ÁREA DE SUBMISSÃO: MICROBIOLOGIA CLÍNICA - MC02

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *BUCHENAVIA TETRAPHYLLA* CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *ESCHERICHIA COLI*

C. F. O. SILVA¹, J. R. N. CAVALCANTI FILHO¹, L. C. N. da SILVA³, M. V. SILVA¹, M. T. S. CORREIA¹, A. A. M. O. S. Vicente⁶

¹ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil;

² Programa de Pós-graduação, Universidade CEUA, São Luís, Brasil;

³ Departamento de Biologia e Engenharia, Universidade do Minho, Portugal

E-mail para contato: clarissaclara@gmail.com

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana frente a 10 isolados clínicos de *Escherichia coli*, da fração metanólica de *B. tetraphylla* (BtMeOH). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, para obtenção da concentração inibitória mínima (CMI) e concentração microbiota mínima (CMM). Foi realizada análise das alterações ultraestruturais em *E. coli* por microscopia eletrônica de varredura. Os valores de CMI das frações variaram entre 1250 µg/mL e 2500 µg/mL. As bactérias tratadas com BtMeOH apresentaram alterações estruturais como maiores rachaduras e encolhimento celular. Apesar do efeito inibidor contra as bactérias testadas, BtMeOH não foi bactericida, sendo investigações posteriores necessárias para avaliação do seu potencial bacteriostático.

Palavras-chave: Produtos naturais. Caatinga. Atividade antimicrobiana. Infecção bacteriana.

ABSTRACT – The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity against 10 clinical isolates of *Escherichia coli*, from the metanolic fraction of *B. tetraphylla* (BtMeOH). The antimicrobial activity was determined by the broth microdilution method, to obtain the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbial concentration (CMM). Analysis of ultrastructural changes in *E. coli* was performed by scanning electron microscopy. The MIC values of the fractions ranged from 1250 µg/mL to 2500 µg/mL. BtMeOH treated bacteria showed structural alterations such as increased cracking and cell shrinkage. Despite the inhibitory effect against the bacteria tested, BtMeOH was not bactericidal and further investigations were necessary to evaluate its bacteriostatic potential.

Keywords: Natural products. Caatinga. Antimicrobial activity. Bacterial infection.

1. INTRODUÇÃO

Buchenavia tetraphylla (Aubl.) R. A. Howard, conhecida como Tanimbuca é uma árvore amplamente utilizada como agente etnomedicinal por comunidades da região semiárida e incluindo grupos indígenas. Popularmente essa planta é utilizada como expectorante, antitussígeno, contra diarreia, má digestão e como tônico contra fraqueza (Agra et al., 2007). Poucos trabalhos foram publicados com o gênero *Buchenavia*, entretanto, pesquisas com *B. tomentosa* e *B. tetraphylla* mostraram atividade antimicrobiana promovida pelos extratos e frações dessa planta contra bactérias Gram-

negativas, Gram-positivas e fungos (Cavalcanti, et al., 2017). Ao longo dos últimos anos cresceu o interesse sobre compostos obtidos de plantas sobretudo aqueles que são ativos contra bactérias gram-negativas e gram-positivas multirresistentes, devido a sua diversidade molecular (Anyanwu; Okoye, 2017). Diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de comprovar e determinar a ampla variedade das atividades antimicrobianas de compostos bioativos isolados de plantas ou de extratos vegetais onde esses metabólitos podem apresentar efeito sinérgico (Slobodníková et al, 2016). Nesse sentido, este estudo objetivou avaliar o potencial antimicrobiano contra isolados clínicos de *Escherichia coli* bem como analisar as alterações ultra estruturais através de microscopia eletrônica de varredura, com o intuito de contribuir com informações científicas sobre a sua eficácia terapêutica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico e obtenção da fração metanólica

Folhas de *B. tetraphylla* foram coletadas no período de novembro de 2013, no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco, Brasil), sendo uma exsiccata identificada e depositada no Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) como espécime-testemunho de número 84.104. Após desidratado o material foi triturado e o pó armazenado em potes escuros até a utilização. A obtenção do extrato foi realizada segundo Cavalcanti e colaboradores (2017).

Obtenção e perfil de resistência das linhagens utilizadas

Foram utilizados microrganismos *Escherichia coli* susceptíveis pertencentes à coleção de Culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEA224) e linhagens clínicas obtidas de amostras de urina através de solicitações a diversos Laboratórios de Análises Clínicas. Para determinação do perfil de resistência foram utilizados discos de 14 antibióticos comercializados. O índice de resistência múltipla a antibióticos (MAR) foi calculado conforme Krumperman (1983). A Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CMB) foram realizadas de acordo com Cavalcanti e colaboradores (2017).

Avaliação das alterações ultraestruturais em E. coli promovidas pela fração BtMeOH

As linhagens com melhores resultados para o teste do CMI foram selecionadas para avaliação das alterações morfológicas induzidas pela fração metanólica, seguindo metodologia estabelecida por Silva e colaboradores (2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

E. coli é um bacilo gram-negativo presente na microbiota normal da maioria dos animais, entretanto algumas cepas multirresistentes apresentam importância clínica (Chantemesse, 2017). Em nossas investigações, a fração BtMeOH inibiu o crescimento da maioria das cepas de *E. coli* apresentando CMI de 1250-5000 µg/mL. Por outro lado, a BtMeOH apresentou fraca atividade bactericida, com valores de CMB acima de 5000 µg/mL. Para a cepa susceptível UFPEA24, foi encontrada uma razão CMB/CMI igual a 4. A razão entre o CMB/CMI encontrada para a maioria das linhagens foi igual ou superior a 4, sugerindo que a fração é bacteriostática (Djimeli et al., 2017). A atividade bacteriostática de plantas tem sido correlacionada com a prevenção de formação de biofilme bacteriano (Trentin et al., 2013). Em estudo semelhante, *Alchornea cordifolia* foi avaliada frente a *E. coli*, apresentando valores semelhantes aos nossos achados, de 1500 µg/mL para o CMI e >6000 µg/mL para o CMB (Djimeli et al., 2017).

Tabela 1 – Perfil da atividade antimicrobiana promovida por BtMeOH

<i>E. coli</i>	BtMeOH		
	Índice de MAR	CMI	CMB
B02	0,21	2500	>5000
B04	0,42	2500	>5000
B06	0	5000	>5000
B09	0,5	2500	>5000
B10	0	5000	>5000
B12	0,07	5000	>5000
B13	0,42	5000	>5000
B14	0,07	2500	>5000
B15	0	1250	>5000
UFPEDA224	0	1250	5000
MÉDIA CMI		3250 ±1581	
MÉDIA CMB		5000 ± 0	

CMI e CMB estão expressos em µg/mL. Índice de MAR: índice de múltipla resistência a antibiótico.

Na avaliação ultra estrutural de *E.coli* tratadas com a fração BtMeOH foram encontradas alterações morfológicas como rugosidades, depressões e cicatrizes na parede celular, além de cremação, que é perda excessiva de volume citosólico, muitas vezes acompanhada de morte celular.

Figura – Alterações morfológicas induzidas pela fração metanólica de *B. tetraphylla* em *Escherichia coli* (linhagens B15 e UFPEDA224). (A) Aspectos ultraestruturais das células de *E. coli* controle. (B, C e D) *E. coli* tratada com BtMeOH (1250 µg/mL). Setas brancas = alterações na parede celular como depressões e cicatrizes (1A e 1C); Asteriscos = alterações no tamanho e perda da morfologia celular (1A e 1C); Seta sem preenchimento = crenação celular (1D).

4. CONCLUSÃO

Apesar da fração metanólica de *B. tetraphylla* ser uma grande fonte de agentes antimicrobianos como flavonoides e taninos, o efeito bactericida contra as linhagens de *E. coli* testadas só foi observado em altas concentrações. BtMeOH apresentou razão entre CMI/CBM superior a 4, sugerindo atividade bacteriostática do produto. Outros estudos antimicrobianos são necessários, para investigação da ação da fração frente a outros microrganismos e investigação do seu potencial antibiofilme com as mesmas linhagens utilizadas no presente

estudo.

5. REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants know as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian journal of pharmacognosy**, p.14-140, 2007.
- ANYANWU, M. U.; OKOYE, R. C. Antimicrobial activity of Nigerian medicinal plants. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**. v. 6, n. 2, p. 240, 2017.
- CAVALCANTI FILHO, J. R. N.; SILVA, T. F.; NOBRE, W. Q.; OLIVEIRA DE SOUZA; L. I., SILVA E SILVA FIGUEIREDO, C. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. D.; GUSMÃO, N. B.; SILVA, M.V.; DA SILVA, L.C.N.; CORREIA, M. T. D. S. Antimicrobial activity of *Buchenavia tetraphylla* against *Candida albicans* strains isolated from vaginal secretions. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 1521-1527, 2017.
- CHANTEMESSE, B.; BETELLI, L.; SOLANAS, S.; VIENNEY, F.; BOLLACHE, L.; HARTMANN, A.; ROCHELET, M. A nitrocefin-based amperometric assay for the rapid quantification of extended- spectrum b -lactamase-producing *Escherichia coli* in wastewaters. **Water Research**. v.109, p. 375-381, 2017.
- DJIMELI, M. N.; FODOUOP, S. P. C.; NJATENG, G. S. S.; FOKUNANG, C.; TALA, D. S.; KENGNI, F.; GATSING, D. Antibacterial activities and toxicological study of the aqueous extract from leaves of *Alchornea cordifolia* (Euphorbiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 349, 2017.
- KUPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ Microbiol.* v.46, p.165–170, 1983.
- SILVA, J. F. V.; SILVA, L. C. N.; ARRUDA, I. R. S.; SILVA, A. G.; MACEDO, A. J.; ARAÚJO, J. M.; CORREIA, M. T. S.; SILVA, M. V. Antimicrobial activity of *Pityrocarpa moniliformis* leaves and its capacity to enhance the activity of four antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of medicinal plants research**, v.7, n.28, p.2067-2072, 2013.
- SLOBODNÍKOVÁ, L.; FIALOVÁ, S.; RENDEKOVÁ, K.; KOVÁČ, J.; MUČAJI, P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 12, p. 1717, 2016.
- TRENTIN, D. S.; SILVA, D. B.; AMARAL, M. W.; ZIMMER, K. R.; SILVA, M. V.; LOPES, N. P.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A. J. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. 6257, 2013.