

Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico e das frações obtidas do fruto maduro de *Solanum* sp. frente à bactéria gram positiva metilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

MORAIS, M. G.¹; COSTA, G. A. F.¹; OLIVEIRA, G. T.²; ALVES, L. F.²; FERREIRA, J. M. S.², LIMA, L. A. R.¹

RESUMO

Staphylococcus aureus é uma das principais bactérias causadoras de infecções hospitalares apresentando resistência a várias classes de antibióticos. Assim, o trabalho teve como objetivo fazer a triagem fitoquímica e avaliar atividade antibacteriana do extrato etanólico e frações obtidos do fruto maduro de *Solanum* frente à bactéria gram positiva metilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Para isto, os frutos maduros de *Solanum* sp. foram secados, extraídos por percolação. O extrato foi fracionado por partição com solventes de polaridades crescentes. O teste microdiluição em caldo foi feito para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) determinada por teste microdiluição em ágar. Dentre as amostras, as frações diclorometano e hidroetanólica apresentaram CIM de 250 µg/ml, inibindo em 82 e 80%, respectivamente, o crescimento da bactéria. Na busca de substâncias nas amostras foram detectados alcaloides, cumarinas, esteroides/triterpenoides. Os resultados mostraram importantes indícios de propriedades antibióticas de *Solanum* sp. oferecendo subsídios para pesquisas posteriores.

Palavras-chave: *Solanum*, metilina-resistente *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

A resistência das bactérias aos antibióticos representa um grave problema de saúde pública mundial, caracterizando uma das principais causas de infecções nosocomiais, gerando elevadas taxas de morbidade e mortalidade.¹ *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, que apresenta elevada incidência, tanto na comunidade quanto no ambiente hospitalar. Um dos mecanismos de resistência predominante nesta espécie é a produção de beta-lactamases, especialmente penicilinases, nos quais os principais alvos de degradações por estas enzimas são amoxicilina e metilina. Esta bactéria pode desenvolver diversas infecções, tais como epiteliais, gastrointestinais, osteomelite, pneumonia, septicemia, bacteremia, miocardite e síndrome do choque tóxico². Na busca de novas substâncias antimicrobianas que apresentem diferentes mecanismos de ações daqueles disponíveis atualmente no mercado, as plantas sintetizam uma variedade de substâncias bioativas, com propriedades antimicrobianas, que apresentam uma diversidade de estruturas químicas capazes de reconhecerem e se ligarem a alvos moleculares presentes em bactérias patogênicas³. Assim, o objetivo deste trabalho foi fazer uma triagem fotoquímica e avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato etanólico e frações frente à bactéria Gram positiva metilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA, na qual foi selecionada para este estudo devido a sua importância médica em prevalência nas infecções causadas por bactérias.

MATERIAL E MÉTODOS

Os frutos maduros de *Solanum* sp. foram coletados, secados em estufa, triturados em moinho de facas e extraídos por percolação exaustiva com etanol P.A., obtendo-se o extrato etanólico. Este foi fracionado por partição com solventes de polaridades crescentes, obtendo-se as frações hexânica (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etila (AC) e hidroetanólica (HE).⁴ As amostras foram submetidas à triagem fitoquímica para avaliar a

¹ Universidade Federal de São João Del-Rei – Laboratório de Fitoquímica e Produtos Naturais – CEP 35.501-296 Cidade Divinópolis – Estado Minas Gerais

² Universidade Federal de São João Del Rei – Laboratório de Microbiologia – CEP 35.501-296 Cidade Divinópolis – Estado Minas Gerais
E-mail: melissabiomedica@gmail.com

presença das principais classes de metabólitos secundários, caracterizados por reações químicas que resultam na formação de coloração, precipitado e espuma. A amostra Gram positiva meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) foi isolada a partir de uma amostra de exsudato de lesão e foi cedida pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital São João de Deus (HSJD), Divinópolis, Minas Gerais, Brasil, aprovado pelo Comitê de Ética do HSJD (CEP – HSJD), número 186/2011, na forma de estrias compostas em placas de Petri. No hospital, através do sistema automatizado de identificação e antibiograma VITEK2 compact, (BioMérieux, França), a cepa foi identificada quanto ao gênero *Staphylococcus* e pertencente a espécie *Staphylococcus aureus* portadora da enzima Extended Spectrum β -lactamase (ESBL). Esta amostra também mostrou o perfil de resistência aos seguintes antibióticos: Benzilpenicilina e Oxaciclina (Penicilinas), Ciprofloxacina, Moxifloxacina e Norfloxacina (Fluoroquinolonas), Eritromicina (Macrolídios) e Clindamicina (Lincosaminas). O extrato etanólico e frações foram diluídas em dimetilsulfóxido 20% (DMSO) nas concentrações 2000, 1000, 500 e 250 $\mu\text{g/ml}$ para avaliação da atividade antimicrobiana. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, desenvolvido em triplicatas, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), capaz de inibir 80% ou mais do crescimento bacteriano. Estreptomicina e penicilina foram utilizadas como controle positivo e DMSO, como negativo. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C e a leitura realizada em espectrofotômetro (540 nm).⁵ Em seguida, foi feito o teste microdiluição em ágar, para determinação da concentração bactericida mínima (CBM). Um volume de 25 μl das concentrações que inibiram 80% do crescimento foram retirados dos poços e transferidos para a placa de petri, contendo Ágar Mueller Hinton e incubados por 24 horas a 37 °C e, em seguida, realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). As concentrações com atividade bactericida foram consideradas aquelas que inibiram a formação de colônias⁵. As análises estatísticas foram realizadas utilizando se o teste T- Student's no GraphPad software 5.0, com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Pela triagem fitoquímica, verificou-se a presença de alcaloides em todas as amostras. Cumarinas estavam presentes nas frações diclorometano e acetato de etila e flavonoides foram detectados no extrato etanólico, frações diclorometano, acetato de etila e hidroetanólica. Esteroides e triterpenoides foram observados nas frações diclorometano, acetato de etila e hidroetanólica. Saponinas e taninos não foram detectados no extrato etanólico e nas frações. Quanto a atividade antimicrobiana, as frações diclorometano e hidroetanólica apresentaram CIM de 250 $\mu\text{g/ml}$, inibindo o crescimento de *S. aureus* em 82 e 80%, respectivamente. A fração hexânica, na concentração de 2000 $\mu\text{g/ml}$, inibiu o crescimento em 80%. Já o extrato etanólico e a fração acetato de etila apresentaram CIM maior que 2000 $\mu\text{g/ml}$. As frações diclorometano, hidroetanólica e hexânica apresentaram CBM superior a 2000 $\mu\text{g/ml}$. O controle positivo apresentou CBM e CIM de 31 $\mu\text{g/ml}$, inibindo em 80% o crescimento. O controle negativo não inibiu o crescimento bacteriano, conforme o esperado. O extrato etanólico e frações apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle positivo apresentando $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

As classes de metabólitos presentes nas amostras, como esteroides/ triterpenoides, flavonoides e alcaloides, apresentam significativo potencial antibacteriano⁶. Os resultados demonstraram atividade bacteriostática dos frutos maduros de *Solanum sp.* frente à bactéria MRSA, ação que pode ser exercida pelos metabólitos secundários avaliados na triagem fitoquímica⁶. Substâncias com possível ação antibacteriana estão presentes nas frações diclorometano e hidroetanólica, as mesmas apresentaram menor CIM, dentre as amostras avaliadas. Estas substâncias, possivelmente, apresentaram maior ação farmacológica, apresentando significativa permeabilidade com a membrana celular, bem como especificidade de interação com alvo farmacológico presente na célula bacteriana. O controle

positivo estreptomicina apresenta como mecanismo de ação a inibição da tradução gênica, enquanto a penicilina inibe a síntese da parede celular peptidoglicana, exercendo ação bactericida⁷. As frações diclorometano, hidroetanólica e hexânica podem ter exercido os mesmos de mecanismos de ações do controle positivo ou apresentarem outros mecanismos farmacológicos, tais como inibir a transcrição, replicação do DNA e inibir a síntese de metabólitos, tais como ácido fólico, nas quais devem ser pesquisadas futuramente⁷. As frações diclorometano e hidroetanólica, em menores concentrações, foram capazes de inibir em 80% o crescimento da gram positiva meticilina-resistente *S. aureus* (MRSA), entretanto apresentam ação bactericida em uma maior concentração de 2000 µg/ml, deste modo as mesmas demonstraram relevante ação biológica, não sendo susceptíveis aos mecanismos de resistências como produção da enzima Extended Spectrum β-lactamase (ESBL) desenvolvidos pela espécie em estudo. Deste modo, poderá ser desenvolvido futuramente o experimento de sinergismo entre as amostras, objetivando-se uma CBM menor, que pode potencializar a ação farmacológica.

Pelos resultados obtidos, o fracionamento por partição com solventes de polaridades crescentes demonstrou ser eficiente no fracionamento das substâncias a partir do extrato etanólico, porque as substâncias com propriedades antibacterianas estão presentes em maior concentração nas frações diclorometano e hidroetanólica⁴. Este método combinado a ensaios biológicos possibilita a obtenção rápida de resultados mais significativos devido a maior concentração e separação destes compostos.⁸. Além disso, tendo em vista a importância clínica da cepa em estudo, os resultados aqui apresentados oferecem subsídios para a pesquisa e descoberta de novos agentes antimicrobianos derivados de *Solanum*, que podem ser utilizados na síntese de antibióticos efetivos contra infecções bacterianas causadas por bactérias resistentes.

CONCLUSÕES

O extrato etanólico e frações forneceram informações promissoras com relação aos frutos maduros de *Solanum sp.*, caracterizando-se como objetos importantes para o desenvolvimento de novas pesquisas com esta espécie vegetal frente a diferentes cepas Gram positivas e negativas. Futuramente, as substâncias antibacterianas das amostras podem ser isoladas, elucidadas e utilizadas como protótipos na síntese de novos antibióticos, bem como agentes potencializadores da ação antibacteriana de princípios ativos, contribuindo significativamente para a redução da resistência bacteriana aos antimicrobianos, bem como na redução dos casos e mortalidades causadas por infecções bacterianas.

REFERÊNCIAS

- (1) NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. Department of Molecular and Cell Biology. **Annual Research Biochemistry**, v.78, p.119-146, 2009.
- (2) GONZALES, E.G.; Dowzicky, M.J.; Changes in *Staphylococcus aureus* susceptibility across Latin America between 2004 and 2010. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 17,n.1,p.13-19, 2013.
- (3) GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Revista Química Nova**, v.33, p.667-679, 2010.
- (4) SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2004.
- (5) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; sixth edition*. **CLSI document M7-A6**. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- (6) LÔBO, K.M.S. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semi-árido paraibano. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, p.227-233, 2010.
- (7) MURRAY, R. P. ., ROSENTHAL, S. K., PFALLER, A.M . **Microbiologia Médica**. 5ª. ed. Rio de Janeiro: 2006, p. 187- 2006.
- (8) HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, p.59-100, 2003.