

Artículo Original | Original Article

Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW

[Antibacterial, antifungal and antimicrobial modulatory activities of fractions from *Lygodium venustum* SW]

Maria Flaviana B. MORAIS-BRAGA¹, Teógenes M. SOUZA¹, Karla K.A. SANTOS¹, Gláucia M.M. GUEDES¹,
Jaqueline C. ANDRADE¹, Saulo R. TINTINO¹, José Galberto M. COSTA², Irwin R.A. MENEZES³,
Antonio Á. F. SARAIVA⁴ & Henrique D.M. COUTINHO¹

¹Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular;

²Laboratório de Pesquisa com Produtos Naturais,

³Laboratório de Farmacologia e Química Molecular,

⁴Laboratório de Paleontologia

Universidade Regional do Cariri, Crato, Brasil.

Contactos / Contacts: Henrique D.M. COUTINHO - E-mail address: hdmcoutinho@gmail.com

Abstract

The traditional use of plants in popular medicine has also indicated the way in the search for pharmacological agents. The need for new drugs is evidenced by the strong resistance of microorganisms. The fern *Lygodium venustum* had its antimicrobial potential measured, in this work, by the broth microdilution method. Its ability to modulate the action of antibiotics was also tested. Its hexane, dichloromethane and methanol fractions obtained from the ethanolic extract of fresh leaves were assayed. The Minimum Inhibitory Concentration was evaluated from the standard strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. To check the modulating activity of antibiotics were used multi-resistant strains of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* and the same yeast strains used in CIM. The drugs used in modulating were antifungal and aminoglycosides. All results showed MIC $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ activity. The fractions neither enhanced the action of antifungal agents against strains of *Candida*, nor the aminoglycosides against *P. aeruginosa*. However, interesting results potentiating the action of these were obtained against the *E. coli* and *S. aureus*. Such results suggest that secondary metabolites which are in this plant may be used to create new drugs in combination with aminoglycosides. This was the first report of activity-modifying action of antibiotics for fractions obtained from a fern family Lygodiaceae.

Keywords: Fern, antimicrobial activity, modulation of antibiotics.

Resumo

O tradicional uso das plantas na medicina popular vem indicando um caminho na busca de agentes farmacológicos. A necessidade de novos fármacos é evidenciada pela acentuada resistência dos microorganismos. A samambaia *Lygodium venustum* teve neste trabalho seu potencial antimicrobiano avaliado através do método de microdiluição em caldo. Também foi testada a sua capacidade de modular a ação de antibióticos. Foram ensaiadas suas frações hexânica, diclorometano e metanólica obtidas a partir do extrato etanólico das folhas frescas. A Concentração Inibitória Mínima foi avaliada frente às linhagens padrões de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Na verificação da atividade moduladora de antibióticos foram utilizadas linhagens multirresistentes de *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* e as mesmas linhagens fúngicas utilizadas na CIM. As drogas usadas na modulação foram antifúngicos e aminoglicosídeos. Todos os resultados da CIM demonstraram atividade $\geq 1024\mu\text{g/mL}$. As frações não potencializaram a ação dos antifúngicos contra as linhagens de *Candida*, nem dos aminoglicosídeos frente à *P. aeruginosa*. Porém, interessantes resultados potencializando a ação destes foram obtidos frente à *E. coli* e *S. aureus*. Tais resultados sugerem que metabólitos secundários existentes no vegetal poderão ser utilizados para constituição de novas drogas em associação com aminoglicosídeos. Este foi o primeiro relato de atividade modificadora da ação de antibióticos por frações obtidas de uma pteridófito da família Lygodiaceae.

Palavras-chave: Samambaia, atividade antimicrobiana, modulação de antibióticos.

Recibido | Received: 8 de Abril de 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 26 de Mayo de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Enero de 2013

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: MFB Morais-Braga, TM Souza, KKA Santos, GMM Guedes, JC Andrade, SR Tintino, JGM Costa, IRA Menezes, AÁF Saraiva, HDM Coutinho. 2013. Atividade antibacteriana, antifúngica e moduladora da atividade antimicrobiana de frações obtidas de *Lygodium venustum* SW. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 12(1): 38 - 43.

INTRODUÇÃO

Plantas utilizadas na medicina popular tem sido alvo de investigações científicas devido as suas propriedades terapêuticas. Diversos estudos comprovam que a biodiversidade vegetal possui um arsenal de compostos que se mostram promissores na produção de novos fármacos. O tratamento de enfermidades com plantas é tão antigo quanto à espécie humana e estas vêm sendo comercializadas em feiras livres e mercados populares (Maciel *et al.*, 2002).

Devido ao rápido surgimento de resistência de microrganismos, a busca por novos agentes terapêuticos eficazes tem se tornado constante. Dessa forma, a pesquisa tem envolvido desde Briófitas até Angiospermas e suas diversas atividades farmacológicas têm se tornado uma alternativa promissora no combate às infecções causadas por bactérias e fungos (Morantes *et al.*, 2007; Peres *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2010).

As leveduras de *Candida*, no homem, podem atingir superfícies cutâneas e mucosas, causando a candidíase oral, vaginal, onicomicose, intertrigo, podendo em alguns casos ser invasiva. O uso exacerbado de antibióticos de amplo espectro vem favorecendo o desenvolvimento de infecções fúngicas (Almeida, 2008). Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas têm se tornado a causa de infecções que inclusive podem apresentar implicações clínicas em ambientes hospitalares. Muitos patógenos estão se tornando resistentes a uma variedade crescente de quimioterápicos, tornando o combate às infecções por eles causadas extremamente difíceis (Vermelho *et al.*, 2007).

No grupo das plantas vasculares, a samambaia lianescente *Lygodium venustum*, têm sido tradicionalmente utilizada como um fitoterápico. Suas partes aéreas são utilizadas sob a forma de chá ou tópica, no tratamento de infecções e dermatoses, entre outras enfermidades (Duke, 2008). Poucos estudos farmacológicos foram realizados, mas suas atividades tricomonocida (Calzada *et al.*, 2007), antibacteriana (Alanis *et al.*, 2005) e ainda seu efeito no tratamento de distúrbios gastrointestinais (Calzada *et al.*, 2010) já foram investigados.

Devido aos problemas causados por esses microrganismos e o rápido surgimento de resistência, as propriedades antibacterianas e antifúngicas das frações hexânica, diclorometano e metanólica, obtidas de *L. venustum* serão analisadas.

MATERIAL E METODOS

Material vegetal

Folhas de *L. venustum* foram coletadas no município de Crato, estado do Ceará, Brasil. A planta foi identificada pelo Dr. Antonio Álamo Feitosa Saraiva e depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima da Universidade regional do Cariri – URCA, sob o número 5569 HCDAL.

Preparação do Extrato Etanólico das Folhas de L. venustum (EEFLV)

As folhas foram parcialmente trituradas e 211,18g da massa foliar foi submersa em etanol a 92% por um período de 72 horas. O extrato foi filtrado e em seguida concentrado em rotaevaporador (Q-344B – Quimis – Brasil) e banho-maria (Q-214M2 – Quimis – Brasil), obtendo-se um rendimento de 49,2%. O fracionamento foi realizado tomando-se metade do extrato bruto, seguindo a escala de polaridade, sendo obtidas as frações hexânica, diclorometano e metanólica com rendimento de 0,22 g, 0,38 g e 3 g, respectivamente.

Material fúngico e bacteriano

As bactérias utilizadas no teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram as linhagens padrões de *E. coli* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 10536, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *K. pneumoniae* ATCC 4362. Nos ensaios com fungos foram testadas as linhagens padrões de *Candida albicans* ATCC 40006, *C. krusei* ATCC 2538, *C. tropicalis* ATCC 40042. Todas as linhagens foram obtidas do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba. Para o teste de modulação foram usadas as linhagens bacterianas multirresistentes de isolados clínicos *P. aeruginosa* 03, *E. coli* 27 e *S. aureus* 358 com perfil de resistência apresentado na tabela 1 e as mesmas linhagens fúngicas utilizadas no teste de CIM.

Tabela 1
Perfil de resistência das bactérias a antibióticos

Bacteria	Fonte	Perfil de resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida Cirúrgica	Ast, Ax, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Chlo, Im, Kan, Szt, Tet, Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida Cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Cultura de urina	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami

Ast: aztreonam; **Ax:** amoxicilina; **Amp:** ampicilina; **Ami:** amicacina; **Amox:** amoxicilina; **Ca:** cefadroxil; **Cfc:** cefaclor; **Cf:** cefalotina; **Caz:** ceftazidima; **Cip:** ciprofloxacina; **Chlo:** chloranphenicol; **Im:** imipenem; **Kan:** canamicina; **Szt:** sulfametrim; **Tet:** tetraciclina; **Tob:** tobramicina; **Oxa:** oxacilina; **Gen:** gentamicina; **Neo:** neomicina; **Para:** paramomicina; **But:** butirosina; **Sis:** sisomicina; **Net:** netilmicina; **Com:** Cefepime; **Ctz:** ceftazidima; **Ptz:** piperacilina-tazobactam; **Lev:** levofloxacina; **Mer:** meropenen.

Drogas

As drogas utilizadas nos testes foram os aminoglicosídeos canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina e os antifúngicos mebendazol, anfotericina B, neomicina e benzoilmetronidazol (Sigma Co., St. Louis, USA), a uma concentração inicial de 5.000 µg/mL e 1024 µg/mL, respectivamente. Todas as drogas foram dissolvidas em água esterilizada.

Concentração Inibitória Mínima

O método utilizado foi o da microdiluição em caldo. Para se chegar à concentração de 1024 µg/mL a ser utilizada nos testes, obteve-se inicialmente uma concentração de 200 mg/mL do extrato etanólico de *L. venustum* em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), que em seguida foi diluída em água destilada. O inóculo foi diluído em BHI 10% chegando-se a uma concentração de 10⁵ UFC/mL. Foram distribuídos 100 µL do BHI e inóculo em cada poço de uma placa de 96 poços e em seguida procedeu-se a microdiluição seriada com a solução de 100 µL do extrato, variando nas concentrações de 512 a 8µg/mL. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 35 °C (Javadvpour et al., 1996). A revelação da CIM bacteriana foi feita utilizando-se a resazurina (20 µL a 0,01%), enquanto para os fungos foi observado a turbidez provocada pelo crescimento. A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado de acordo com a NCCLS (2008).

Teste de Modulação de Drogas

Para verificar se o extrato modificaria a ação dos antibióticos frente às cepas testadas, utilizou-se o método proposto por Coutinho et al. (2008), onde a solução do extrato foi testada em concentração sub-inibitória (MIC/8) de 128 µg/mL. Foram distribuídos 100 µL de uma solução contendo BHI, inóculo e extrato em cada poço no sentido alfabético da placa. Em seguida, 100 µL da droga foi misturado ao primeiro poço, procedendo-se a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. As concentrações de aminoglicosídeos e antifúngicos variavam gradualmente de 5000 a 2,44 µg/mL e 1024 a 8 µg/mL, respectivamente.

RESULTADOS

Nos testes de Concentração Inibitória Mínima (MIC), realizados contra as linhagens de *Candida*, nenhuma das frações testadas apresentou atividade de relevância clínica, sendo todos os resultados ≥ 1024 µg/ml. Quanto ao teste de modulação, nenhuma alteração do MIC foi verificada quando as frações foram associadas aos antifúngicos.

No teste de MIC com cepas bacterianas, todas as frações apresentaram crescimento ≥ 1024 µg/ml. Contudo, na avaliação da atividade moduladora de antibióticos, a fração hexânica associada à amicacina diminuiu dois pontos de MIC para a cepa *E. coli* 27, e sete pontos de MIC para a gentamicina frente à mesma cepa. A fração diclorometano também reduziu drasticamente o MIC de gentamicina frente à cepa *E.*

coli 27. Todas as frações mostraram uma diminuição da CIM para gentamicina frente às cepas *E. coli* 27 e *S. aureus* 358, os resultados são mostrados na tabela 2. Nos testes usando o isolado clínico *S. aureus* 358, todas as frações mostraram atividade quando

associadas à canamicina e gentamicina, com redução do MIC em dois pontos, os resultados podem ser visualizados na tabela 2. Nenhuma das frações testadas mostrou efeito quando associadas aos aminoglicosídeos frente à cepa *P. aeruginosa* 03.

Tabela 2
Atividade moduladora da ação de antibióticos por frações de *Lygodium venustum*. Concentração subinibitória (MIC/8 µg/mL)

Antib	<i>Escherichia coli</i> 27				<i>Staphylococcus aureus</i> 358			
	Ant.	Ant+ FHLV	Ant+ FDLV	Ant+ FMLV	Ant.	Ant+ FHLV	Ant+ FDLV	Ant+ FMLV
Can	156,2	156,2	156,2	156,2	156,2	39,06	39,06	39,06
Neo	156,2	156,2	156,2	156,2	39,06	9,76	9,76	39,06
Ami	312,5	78,12	312,5	312,5	78,12	78,12	78,12	78,12
Gen	1250	9,7	9,7	39,06	19,5	2,44	2,44	2,44

Antib.: antibiótico; **Can:** canamicina; **Neo:** neomicina; **Ami:** amicacina; **Gen:** gentamicina; **FHLV:** Fração hexânica de *L. venustum*; **FDLV:** Fração diclorometano de *L. venustum*; **FMLV:** Fração metanólica de *L. venustum*.

DISCUSSÃO

A atividade antibacteriana dos extratos metanólico e aquoso de *L. venustum* foram ensaiados frente a linhagens de *E. coli* (Alanis et al., 2005), porém os extratos não foram considerados eficientes inibidores do crescimento bacteriano, uma vez que apresentaram percentuais de inibição abaixo de 50%, além disso, a atividade do extrato foi apresentada diante de uma concentração considerada muito elevada para aplicação clínica (Houghton et al., 2007).

O extrato metanólico de outra planta do gênero, *Lygodium japonicum*, foi testado contra linhagens de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* no método de difusão em disco, porém nenhuma atividade nas concentrações testadas foi apresentada (Taylor et al., 1995). No entanto, a metodologia utilizada apresenta desvantagens, pois é impossível medir a quantidade de substância que se difundiu no Agar (Greger e Hadacek, 2000).

Os nossos resultados permitiram perceber uma diferença de susceptibilidade entre as bactérias Gram-positiva *S. aureus* e Gram-negativa *E. coli*, em relação às frações testadas. A membrana externa das bactérias Gram-negativas apresenta uma barreira resistente à penetração de vários agentes microbianos e estas possuem também um espaço periplasmático com

enzimas capazes de inativar alguns antibióticos (Vermelho et al., 2007), podendo esta ser a explicação pela diferença na vulnerabilidade dos microrganismos.

Ao analisar o efeito potencializador de antimicrobianos pelas frações de *L. venustum*, ficou evidente que as bactérias apresentaram maior susceptibilidade ao produto natural que os fungos, isto talvez se justifique pela maior complexidade das células eucarióticas. Resultados semelhantes aos nossos já foram evidenciados em outros trabalhos, apesar de outras metodologias terem sido utilizadas (Khan et al., 2004; Al-Burtamani et al., 2005).

A atuação de diferentes produtos naturais potencializando o efeito de antibióticos frente a bactérias multirresistentes tem sido demonstrado em vários estudos (Coutinho et al., 2009a; Coutinho et al., 2009b; Coutinho et al., 2009c; Coutinho et al., 2009d; Coutinho et al., 2010a; Coutinho et al., 2010b; Coutinho et al., 2010c). Esta estratégia é chamada “herbal shotgun” ou “synergistic multi-effect targeting” e se refere à utilização de plantas e drogas em uma abordagem usando mono ou multi extratos combinados afetando diversos alvos do microorganismo ao mesmo tempo, com componentes terapêuticos colaborando de forma sinérgica-agonista. Isto tem sido demonstrado não apenas a partir da

combinação de extratos, mas também de produtos naturais ou extratos e produtos sintéticos ou antibióticos (Coutinho *et al.*, 2008; Wagner e Ulrich-Merzenich, 2009).

Este é o primeiro relato de atividade moduladora de antibióticos por frações obtidas do extrato de uma planta da família Lygodiaceae. Nossos resultados indicam que *L. venustum* poderia ser uma fonte de produtos naturais com atividade modificadora de antibióticos. Dessa forma, devido a resultados tão relevantes novos ensaios de toxicidade devem ser realizados na tentativa de desenvolver novas alternativas terapêuticas para o tratamento de doenças infecciosas causadas por bactérias.

REFERÊNCIAS

- Alanis AD, Calzada F, Cervantes JA, Ceballos GM. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. **J Ethnopharmacol** 100: 153 - 157.
- Al-Burtamani SKS, Fatope MO, Marwah RG, Onifade AK, Al-Saidi SH. 2005. Chemical composition, antibacterial, antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. **J Ethnopharmacol** 96:107-112.
- Almeida SR. 2008. **Ciências Farmacêuticas Micologia**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Calzada F, Arista R, Pérez H. 2010. Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal - gum acacia - induced hyperperistalsis in rats. **J Ethnopharmacol** 128: 49 - 51.
- Calzada F, Lilian YM, Contreras AT. 2007. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites. **J Ethnopharmacol** 113: 248 - 251.
- Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy** 54: 328 - 330.
- Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. 2009a. Potentiating effect of *Mentha arvensis* and chlorpromazine in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **In Vivo** 23: 287 - 289.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP, Lima EO. 2009b: Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 33: 467 - 471.
- Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. 2009c. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin - resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complement Altern Med** 9: 1 - 4.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-JR JP. 2009d. *In vitro* interference of *Momordica charantia* in the resistance to aminoglycosides. **Pharma Biol** 47: 1056 - 1059.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO. 2010a. Potentiation of antibiotic activity by *Eugenia uniflora* and *Eugenia jambolanum*. **J Med Food** 13: 1024 - 1026.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Falcão-Silva VS, Siqueira-JR JP, Lima EO. 2010b. *In vitro* additive effect of *Hyptis martiusii* in the resistance to aminoglycosides of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharma Biol** 48: 1002 - 1006.
- Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Siqueira-Jr JP. 2010c. Additive effects of *Hyptis martiusii* Benth with aminoglycosides against *Escherichia coli*. **Indian J Medical Res** 131: 106 - 108.
- Duke JA. 2008. **Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America**. CRC Press Taylor & Francis group, New York, USA.
- Greger H, Hadacek F. 2000. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochem Anal** 11: 137 - 147.
- Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. 2007. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualising an elephant. **J Ethnopharmacol** 110: 391 - 400.
- Javadpour MM, Juban MM, Lo WC, Bishop SM, Alberty JB, Cowell SM, Becker CL, McLaughlin ML. 1996. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **J Med Chem** 39: 3107 - 3113.
- Santos KKA, Matias EFF, Almeida TS, Costa JGM, Coutinho HDM. 2010. Atividade antifúngica

- de extratos vegetais e animais da região do cariri. **Cad Ci Cultura** 2: 53 - 65.
- Khan MR, Omoloso AD, Kihara M. 2004. Antibacterial and antifungal of *Euroschinus papuanus*. **Fitoterapia** 75: 412 - 416.
- Lee JH, Yang HY, Lee HS, Hong SK. 2008. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil from Cones of *Pinus koraiensis*. **J Microbiol Biotechnol** 18: 497 - 502.
- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga JR VF, Ggrynberg NF. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova** 25: 429 - 438.
- Peres MTL, Simionatto E, Hess SC, Bonani VFL, Candido ACS, Castelli C. 2009. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Quim Nova** 32: 897 - 901.
- Morantes J, Prieto C, Linares E, Rincón J, Aristizábal F. 2007. Análisis y fitoquímico de actividad biológica del musgo *Polytrichum juniperinum*. **Rev Acad Colomb Cienc Exact Fís Nat** 31: 473 - 479.
- NCCLS - National Comitee for Clinical Laboratory Standards. 2008. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard**. 6th ed. NCCLS document M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, USA.
- Taylor RS, Manandhar NP, Towers GHN. 1995. Screening of selected medicinal plants of Nepal for antimicrobial activities. **J Ethnopharmacol** 46: 153 - 159.
- Vermelho AB, Bastos MCF, Branquinha M. 2007. **Bacteriologia Geral**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. 2009. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine** 16: 97 - 110.