

Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras

Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration results from three selected antibacterial plant extracts from the Amazon and Atlantic Brazilian rain forests

Ivana Barbosa Suffredini*
Antonio Drauzio Varella**
Riad Naim Younes***

Resumo

Introdução – Em trabalho prévio, 705 extratos vegetais oriundos de plantas amazônicas e da Mata Atlântica foram triados no teste antibacteriano da microdiluição em caldo. No presente trabalho, os extratos ativos foram identificados e submetidos à avaliação da concentração mínima inibitória e da concentração bactericida mínima usando o mesmo modelo experimental. **Material e Métodos** – Foi utilizado o ensaio da microdiluição em caldo, que consiste em se avaliar a susceptibilidade das bactérias aos extratos vegetais em meio ágar caldo, em microplacas de 96 poços. **Resultados** – Os extratos orgânicos obtidos de *Rapanea parvifolia* (MY841), *Smilax rufescens* (SM53) e *Ruizterania retusa* (VO581) mostraram atividade antibacteriana. MY841 e SM53 mostraram atividade contra *Enterococcus faecalis* CIM = 30 µg/ml; CBM = 60 µg/ml e CIM = 80 µg/ml; CBM = 90 µg/ml, respectivamente) e VO581 mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus* (CIM = 140 µg/ml; CBM = 160 µg/ml) e leve atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (CIM = 200 µg/ml; CBM = 380 µg/ml). **Conclusões** – Estes três extratos apresentaram atividade importante contra as bactérias testadas, devendo, portanto, ser fracionados e os compostos majoritários avaliados.

Palavras-chave: Extratos vegetais; farmacologia; Agentes antibacterianos; Plantas medicinais; Floresta Amazônica; Mata Atlântica

Abstract

Introduction – Up to 705 plant extracts from Amazon Rain Forest and Atlantic Rain Forest were screened against bacteria using the microdilution broth assay. In the present work, minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration were obtained from the three selected active extracts. **Material and Methods** – The microdilution broth assay used in the present analysis consists in evaluating small amounts of extract against the bacteria in agar broth medium in 96 well microplates. **Results** – Three organic extracts obtained from *Rapanea parvifolia* (MY841), *Smilax rufescens* (SM53) and *Ruizterania retusa* (VO581) showed antibacterial activity. MY841 and SM53 showed activity against *Enterococcus faecalis* MIC = 30 mg/ml; MBC = 60 mg/ml and MIC = 80 mg/ml; MBC = 90 mg/ml, respectively) and VO581 showed activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 140 mg/ml; MBC = 160 mg/ml) and a mild activity against *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 200 mg/ml; MBC = 380 mg/ml). **Conclusions** – The three extracts showed important activity against the bacteria, and they are going to be fractionated and the fractions evaluated against the antibacterial model. The major compounds are going to be isolated as well.

Key words: Plant extracts; pharmacology; Anti-bacterial agents; Plants, medicinal; Amazon rain forest; Atlantic rain forest

Introdução

Em trabalho prévio, 705 extratos vegetais obtidos de plantas coletadas na Amazônia e na Mata Atlântica foram triados quanto à atividade antibacteriana em

dose única de 100 mg/ml¹. Destes, três extratos mostraram atividade antibacteriana e foram testados de modo a se obter sua concentração inibitória mínima (CIM) e a sua concentração bactericida mínima (CBM).

* Doutor em Farmacognosia, Professor Titular da Universidade Paulista, pesquisadora na área de produtos naturais, gerente do Laboratório de Extração da UNIP e pesquisadora principal do projeto científico "Triagem de plantas brasileiras com atividade antitumoral e antibacteriana". E-mail: extractlab@unip.br

** Médico Oncologista e Infectologista, Diretor Geral do Laboratório de Extração, Universidade Paulista e do projeto científico "Triagem de plantas brasileiras com atividade antitumoral e antibacteriana".

*** Médico Oncologista, Diretor Científico do Laboratório de Extração, Universidade Paulista e do projeto científico "Triagem de plantas brasileiras com atividade antitumoral e antibacteriana".

Material e Métodos

Coleta das plantas e preparação dos extratos: as plantas foram coletadas e georreferenciadas no período de 1997 a 2001, em diferentes períodos do ano, tendo como suporte facilidades mantidas pela UNIP na Amazônia e na Mata Atlântica. Uma exsiccata de cada espécime foi depositada no Herbário UNIP (Universidade Paulista, São Paulo, SP).

Os órgãos vegetais foram separados, secos e moídos antes de serem submetidos a uma maceração de 24 horas com diclorometano:metanol 1:1, seguido de outra maceração de 24 horas com água, resultando em dois extratos para cada matéria-prima. Informações mais detalhadas da técnica já foram publicadas anteriormente².

Ensaio antibacteriano: Foi utilizado o método da microdiluição em caldo para se determinar CIM e CBM. O inóculo foi preparado a uma concentração de 3×10^2 CFU/ml, a partir de suspensão a 0.5 McFarland (ou 10^8 UFC/ml), obtidas de colônias frescas de bactérias¹. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Sau), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Ecol), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Efae) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Psa) foram as cepas de bactérias testadas. Cada cepa foi inoculada em 9 ml de solução fisiológica de modo a se obter uma concentração de 1.5×10^8 UFC/ml (0.5 MacFarland), que foi diluído para 3×10^2 UFC/ml. Cento e noventa microlitros desta suspensão foram transferidos para cada um dos 96 poços da microplaca. Dez microlitros de cada solução de doses diferentes de cada extrato foram adicionados aos poços e incubados a 35°C por 18 a 20 h. Os extratos foram preparados 20 vezes mais concentrados em solução de DMSO 50% em água, de modo que, ao final da adição nos poços, a concentração resultante seja 20 vezes mais diluída. Os resultados foram analisados visualmente e classificados de acordo com a seguinte legenda: L = inibição de crescimento total, + = poucas colônias no fundo do poço, ++ = muitas colônias no poço, C = turbidez, e X = formação de depósito de colônias do tipo botão. Os extratos que mostraram resultados L foram submetidos a uma subcultura de Müeller-Hinton Agar, para avaliar se

há crescimento bacteriano. CIM foi determinada como a menor concentração na qual há inibição de crescimento, porém com crescimento positivo na subcultura e CBM foi determinada como a menor dose que visualmente apresentou inibição de crescimento e que na subcultura também não apresentou crescimento bacteriano. Gentamicina e tetraciclina foram usadas como fármacos padrão.

Resultados e Conclusões

Os resultados podem ser vistos na Tabela 1. Triar um grande número de amostras é o modo mais rápido de se identificar compostos ativos. Em um recente trabalho do grupo, mais de 700 extratos vegetais aquosos e orgânicos foram testados contra bactérias Gram + e Gram – em dose única de 100 µg/ml. Três extratos orgânicos foram identificados como potenciais agentes antibacterianos por inibirem o crescimento bacteriano na dose única estipulada. CIM e CBM foram obtidas para os extratos ativos contra as respectivas bactérias. Os extratos mostraram uma atividade importante contra as quatro bactérias, embora as Gram + tenham se apresentado mais susceptíveis à ação dos extratos. A atividade antibacteriana do extrato de *R. parvifolia* contra *E. faecalis* pode ser comparada àquela obtida pela tetraciclina contra a mesma bactéria. A atividade antibacteriana de *R. parvifolia* pode vir a se tornar mais potente após o isolamento do componente ativo. Por outro lado, este mesmo extrato mostrou uma fraca atividade contra *P. aeruginosa*.

O extrato obtido de *S. rufescens* mostrou uma importante atividade contra *E. faecalis* e foi absolutamente não ativo contra *P. aeruginosa*. O extrato obtido de *R. retusa* mostrou eficácia contra *S. aureus* e uma relativa atividade contra *P. aeruginosa*. Doses maiores de extratos foram necessárias para inibir o crescimento ou matar *E. coli*, fato esperado por ser uma bactéria Gram –, cuja estrutura de parede favorece uma maior resistência.

Os valores relativos à CIM e à CBM obtidos dos extratos referenciam estas misturas para futuras análises

Tabela 1. Concentração mínima inibitória (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de três extratos vegetais com atividade antibacteriana

Família	Espécie	Número de coleta	Órgãos	Número do extrato	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>	
					CIM*	CBM*	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*
Myrsinaceae	<i>Rapanea parvifolia</i>	AAO3458	OA	MY841	250	450	30	60	330	390	350	450
Smilacaceae	<i>Smilax rufescens</i>	PS381	OA	SM53	630	650	80	90	>1000		400	450
Vochysiaceae	<i>Ruizterania retusa</i>	PS401	CA	VO581	140	160	390	540	200	380	350	410
	Gentamicina				0,20	0,20	8,0	8,0	1,6	1,6	0,40	0,40
	Tetraciclina				0,50	0,5	32,0	32,0	8,0	16,0	2,0	2,0

OA = órgãos aéreos; CA = caule, * CIM e CBM são expressos em mg/ml

dos compostos isolados por fracionamento biodirecionado, quando será possível dizer se haverá potencialização dos efeitos antibacterianos ou se estes efeitos serão interrompidos devido à quebra de sinergismo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP pelo apoio financeiro (99/05904-6), a UNIP pelo constante apoio e aos técnicos envolvidos no projeto.

Referências

1. Suffredini IB, Sader HS, Gonçalves AG, Reis AO, Gales AC, Varella AD, *et al.* Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(3):379-84.
2. Younes RN, Varella D, Suffredini IB. Extração e rastreamento de novas drogas em plantas brasileiras. *Acta Oncol Bras.* 2000; 20(1):15-9.

Recebido em 01/9/2006

Aceito em 06/11/2006

Minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration results from three selected antibacterial plant extracts from the Amazon and Atlantic Brazilian rain forests

Ivana Barbosa Suffredini*
Antonio Drauzio Varella**
Riad Naim Younes***

Abstract

Introduction – Up to 705 plant extracts from Amazon Rain Forest and Atlantic Rain Forest were screened against bacteria using the microdilution broth assay. In the present work, minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration were obtained from the three selected active extracts. **Material and Methods** – The microdilution broth assay used in the present analysis consists in evaluating small amounts of extract against the bacteria in agar broth medium in 96 well microplates. **Results** – Three organic extracts obtained from *Rapanea parvifolia* (MY841), *Smilax rufescens* (SM53) and *Ruizterania retusa* (VO581) showed antibacterial activity. MY841 and SM53 showed activity against *Enterococcus faecalis* (MIC = 30 mg/ml; MBC = 60 mg/ml and MIC = 80 mg/ml; MBC = 90 mg/ml, respectively) and VO581 showed activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 140 mg/ml; MBC = 160 mg/ml) and a mild activity against *Pseudomonas aeruginosa* (MIC = 200 mg/ml; MBC = 380 mg/ml). **Conclusions** – The three extracts showed important activity against the bacteria, and they are going to be fractionated and the fractions evaluated against the antibacterial model. The major compounds are going to be isolated as well.

Key words: Plant extracts, pharmacology; Anti-bacterial agents; Plants, medicinal; Amazon rain forest; Atlantic rain forest

Introduction

In our previous work, 705 plant extracts obtained from species collected in the Amazon rain forest and in the Atlantic forest were screened for their antibacterial activity in a single dose of 100 µg/ml¹. Three extracts showed activity and were tested in order to have their minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) obtained.

Material and Methods

Plant collection and extract preparation: Plants were collected in a period of time spanning from 1997 to 2001, based on a facility maintained by Universidade Paulista in the Amazon and in the Atlantic rain forests. A voucher for each specimen is deposited in the Herbarium UNIP (Universidade Paulista, São Paulo, SP).

Plant organs were separated, dried and ground before being submitted to a 24-h maceration with dichloromethane: methanol (1:1) followed by 24-h maceration with water, resulting in two extracts from each plant material. Further information on the technique can be found elsewhere².

Antibacterial assay: The broth microdilution method was used to determine MIC's and MBC's¹. The inoculum was prepared at the concentration of 3x10² CFU/ml, starting from a 0.5 McFarland (or 10⁸ CFU/ml) prepared from fresh colonies of bacteria¹. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Sau), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Ecol), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Efae) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Psa) were the bacterial strains tested. Each strain was inoculated into 9 ml of physiological solution in order to obtain a concentration of 1.5 x 10⁸ CFU/ml (0.5 MacFarland). The inoculum was then diluted to 3x10² CFU/ml. One-hundred-and-ninety microliters of this suspension were transferred to each microplate well. Ten microliters of each extract solution were added to the microplate wells and incubated at 35°C for 18 to 20 h. Extracts were prepared to 20 times the desired test concentration in 50% DMSO solution. Results were visually analyzed and classified according to the following patterns: L = total growth inhibition, + = few culture flocks in the bottom of the well, ++ = many culture flocks being deposited, C = turbidity, and X = flock deposited in the bottom. Extracts that showed inhibitory activity in the previous broth assay (L) were submitted to a subculture in Müeller-Hinton Agar, in

* PhD in Pharmacognosy, Professor, Course Pharmacy, Universidade Paulista, Researcher in the area of Natural Products, manager of the scientific project on the "Discovery of new antitumor and antibiotic agents from natural sources", developed in the Laboratório de Extração, Universidade Paulista. E-mail: extractilab@unip.br

** Physician Doctor in the area of Oncology and Infectology, Director and Head of the Laboratório de Extração, Universidade Paulista and from the project on the "Discovery of new antitumor and antibiotic agents from natural sources".

*** Physician Doctor in the area of Oncology, Scientific Director of the Laboratório de Extração, Universidade Paulista and from the project on the "Discovery of new antitumor and antibiotic agents from natural sources".

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of three plant extracts

Family	Species	Collect number	Organ	Extract number	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Escherichia coli</i>	
					MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*	MIC*	MBC*
Myrsinaceae	<i>Rapanea parvifolia</i>	AAO3458	OA	MY841	250	450	30	60	330	390	350	450
Smilacaceae	<i>Smilax rufescens</i>	PS381	OA	SM53	630	650	80	90	>1000		400	450
Vochysiaceae	<i>Ruizterania retusa</i>	PS401	WS	VO581	140	160	390	540	200	380	350	410
	Gentamicina				0,20	0,20	8,0	8,0	1,6	1,6	0,40	0,40
	Tetraciclina				0,50	0,5	32,0	32,0	8,0	16,0	2,0	2,0

OA = aerial organs; WS = stem, * MIC and MBC are given in µg/ml

order to evaluate bacteria growth. MIC was determined as the lowest concentration visually analyzed as "L" that implied in bacteria growth when subcultured and MBC was determined as the lowest concentration that showed no bacteria growth in the subcultures. Gentamycin and tetracycline were used as standard drugs.

Results and Conclusions

Results can be seen in Table 1. Screening a large number of samples is the fastest way of identifying active compounds. In our recent work, more than 700 plant aqueous and organic extracts were tested against two Gram-positive and two Gram-negative bacteria in a single dose of 100 µg/ml. Three organic extracts were identified as potential antibacterial agents for inhibiting bacteria growth at the single dose. MIC and MBC were obtained for the active extracts against the four bacteria. The extracts showed a relative good activity against the four bacteria, although both Gram-positive were more susceptible to the inhibitory action of the extracts. The antibacterial activity resulted from the extract of *R. parvifolia* against *E. faecalis* can be compared to that obtained with tetracycline against the same bacteria.

The antibacterial activity of the MY841 extract can become more potent with the isolation of the active substance. Though, the same extract showed a mild activity against *P. aeruginosa*.

The extract obtained from *S. rufescens* showed a significant antibacterial activity against *E. faecalis* and absolutely no response against *P. aeruginosa*. The extract obtained from *R. retusa* showed efficacy against *S. aureus* and a relative good activity against *P. aeruginosa*. We observed that higher doses of extracts were necessary to inhibit or kill *E. coli*, which is expected due to the biochemistry of the cell wall of Gram-negative bacteria.

MIC and MBC values obtained for the extracts become a reference to further analysis of the isolated compounds to be obtained by bioguide-fractionation, so they can be compared and the relative potency evaluated.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPESP for their financial support (Grant #99/05904-6), UNIP for their constant support and the technicians involved in the process.

Referências

1. Suffredini IB, Sader HS, Gonçalves AG, Reis AO, Gales AC, Varella AD, *et al.* Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(3):379-84.
2. Younes RN, Varella D, Suffredini IB. Extração e rastreamento de novas drogas em plantas brasileiras. *Acta Oncol Bras.* 2000; 20(1):15-9.

Received in 01/9/2006

Accepted in 06/11/2006