
Avaliação da atividade antibacteriana e modulatória da fração hexânica do extrato hexânico de *Cordia verbenacea* DC.

Evaluation of Antibacterial Activity and Modulation Hexane Fraction of the Hexane Extract *Cordia verbenacea* DC.

Erivania F. ALVES*, Beatriz S. SANTOS & Edinaldo F.F. MATIAS¹

Faculdade Leão Sampaio – FALS, Juazeiro do Norte-CE, Brasil.

Recebido em: 25/08/2014; aceito: 06/11/2014; publicado em 19/11/2014

RESUMO

A utilização de plantas para tratamentos de enfermidades é uma prática antiga, porém ainda presente no cotidiano de diversas comunidades tradicionais. *Cordia verbenacea* DC, conhecida popularmente como “erva baleeira” é uma espécie vegetal bastante utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e analgésico. Estudos experimentais demonstraram um efetivo potencial anti-inflamatório e antimicrobiano. Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano e modulador da resistência bacteriana da Fração Hexânica do Extrato Hexânico de *Cordia verbenacea* DC (HFHECC) frente às linhagens padrão e resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. A prospecção fitoquímica revelou a presença de diversos metabólitos secundários da classe dos taninos, flavonóides e terpenos. Quanto a atividade antibacteriana o produto não apresentou resultado clinicamente relevante (CIM \geq 1024 μ g/mL), contudo quando combinado com antibióticos observou-se sinergismo, potencializando o efeito antibacteriano de aminoglicosídeos. Com os resultados obtidos, concluímos que HFHECC é uma possível fonte de produto de natural com potencial atividade moduladora de resistência bacteriana à aminoglicosídeos e que as informações sirvam como parâmetro para busca de novas alternativas de tratamento de doenças.

Palavras chave: *Cordia verbenacea* DC., atividade antibacteriana, CIM, aminoglicosídeos, atividade moduladora.

ABSTRACT

The use of plants for treatment of ailments is an ancient practice, but still present in the daily lives of various communities. *Cordia verbenacea* DC, popularly known as "erva baleeira" is a species of plant widely used in folk medicine as anti-inflammatory and analgesic. Experimental studies have demonstrated an effective potential anti-inflammatory and antimicrobial. This study aimed to evaluate the antibacterial potential modulator of bacterial resistance and the hexane fraction of the hexane extract of *Cordia verbenacea* DC (HFHECC) against the standard and resistant strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. The phytochemical screening revealed the presence of several secondary metabolites class of tannins, terpenes and flavonóides. Antibacterial activity as the product showed no clinically significant results (MIC \geq 1024 g / mL), but when combined with antibiotic synergism was observed, potentiating the antibacterial effect of aminoglycosides. With these results, we conclude that HFHECC is a possible source of natural products with potential modulatory activity of bacterial resistance to aminoglycosides and that the information may be used as a parameter to find new methods of treating diseases.

Keywords: *Cordia verbenacea* DC., antibacterial activity, MIC, aminoglycosides, modulating activity.

* Erivania Ferreira Alves. Faculdade Leão Sampaio – Avenida Leão Sampaio, Km 03 – Lagoa Seca, Juazeiro do Norte (CE), Brasil. 63.180-000.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como recursos terapêuticos no tratamento de enfermidades é uma prática medicinal antiga que existe desde o início das civilizações. E ainda hoje, mesmo com a gigantesca evolução da medicina alopática existem grandes obstáculos básicos de sua utilização pelas populações mais pobres, que vão desde a obtenção de determinados tipos de exames e medicamentos específicos até ao acesso a centros de atendimento hospitalares⁽¹⁾.

As observações populares são utilizadas de forma significativa na divulgação dos possíveis usos terapêuticos das plantas medicinais, apesar de que na maioria das vezes não se sabe totalmente os seus constituintes químicos. Dessa forma, a prática do consumo de fitoterápicos ainda se mantém por todo o mundo, através de usuários de plantas medicinais, tornando válidas algumas especificações terapêuticas que foram sendo observadas durante séculos, e até hoje seguem sendo repassadas de geração a geração⁽²⁾.

A família Boraginaceae contém aproximadamente 100 gêneros, com mais de 2000 espécies distribuídas em todo planeta, dentre elas está *Cordia verbenacea* DC que é um arbusto existente ao longo de todo litoral Brasileiro, sendo também uma planta comum na floresta tropical Atlântica⁽³⁾. *Cordia verbenacea* DC, conhecida popularmente como “erva baleeira” é uma das espécies vegetais na qual se busca extrair produtos visando à produção de fitoterápicos a partir de suas folhas, tendo em vista que já na medicina popular a *Cordia verbenacea* é utilizada como antiinflamatório e analgésico, onde através de estudos farmacológicos realizados foram confirmados o seu potencial antiinflamatório⁽⁴⁾ e seu potencial antimicrobiano^{(5), (6), (7)}.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material bacteriano

As linhagens bacterianas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC25923 e SA358), *Escherichia coli* (ATCC10536 e EC27) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442 e PA03) e. Todas as linhagens foram mantidas em meio de cultura *Heart Infusion Agar* (HIA) a 37°C.

Material vegetal

Folhas de *Cordia verbenacea* DC foram coletadas no município de Crato, Ceará, Brasil. O material vegetal foi identificado e uma exsicata foi depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará – UFC, sob N° 044171.

Preparação do extrato, fração e solução de teste antibacteriano

O interesse na pesquisa por plantas medicinais vem crescendo bastante entre os diversos grupos de pesquisadores por existir uma grande procura por novos fitoterápicos partindo do conhecimento popular e aplicados em experimentos financiados a empresas farmacêuticas na busca do desenvolvimento de novos componentes que tenham ações farmacológicas. Espera-se que futuramente elas podem ser a cura e/ou fazerem parte do tratamento para diversas enfermidades^{(8), (9); (10); (11), (12)}. Além disso, com o crescimento e disseminação de microrganismos resistentes, vários extratos de vegetais foram e serão testados com a finalidade de busca por novos agentes antimicrobianos capazes de participarem no combate ou controle desses tipos de microrganismos⁽¹³⁾.

Bactérias *Staphylococcus aureus* é uma das causas principais de infecções purulentas como: furúnculo, carbúnculo, além de outras infecções como miocardites, pneumonia, meningites. *Escherichia coli* é uma espécie bacteriana Gram negativa típica do sistema gastrointestinal humano, é umas das principais responsáveis por causar infecções nas vias urinárias e de doenças diarreicas que podem se constituir em fase aguda ou crônica^{(14); (15)}. *Pseudomonas aeruginosa* causa principalmente infecções hospitalares em indivíduos imunocompetentes, como: peritonites, bacterimias, infecções do trato urinário e de cirurgias⁽¹⁶⁾.

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de identificar as principais classes de metabólitos secundários por meio da prospecção fitoquímica e avaliar o efeito antibacteriano de modulador da resistência bacteriana à aminoglicosídeo da Fração Hexânica do Extrato Hexânico de *Cordia verbenacea* (HFHECV) frente à linhagens bacterianas padrões e multirresistentes.

Para preparação dos extratos, foram coletadas folhas que passaram pelo processo de trituração tendo aumentada sua superfície de contato e em seguida acondicionada em recipiente com o solvente em volume suficiente para submergir todo material vegetal, permanecendo assim por 72h. Após esse período, o eluente foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos e concentrado em condensador rotativo a vácuo (model Q-344B – Quimis, Brazil) e banho maria (model Q-214M2 – Quimis, Brazil). O extrato obtido foi misturado a sílica onde em seguida submetido ao processo de filtração à vácuo para obtenção da fração. Para os testes de microdiluição foram utilizadas soluções preparadas a partir da fração sob uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido), em seguida diluídos com água destilada para uma concentração de 1024 µg/mL.

Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos foram realizados para detectar a presença de heterosídeos, saponinas, taninos, flavonóides, esteróides, triterpenos, cumarinas, quinonas,

ácidos orgânicos e de alcalóides que foram realizados seguindo o método descrito por ⁽¹⁷⁾. Os testes se baseiam na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

Teste de atividade antibacteriana e moduladora da resistência à aminoglicosídeo

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi determinada a partir de microdiluições em caldo, utilizando-se um inóculo de 100µl/mL de cada linhagem suspensas em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI líquido) obtendo uma concentração final de 10⁵ UFC/mL. Em placas de microdiluição com 96 poços foram distribuídos 100µl em cada poço, promovendo diluições em séries 1:1 da solução de teste, promovendo concentrações que variaram entre 512-8µL. Para a obtenção dos controles foram utilizados os antibióticos: amicacina, neomicina e gentamicina. As placas foram todas incubadas por 16-24h à 37°C. A CIM foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano, que foi realizado em triplicata.

Na avaliação da ação moduladora da resistência bacteriana em relação aos antibióticos, foi utilizada a metodologia de microdiluição descrita no parágrafo anterior e adaptada, onde o a solução preparada com a HFHECV em concentração sub-inibitória combinado à aminoglicosídeos. A atividade moduladora por determinada pela CIM dos aminoglicosídeos, onde todas as placas foram incubadas por 16-24h à 37°C, que foi realizado em triplicata, e em seguida realizada à análise estatística ANOVA em software GraphPad Prism 6.0. ⁽¹⁸⁾.

RESULTADOS

A prospecção fitoquímica foi realizada para identificar as classes de metabólicos secundários e em seguida foi elaborada a tabela 1 onde verificamos presença de diversos compostos bioativos na fração do extrato avaliado, como: Tanino, Flavonas, Flavonóis, Xantonas, Flavononóis, Leucoantocianidina, Catequinas e Terpenos.

Tabela 1. Prospecção Fitoquímica da fração hexânica no extrato hexânico de *Cordia Verbenacea DC.*

Produto Natural																
	Fenóis	Taninos Pirogálicos	Tanino Condensados	Antocianinas	Antocianidinas	Flavonas	Flavonóis	Xantonas	Chalconas	Auronas	Flavononóis	Leucoantocianidinas	Catequinas	Flavononas	Alcalóides	Terpenos
HFHECV	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+

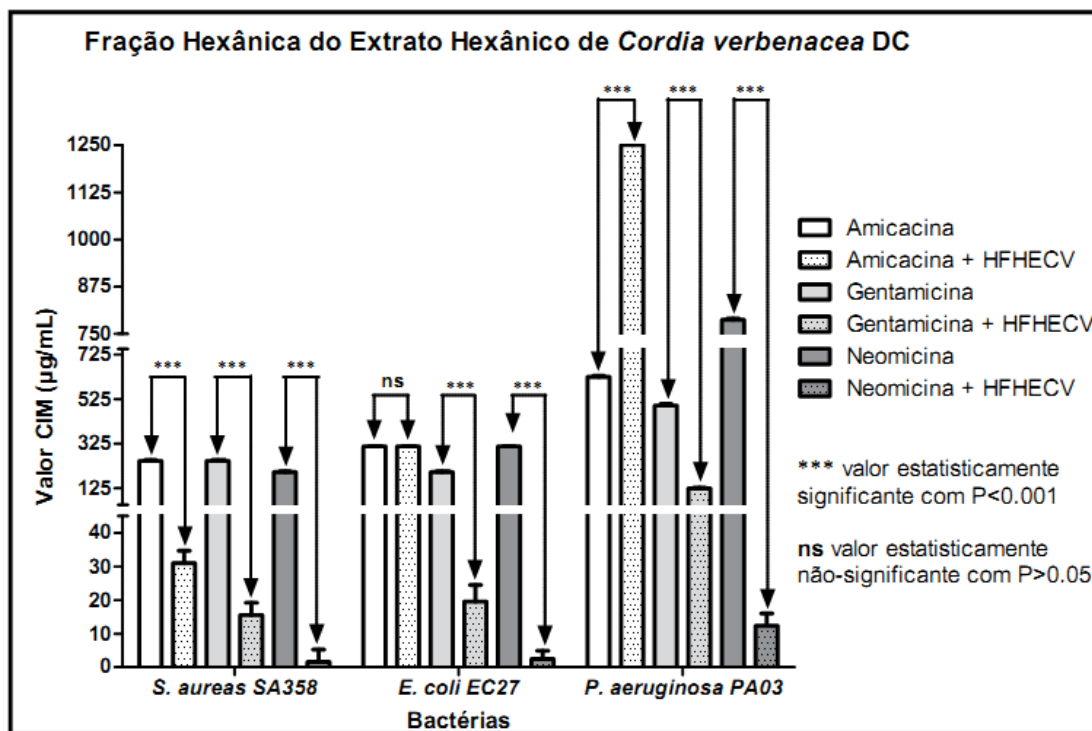
(+) presença; (-) ausência. HFHECV (Fração Hexânica do Extrato Hexânico de *Cordia verbenacea DC.*

Para os testes da atividade antibacteriana do HFHECV foi determinado um valor de CIM ≥1024 µg/mL, para todas as linhagens bacterianas testadas (ATCC e multirresistentes, Gram positiva e negativa). Sendo o valor considerado significativo clinicamente para uma CIM de ≤ 256 µg/mL.

O gráfico 1 mostra a interferência da HFHECV sobre a atividade dos aminoglicosídeos, demonstrando que houve

uma redução da concentração de antibiótico quando combinado com HFHECV em concentração sub-inibitória frente as linhagens bacterianas testadas. Apenas frente a linhagem de *Escherichia coli* (EC27) e combinado com amicacina não houve modulação, mostrando indiferença onde a análise estatística demonstrou diferença não significativa.

Gráfico 1. Atividade moduladora da resistência bacteriana frente à aminoglicosídeos pela fração hexânica do extrato hexânico de *Cordia verbenacea* (HFHECV).



DISCUSSÃO

Compostos fenólicos, incluindo taninos e flavonóides, demonstraram o seu potencial terapêutico como anti-inflamatório, anti-fúngico, antimicrobianos, agentes antioxidantes e de cicatrização de feridas⁽¹⁹⁾.

Pesquisadores relataram sinergismo entre flavonóides e agentes antibacterianos convencionais contra linhagens bacterianas resistentes, e outros têm examinado se a atividade de flavonóides é bacteriostática ou bactericida⁽²⁰⁾.

O uso de extratos como agentes antimicrobianos apresenta um baixo risco de aumento da resistência microbiana a sua ação porque são misturas complexas, fazendo com que haja maiores dificuldades para adaptabilidade microbiana⁽²¹⁾.

As combinações de produtos naturais com aminoglicosídeos apresentam atividade relevante por ser uma alternativa promissora para a diminuição das CIMs dos antibióticos por minimizarem seus efeitos secundários e promovendo uma ação sinérgica, diminuindo assim a dose necessária para que se tenha um efeito terapêutico⁽²²⁾.

Os resultados mais favoráveis foram frente a *S. aureus* possivelmente por se tratar de linhagem Gram-

positiva diferentemente de *E. coli* e *P. aeruginosa* que são Gram-negativas. A diferença de sensibilidade dessas bactérias pode ter sido pela composição química de sua estrutura celular. A Gram-negativa mesmo tendo uma fina camada de peptidoglicano possui uma complexidade química e lipídica maior que a Gram-positiva⁽²³⁾.

CONCLUSÃO

Os resultados indicam que fração hexânica do extrato hexânico obtida de folhas de *Cordia verbenacea* não possuem atividade antibacteriana clinicamente relevante, porém quando combinado com um antibiótico para avaliação a interferência no perfil de resistência bacteriana à aminoglicosídeos, a fração demonstrou atividade sinérgica significativa estatisticamente com $P < 0,001$. Portanto, recomendamos testes químicos para elucidação mais detalhada da composição química, bem como testes a nível pré-clínico buscando demonstrar em outros sistemas e modelos experimentais se os resultados encontrados no trabalho se repetem, sendo os resultados obtidos até o momento promissores para combater a resistência antibacteriana e outras doenças.

REFERÊNCIAS

1. VALDIR FVJ, ANGELO CPM e MACIEL MA. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, p. 519-528, 2005.

2. MACIEL MAM, PINTO AC, VEIGA jr.VF, GRYNBERG NF, ECHEVARRIA A. 2002. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438,2002.

3. SERTIÉ JAA.; WOISKY RG; WIEZEL G; RODRIGUES M. Pharmacological assay of *Cordia*

- verbenacea V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, p. 338-344, 2005.
4. ROSA DD, BASSETO MA, FELICIANO F, NEVES MB e BALDIN ELL. Ocorrência de *Dictyla monotropidia* Stål (Hemiptera: Tingidae) em *Cordia verbenacea* Al. DC no Brasil. **Neotropical Entomology**, v.37, p. 236-238, 2008.
 5. VENTRELLA MA e MARINHO CR. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (*Boraginaceae*) leaves. **Revista Brasileira de Botânica** v.31, p. 457-467, 2008.
 6. MATIAS EFF, SANTOS KKA, ALMEIDA TS, COSTA JGM, COUTINHO HDM. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenacea* DC. **Acta Farmaceutica Bonaerense** v.29, p.1049-1052, 2010a.
 7. MATIAS EFF, SANTOS KKA, ALMEIDA TS, COSTA JGM, COUTINHO HDM. Atividade antibacteriana In vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, v.8, p. 294-298, 2010b.
 8. Barbosa-Filho JM, Nascimento-Júnior FA, Tomaz ACA, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 141-148, 2007
 9. Barbosa-Filho JM, Alencar AA, Nunes XP, Tomaz ACA, Sena-Filho JG, Athayde-Filho PF. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.135-154, 2008.
 10. Biavatti M; Marensi V, Leite SN, Reis A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.17, p. 640-653, 2007
 11. COUTINHO HDM, COSTA JGM, SIQUEIR Jr. JP, LIMA EO. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA strains. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 670-675, 2008.
 12. COUTINHO HDM, COSTA JGM, LIMA EO, FALCÃO-SILVA VS, SIQUEIRA-Jr JP. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v.54, p. 328-330, 2008.
 13. PENHA DACD, HASHIMOTO ÉT, SILVA WRB, NABAS JMA, MOTIZUKI RS. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MIKANIA GLOMERATA E DA PRÓPOLIS UTILIZADOS NO LABORATÓRIO DE FITOTERÁPICOS DA FAI. **Revista OMNIA Saúde**, v.5, p. 23-28, 2011.
 14. BROOKS GF, CARROLL KC, BUTEL JS, MORSE SA. **Jawetz, Melnick e Adelberg: Microbiologia médica**. Ed. McGraw-Hill interamericana do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, Brasil, 2009.
 15. CUNHA FAB, MATIAS EFF, BRITO SV, FERREIRA FS, BRAGA JMA, COSTA JGM, COUTINHO HDM. Phytochemical screening, antibacterial activity and in vitro interactions between *Costus cf. arabicus* L. with UV-A and aminoglycosides. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v.26, p. 380-386, 2012.
 16. FERREIRA H, LALA ERP. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia** v.2, p. 44-50, 2010.
 17. MATOS, FJA. . **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.
 18. MATIAS EFF, ALVES EF, SANTOS BS, SOUZA CES, FERREIRA JVA, LAVOR AKLS, FIGUEREDO FG, LIMA LF, SANTOS FAV, PEIXOTO FSN, COLARES AV, BOLIGON AA, SARAIVA RA, ATHAYDE ML, ROCHA JBT, MENEZES IRA, COUTINHO HDM, COSTA JGM. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordia verbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p. 1-7, 2013.
 19. SANTOS SC, and MELLO JCP, Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. **Farmacognosia: Da Planta ao medicamento**. p.527-554, 2004.
 20. CUSHNIE TPT, LAMB AJ. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p. 243-248, 2005.
 21. DAFERERA DJ, ZIOGAS BN, POLISSIOU MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensi*. **Journal of Crop Protection** v.22, p. 39-44, 2003.
 22. FIGUEREDO FG, FERREIRA EO, LUCENA BFF, TORRES CMG, LUCETTI DL, LUCETTI ECP, SILVA JMFL, SANTOS FAV, MEDEIROS CR, OLIVEIRA GMM, COLARE AV, COSTA JGM, COUTINHO HDM, MENEZES IRA, SILVA JCF, KERNTOPF MR, FIGUEIREDO PRL, MATIAS EFF. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International** v.2013, 2012.

23. RODRIGUES FFG, OLIVEIRA LGS, RODRIGUES FGF, SARAIVA ME , ALMEIDA SCX ,CABRAL MES , CAMPOS AR, COSTA JGM.. *Chemical composition*, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v.4, p.161-5, 2012.