¹; LIMA L.A.R. S²; FERREIRA J.M.S¹

RESUMO

Aristolochia galeata Mart. & Zucc (Aristolochiaceae), conhecida como “angelico”, é comumente empregada na medicina tradicional. O presente trabalho determinou o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcoólico bruto de *A.galeata* frente a nove culturas puras de *Escherichia coli* EHEC (ATCC 43895), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4252, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, A sensibilidade bacteriana ao extrato foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo no qual a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Palavras-chave: CIM, Atividade antimicrobiana, bactérias de importância médica

INTRODUÇÃO

A espécie *Aristolochia galeata* Mart. & Zucc, conhecida popularmente como angelicó, é utilizada tradicionalmente na medicina popular no tratamento ou controle de várias doenças¹. Diante dos poucos estudos disponíveis sobre a atividade antibacteriana da *A. galeata* e a ampla resistência que as bactérias Gram negativas e Gram positivas veem apresentando, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade bacteriostática *in vitro* do extrato hidroalcoólico bruto e também das frações hexânica,

acetato de etila, diclorometano e etanólica, frente as bactérias padrão Gram-negativas e Gram-positivas.

Para atingir este objetivo, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2003).

MATERIAL E MÉTODOS

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração de Inibição de 50% (IC 50%) de crescimento bacteriano de *Aristolochia galeata* extrato foi determinada utilizando um método de microdiluição em caldo, tal como descrito no CLSI (2003) com modificações. Nove culturas puras de *Escherichia coli* EHEC (ATCC 43 895), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4252, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, doadas pelo Laboratório de Materiais de Referência da Fundação Oswaldo Cruz, (FIOCRUZ) foram utilizados neste ensaio.

O extrato bruto foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO - Synth, Brasil) 20% e utilizado em diluições seriadas 1250, 1000, 750, 500 e 250 µg / ml. Um inóculo de 125 µL de cultura de células foi adicionada a 25 µL de cada concentração do extrato em caldo de Mueller-Hinton (MH) (Himedia, Índia) em placas de 96 poços. Para controles negativos, os poços contendo MH estéril ou DMSO a 20% foram utilizados e para o controle positivo, MH mais bactérias e o agente antimicrobiano (estreptomicina 1mg/mL- Sigma-Aldrich, EUA) foram utilizados (inibição do crescimento). Controles de esterilidade do meio de cultura e o crescimento microbiano, também foram realizados, contendo apenas MH, e inóculo mais MH, respectivamente. As placas foram incubadas a 35 ± 1 ° C durante 24 h.

A CIM foi avaliada com base na menor concentração de amostra necessária para inibir 80% do crescimento microbiano e determinado por medição da absorbância a 490 nm (Pó onda XS2, Biotec, EUA). A

¹ Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ) - Campus Centro-Oeste Dona Lindu, Divinópolis/MG, Brasil.

² Universidade Federal de São João Del Rei – Departamento de Farmacognosia - CEP 35.501-296 – Divinópolis/MG

* E-mail: fernanda_carvalho20@yahoo.com.br

concentração de inibição de 50% (IC 50%) de crescimento bacteriano foi realizada utilizando um programa de estatística (GraphPad Software, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato hidroalcoólico bruto da *Aristolochia galeata* apresentou atividade antibacteriana em quatro bactérias das nove testadas nessa pesquisa. As bactérias Gram negativas não foram inibidas nas concentrações testadas pela *A.galeata* apresentando CIM maior que 1250 µg/mL.

As amostras Gram positivas foram sensíveis a *A.galeata*, sendo que a amostra *S. aureus* exibiu CIM na menor concentração de 250µg/mL .A bactéria *E. faecalis* apresentou CIM de 500µg/mL , enquanto as amostras *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* mostraram CIM de 750µg/mL, como pode ser visualizado na tabela 1.

Nos estudos realizados com as partições, a fração diclorometano mostrou CIM de 500 µg/mL frente a *S. aureus*, enquanto as bactérias *S. saprophyticus* e *E.faecalis* apresentou CIM de 750 µg/mL e a *S. epidermidis* de 1000µg/mL. Enquanto somente a bactéria *E.faecalis* apresentou sensibilidade na fração etanólica com CIM de 1000 µg/mL ,todas as outras restantes foram sensíveis à fração hexânica, com CIM de 500 µg/mL para *S. epidermidis* e CIM de 750µg/mL frente a *S. aureus* e *S. saprophyticus*, como mostrado na tabela abaixo.

Para a avaliação do controle positivo, o antibiótico utilizado foi estreptomicina, onde exibiu valores de CIM em um intervalo de 1,95 a 62,5 µg/mL conforme esperado possuir ação sobre os microrganismos estudados. O controle negativo (DMSO 20%) não apresentou inibição do crescimento bacteriano.

A maior susceptibilidade das bactérias gram-positivas quando comparado a gram-negativa deve-se principalmente a diferenças morfológicas existentes entre elas. Em especial, as gram-negativas possuem uma camada externa fosfolipídica, tornando-a impermeável

a solutos lipofílicos, enquanto as porinas formam uma barreira seletiva contra solutos hidrofílicos². Todavia, as gram-positivas não possuem essa barreira seletiva tão eficaz, pois elas possuem apenas uma camada externa de peptideoglicanos³, tornando-as mais vulneráveis.

Tabela 1: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hidroalcoólico bruto de *Aristolochia galeata* e do antibiótico estreptomicina em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias	CIM (µg/mL)	
	Extrato seco de <i>A. Galeata</i>	Estreptomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	250	3,9
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	500	62,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	750	3,9
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC 15305)	750	1,95
Gram-Negativas		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4252)	>1250	3,9
<i>Salmonella typhi</i> (ATCC 19430)	>1250	3,9
<i>Escherichia coli</i> EHEC (ATCC 43.895)	>1250	3,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>1250	7,81

Tabela 2: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das partições de *Aristolochia galeata* em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Bactérias	CIM (µg/mL)				
	Gram-positivas	Diclorometano	Acetato de etila	Etanólica	Hexânica
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	500	>1250	>1250	>1250	750
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	750	>1250	1000	>1250	>1250
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228)	1000	>1250	>1250	>1250	500
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ATCC 15305)	750	>1250	>1250	>1250	750
Gram-Negativas					
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4252)	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
<i>Salmonella typhi</i> (ATCC 19430)	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
<i>Escherichia coli</i> EHEC (ATCC 43.895)	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	>1250	>1250	>1250	>1250	>1250

CONCLUSÕES

As bactérias Gram-positivas apresentaram maior sensibilidade, indicando que os extratos brutos de *A. galeata* bem como suas frações hexânica e diclorometano possuem ação seletiva frente à constituição química da parede celular bacteriana. Os resultados obtidos mostraram que *A. galeata* possui potencial atividade antibacteriana e os resultados obtidos estimulam estudos posteriores a fim de isolar e caracterizar compostos bioativos com propriedades antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

- (1) AGUIAR, J.S.; COSTA, M.C.C.D.; NASCIMENTO, S.C.; SENA, K.X.F.R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18(3) 436-440.
- (2) NIKAIIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews*, v. 49, n. 1, p. 1, 1985.
- (3) SCHERRER, R.; GERHARDT, P. Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Journal of Bacteriology*, v. 107, n. 3, p. 718-735, 1971. ISSN 0021-9193.
- (4) CLSI Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Sixth Edition. CLSI document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.