

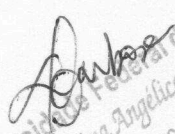
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividade antimicrobiana do extrato vegetal *Cotyledon*

***orbiculata* L.**


Universidade Federal de Uberlândia
Prof.^a Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Rosângela Souza Borges

Uberlândia – MG

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividade antimicrobiana do extrato vegetal *Cotyledon*

***orbiculata* L.**

Rosângela Souza Borges

**Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.**

Uberlândia – MG

2002

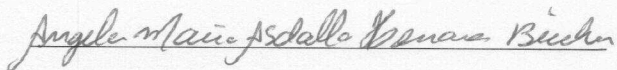
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Atividade antimicrobiana do extrato vegetal *Cotyledon orbiculata* L.

Rosângela Souza Borges

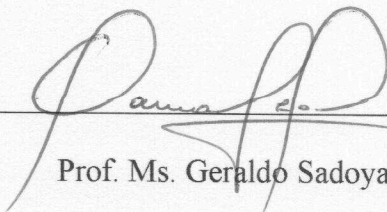
Aprovada pela Banca Examinadora em 23/04/2002

Nota 100,00



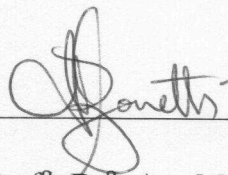
Profª. Ângela Maria A.H. Beicher

Orientadora



Prof. Ms. Geraldo Sadoyama

Co-orientador



Profª. Drª. Ana Maria Bonetti

Co-orientadora

Uberlândia, 23 de abril de 2002

A Lição do Rio

O rio corre sozinho.
Vai seguindo seu caminho.
Não necessita ser empurrado.
Pára um pouquinho no remanso.
Apressa-se nas cachoeiras.
Desliza de mansinho nas baixadas.
Precipita-se nas cascatas.
Mas, no meio de tudo isso, vai seguindo seu caminho.
Sabe que há um ponto de chegada.
Sabe que seu destino é para a frente.
O rio não sabe recuar.
Seu caminho é seguir em frente.
É vitorioso. Abraçando outros rios, vai chegando ao mar.
O mar é sua realização.
É chegar ao ponto final.
É Ter feito a caminhada.
É Ter realizado totalmente seu destino.
A vida deve ser levada do jeito do rio.
Deixar que corra como deve correr.
Sem apressar e sem represar.
Sem medo da calmaria e sem evitar as cachoeiras.
Correr do jeito rio, na liberdade do leito da vida,
Sabendo que há um pouco de chegada.
A vida é como o rio.
Por que apressar?
Por que correr se não há necessidade?
Porque empurrar a vida ?
Por que chegar antes de se partir?
Toda natureza não tem pressa.
Vai seguindo seu caminho.
Assim é a árvore, assim são os animais.
Tudo o que é apressado perde o gosto e o sentido.
A fruta forçada a amadurece antes do tempo e perde o gosto.
Tudo tem seu ritmo.
Tudo tem seu tempo.
E então, por que apressar a vida da gente?
Desejo ser um rio.
Livre dos empurrões dos outros e dos meus próprios.
Livre das poluições alheias e das minhas.
Rio original, limpo e livre.
Rio que escolheu se próprio caminho.
Rio que sabe que tem ponto de chegada.
Sabe que o tempo não interessa.
Não interessa ter nascido a mil ou a um quilômetro do mar.
Importante é chegar ao mar.
Importante é dizer: "cheguei".
E porque cheguei, estou realizado.

(AUTOR DESCONHECIDO)

Dedicatória

Ao meu esposo Marcelo, por sua dedicação ao meu lado, pela confiança e compreensão constante, sem os quais não seria possível a realização desse trabalho.

Aos meus filhos, Lucas e Lorena que tantas vezes ao longo da minha formação foram privados da minha convivência, pelo carinho e compreensão, que sempre dedicaram-me.

Aos meus pais, minha irmã, meus irmãos, em especial ao meu querido papai que com seu positivismo e coragem que alimentaram a minha vida dedico também essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo.

Agradeço a todos que me apoiaram durante toda minha vida, principalmente proporcionando as condições para a realização deste trabalho, meus melhores e mais sinceros agradecimentos. Em especial:

Ao Professor Mestre Geraldo Sadoyama Leal, responsável maior pela minha formação científica, pela amizade paciência, dedicação, responsabilidade e ajuda inestimável na árdua trajetória de se aceitar meus limites e redescobrir possibilidades, minha eterna gratidão.

A Professora Ângela Maria A. H. Beicher, pelo estímulo e apoio fundamental para a conclusão deste trabalho.

A Professora Dr.^a Ana Maria Bonetti, que muito contribuiu na minha formação com seu entusiasmo pela pesquisa em genética.

A Professora mestre, ex-coordenadora do curso de ciências Biológicas, Ana Maria Coelho Carvalho, que com suas atividades e atos solidários tornou possível à continuidade da minha graduação.

A Professora Dr.^a Cecília Lomônaco de Paula, pela alegria e altruísmo a mim repassados.

Ao inesquecível Professor Dr.^o Ignácio Machado Brito, vida intrépida, sabedoria invejável, o meu eterno carinho e imensa saudade ao dizer – Obrigada Professor!

Ao meu amigo Bacharel Alexandre Paulo Machado, que diretamente acompanhou meu trabalho, pela sua coragem, dedicação e confiança, minha eterna gratidão.

Ao meu colega Flávio Rodrigues Oliveira, companheiro de graduação, pela contribuição e apoio neste trabalho.

A todos os professores funcionários e técnicos do Instituto de Biologia da UFU, que participaram da minha formação acadêmica.

A Eliana Maria de Araújo, colega, que com altruísmo teve sua colaboração neste trabalho.

À minha família, em especial, meu querido esposo e filhos que souberam entender e respeitar o meu envolvimento neste trabalho.

Enfim, a todos de que de maneira direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, nossos sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	xix
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS GERAIS	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIAL E MÉTODOS	18
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo testar as atividades do extrato vegetal *Cotyledon orbiculata* L. frente as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e Gram negativos *Eschechia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium gordonae* e fungos leveduriformes, (duas amostras de *C. albicans*) determinando a Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bactericida e Fungicida (CBM / CFM) em extrato alcoólico e aquoso de *C. orbiculata*. As sete amostras testadas foram padronizadas na escala de 0,5 Mac Farland ($2,0 \times 10^8$ UFC/ml) inoculadas em tubos contendo 3ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI) em concentrações crescentes do extrato (50 μg – 1000 $\mu\text{g/ml}$). O extrato alcoólico não apresentou atividades antimicrobianas. Os testes de sensibilidade com o extrato aquoso demonstraram atividade antimicrobiana frente às bactérias citadas e nenhuma atividade contra micobactérias e fungos leveduriformes. A amostra de *S. aureus* apresentou uma CMI de 500 $\mu\text{g/ml}$ e uma CBM > 1000 $\mu\text{g/ml}$. A amostra de *E. faecalis* foi sensível a

todas concentrações testadas, no entanto, apresentou CBM > 1000 µg/ml. *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentaram CMI de 500 µg/ml e CBM > 1000 µg/ml.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana; Extrato vegetal; *Cotyledon orbiculata* L.

INTRODUÇÃO

A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928 e passou a ser utilizada na clínica médica a partir da década de 40. Após a sua introdução na terapêutica, achou-se que entraríamos na era do declínio das doenças infecciosas, com as bactérias sobrepujadas pelos antibióticos e as viroses, por vacinas. O que podemos observar hoje é que, na verdade, isto não aconteceu pois vários patógenos que eram comuns na era pré-antibiótica, entre eles, o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhi* e *Mycobacterium tuberculosis* vêm se restabelecendo, novamente, como patógenos hospitalares e comunitários. Nós subestimamos a capacidade dos microrganismos de apresentarem novas informações genéticas que pudessem restabelecê-los em ambientes hostis, onde há forte pressão seletiva por parte do uso de antimicrobianos, tal como no ambiente hospitalar (MacCormick, 1998).

O bacilo *Yersinia pestis*, causador da peste bubônica (praga) resistente a múltiplos antimicrobianos, foi isolado, recentemente, de um garoto de 16 anos em Madagascar. Focos da doença causadas por *Y. pestis* tem sido relatados, nos últimos anos, na Ásia, África,

América do Norte e do Sul. A maioria das amostras tem demonstrado a presença de um plasmídeo contendo informação genética para resistência aos antimicrobianos recomendados no tratamento desta doença como: ampicilina, cloranfenicol, canamicina, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina. Provavelmente, esse plasmídeo carregando estes genes de resistência veio de uma bactéria da família Enterobacteriaceae. (Galimand et al., 1997).

Isolados clínicos de *Streptococcus pneumoniae*, altamente resistentes à penicilina e falha clínica no tratamento com altas doses de penicilina, têm sido relatados por todo globo. Além disso, a relação entre o tratamento prévio com penicilina e o aumento da colonização com cepas penicilina-resistentes de *S. pneumoniae* tem sido demonstrados. Pacientes imunocomprometidos, como os HIV positivos, têm uma maior probabilidade de carrear os pneumococos e de terem pneumonia por amostras multiresistentes destes microrganismos. (Dagan et al., 1996).

O MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à metilicilina) apresenta resistência a todos os antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactamas), quinolonas, aminoglicosídeos, rifamicinas, tetraciclina, cloranfenicol. A frequência do isolamento de amostras de MRSA, entre todos os isolados de *S. aureus*, é superior a 50% na maioria dos hospitais brasileiros (Sadoyama & Gontijo Filho, 2000). O tratamento de infecções graves por esse microrganismo multiresistente reside apenas nos antimicrobianos do grupo dos glicopeptídeos, vancomicina e teicoplanina. O *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina (VRSA) foi relatado pela primeira vez em 1997, no Japão. Após o relato no Japão, subsequentes isolados, com similar padrão de resistência, foram isolados nos EUA. O uso indiscriminado de vancomicina em algumas partes do mundo poderá criar uma situação caótica devido à pressão seletiva exercida pelo antimicrobiano e o

subsequente aparecimento de amostras resistentes a ele tornando, uma infecção grave causada por uma amostra de VRSA, intratável (CDC, 1997a).

A tuberculose ainda representa, entre as doenças infecciosas, uma importante causa da morbidade e mortalidade, principalmente, em certos grupos populacionais que apresentam maior risco de tuberculose por terem maior probabilidade de exposição e/ou infecção ou maior suscetibilidade ao desenvolvimento da doença ativa, como no caso de pacientes infectados pelo HIV, que é o maior fator de risco conhecido para a progressão de infecção latente à doença ativa. Os maiores obstáculos ao tratamento e controle da tuberculose são o aparecimento de linhagens de *Mycobacterium tuberculosis* multiresistentes e a epidemia de doenças como a AIDS. Além disso, a dificuldade de isolar o microrganismo e realizar testes de resistência aos antimicrobianos em muitas partes do mundo, aumenta o risco de falha no tratamento e, conseqüentemente, o espalhamento de amostras multiresistentes. (Blasquez et al., 1997).

O *Vibrio cholerae* 0139, e a *Escherichia coli* 0157-H7 são patógenos que têm causado grandes surtos devido à contaminação dos reservatórios de água e são causa substancial de diarreias em crianças, com subsequente perda de peso, muitas ocasionando mortes devido às condições de subnutrição de muitas crianças, principalmente, em países em desenvolvimento (CDC, 1997b).

Em partes da Ásia, cerca de 30 - 40% das bacteremias são devido à *Salmonella typhi* e metade dessas amostras são multiresistentes. O isolamento de amostras de *Shigella*, causadora de disenteria bacilar em humanos, resistentes a múltiplos antimicrobianos vem aumentando em muitas partes do mundo (Jensen et al., 1996; Rowe et al, 1997).

Algumas doenças infecciosas podem ser causadas por fungos. Os fungos são ubiqüitários na natureza e, normalmente, são saprófitas de vida livre e são, primariamente,

patógenos oportunistas. Eles podem causar doenças como alergias, toxemias causadas por exotoxinas que além de tóxicas são oncogênicas e micoses (crescimento dos fungos nos tecidos). A quimioterapia contra as micoses sistêmicas é muito difícil, pois a maioria dos antimicrobianos que inibem os fungos são tóxicos às células eucarióticas do hospedeiro. (Balows et al, 1999).

A utilização de plantas medicinais na prevenção e cura de moléstias está condicionada a um processo de experimentação que vem se desenvolvendo desde tempos remotos, constituindo a base da fitoterapia, que vem sendo retomada pela medicina, que procura aproveitar as suas práticas dando-lhes um respaldo científico, integrando-as num conjunto de princípios que visam, mais do que curar algumas doenças, restituir o homem à vida natural. O potencial químico dos organismos vivos estimula o interesse das indústrias farmacêuticas, como fonte de fármacos. Numerosas substâncias de origem vegetal fazem parte do arsenal terapêutico da medicina do século XX. A medicina alopática em todo mundo utiliza 119 drogas, com estruturas definidas que são extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores, dos quais podemos citar o taxol, artemísia, efedrina, rutina, papaína, reserpina, ergovina, digitoxina, vincalublastina, vincristina, vincamicina, atropina, etc. Sabendo-se que a diversidade da flora brasileira é considerada a maior do planeta, a possibilidade de obter substâncias com atividades biológicas significativas é bem relevante. (Braz Filho, 1994; Nascimento et al., 1998).

Os estudos de extratos vegetais podem incrementar novas táticas de ação contra agentes infecciosos pois, substâncias secundárias, oriundas dos vegetais, podem possuir propriedades antimicrobianas de largo espectro, porém, muitos produtos secundários das plantas podem ser tóxicos para animais, devido as suas atividades hemolíticas, como por exemplo, as saponinas. A demonstração primária de que um extrato vegetal não possui tais atividades hemolíticas amplia as chances de um futuro uso farmacêutico (Who, 1998).

Existem vários relatos populares sobre o uso terapêutico do extrato vegetal de *Cotyledon orbiculata* L.. Estes relatos indicaram que a mesma possuía atividades terapêuticas para catarata, úlcera gástrica, diarreias, oncomicoses, infecções de ouvido, verrugas e efeitos cicatrizantes, porém, não há comprovações científicas desses efeitos.

Uma rigorosa avaliação bibliográfica mostrou a ausência de investigação fitoquímica com esta planta, apesar do seu uso popular. Este trabalho teve por meta testar *in vitro* as propriedades antimicrobianas da *Cotyledon orbiculata* L.

Características da planta estudada

- Nome Científico: *Cotyledon orbiculata* L.
- Nome popular: bálsamo, carnosa, bálsamo gordo, etc;
- Família: Crassulaceae;
- Origem: África do Sul e Ásia;
- Tipo de metabolismo: CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas);
- Descrição: Planta herbácea, folhas suculentas; flores amarelas, atinge 30 a 50 cm de altura. Sabor levemente ácido;
- Constituinte químico principal: glicosídeos cardiotônicos;
- Uso popular: úlcera gástrica, diarreias, infecções de ouvido, micoses, verrugas, catarata e efeito cicatrizante;
- Parte da planta usada: folhas frescas.
- Como é administrada: uso ao natural, sob a forma de salada, sem tempero (inflamações gastro-intestinais) ou folhas trituradas, utilizando-se o caldo;
 - ❖ Tritura-se as folhas suculentas e utiliza-se o caldo.

- Outros usos: planta ornamental.
- Toxicologia: sem referências.
- Cultivo: multiplica-se por estaquia. O plantio no local definitivo é feito no espaçamento de 40 x 50 cm. Esta planta tem condições mais favoráveis ao seu desenvolvimento com luz plena e ambiente pouco úmido (Pio Correa, 1978).

OBJETIVOS GERAIS

Este estudo teve como objetivo geral testar a atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Cotyledon orbiculata* L.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Este estudo teve como objetivos específicos (1) determinar a atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Cotyledon orbiculata* L. frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e Fungos leveduriformes; (2) determinar a concentração mínima inibitória deste extrato vegetal; (3) bem como sua concentração mínima bactericida e fungicida.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Preparo do Extrato

O extrato vegetal bruto foi obtido por meio de extração em solução aquosa e alcoólica (70%) a partir de folhas maceradas de *Cotyledon orbiculata* L., na proporção 1:10 (p:v) em água destilada com agitação constante por quatro horas à temperatura de 25°C, seguida de uma filtração em membrana Milipore.

Concentração do Extrato Bruto

Os solventes foram evaporados em um liofilizador para que o extrato bruto ficasse concentrado.

Amostras Bacterianas e de Fungos Leveduriformes.

Os espécimes clínicos (sangue, pus, escarros, etc) foram obtidos de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – HC/UFU.

Identificação dos Cocos Gram Positivos

As amostras foram semeadas em *Agar Sangue* (análise da morfologia colonial) e *Agar Manitol Salgado*. A identificação dos gêneros estafilococos e estreptococos foi feita pela morfologia colonial, produção de catalase, produção de hemólise (α , β) e pela coloração de Gram. O *Staphylococcus aureus* foi caracterizado pela da atividade coagulase, DNase e fermentação do manitol eram meio de Manitol salgado.

Identificação dos Bacilos Gram Negativos

As amostras obtidas foram inoculadas em placas de *Agar MacConkey* e divididas quanto ao metabolismo fermentativo de lactose ou não.

Os isolados foram triados como apresentando metabolismo: fermentativo; oxidativo; não fermentativo e não oxidativo, pelo teste de Oxidação/Fermentação (OF).

No tocante aos dois últimos grupos foi utilizado, também, o teste da citocromo oxidase para a caracterização das amostras Gram-negativas como as do gênero *Pseudomonas* (oxidase positiva) e família Enterobacteriaceae (oxidase negativa).

A identificação dos membros da família Enterobacteriaceae (grupo fermentativo) em gêneros/ espécies foi realizada através dos seguintes testes: produção de H₂S, prova de Voges

- Proskauer (VP), Ornitina, Lisina Desaminase (LIA), lisina descarboxilase (LDC), hidrólise de uréia, teste do indol, lactose e citrato.

Identificação dos Fungos Leveduriformes

As células leveduriformes foram identificadas conforme morfologia (células fúngicas unicelulares apresentando “buds”), características frente à coloração de Gram (Células Gram-positivas) e pelo teste de tubo germinativo em plasma humano para diferenciar *Candida albicans* das demais espécies de leveduras.

Determinação da Concentração Mínima Inibitória

Para se determinar a Concentração Mínima Inibitória, 5 µL de uma suspensão de amostras padronizadas na escala de 0,5 de Mac Farland ($1,0 - 2,0 \times 10^8$ UFC/mL) foram inoculadas em tubos contendo 3 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) em concentrações crescentes do extrato (50 - 200 - 500 - 1000 µg/ml) e incubadas a 37°C por 24 horas (NCCLS, 1997). A amostra de micobactérias foi incubada por uma semana. Foi utilizado como Controle para o teste de suscetibilidade, a amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Sendo todos os testes realizados em duplicata.

Determinação da Concentração Mínima Bactericida e Fungicida

Após a determinação da Concentração Mínima Inibitória, os tubos que não apresentaram turvação, foram subcultivados em placas contendo meio Mueller-Hinton, livre do extrato e incubadas a 37°C por 24 horas.

As Concentrações Mínima Bactericida e Mínima Fungicida foram determinadas por meio do crescimento de uma única colônia na placa de Mueller-Hinton equivalente a concentração do extrato na série da Concentração Mínima Inibitória., sendo também realizados em duplicata.

RESULTADOS

Nesse estudo foram incluídas cinco amostras bacterianas e duas de fungos leveduriformes cujas características se encontram na Tabela 1, que foram testados frente aos extratos aquoso e alcoólico de *Cotyledon orbiculata L.*

O extrato alcoólico não apresentou atividades, antimicrobianas, ou seja, as bactérias que foram incubadas na presença desse extrato apresentaram Concentração Mínima Inibitória de $\geq 1000 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 2), o mesmo extrato não demonstrou atividades similar contra micobactéria e fungos leveduriformes (Tabela 3). A Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima para todos microrganismos testados foram maiores que $1000 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 2 e 3).

Tabela (1) – Características das amostras bacterianas e de fungos leveduriformes testados frente ao extrato aquoso de *Cotyledon orbiculata*.

MICROORGANISMOS	ESPÉCIE	ESPÉCIME CLÍNICO
		ORIGEM
Bactérias Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ferida cirúrgica
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Fezes
Bactérias Gram -	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sangue
Micobactérias	<i>Mycobacterium gordonae</i>	Água
Fungos Leveduriformes	<i>Cândida albicans</i>	Endoscópio
	<i>Cândida albicans</i>	Endoscópio

Tabela (2) – Determinação da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Bactericida Mínima do Extrato Alcoólico de *Cotyledon orbiculata* frente à bactérias Gram Positiva e Gram Negativa.

MICROORGANISMOS	CMI*				CBM**
	50 µg	200 µg	500 µg	1000 µg	> 1000 µg
Gram +					
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+
Gram -					
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+

LEGENDA: (+) Crescimento; (*) Concentração Mínima Inibitória; (**) Concentração Bactericida Mínima.

Tabela (3) – Determinação da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima do extrato alcoólico de *Cotyledon orbiculata* frente a Micobácteria e Fungos Leviduriformes.

MICROORGANISMOS	*CMI					**CBM
						***CFM
	50 µg	200 µg	500 µg	1000 µg	> 1000 µg	
Micobactérias						
<i>Mycobacterium gordonae</i>	+	+	+	+	+	+
Fungos Leviduriformes						
<i>Cândida albicans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Cândida albicans</i>	+	+	+	+	+	+

LEGENDA: (+) Crescimento; (*) Concentração Mínima Inibitória; (**) Concentração Bactericida Mínima; (***) Concentração Fungicida Mínima.

Os testes de sensibilidade com o extrato aquoso demonstraram atividade antimicrobiana frente as bactérias Gram +, Gram – e nenhuma atividade contra Micobactérias e fungos leveduriformes (Tabelas 4 e 5). A amostra de *Staphylococcus aureus* apresentou uma Concentração Mínima Inibitória de 500 µg/ml e uma Concentração Bactericida Mínima > 1000 µg/ml. Já a amostra de *Enterococcus faecalis* foi sensível a todas concentrações testadas (50 – 1000 µg/ml) no entanto, apresentou Concentração Bactericida Mínima > 1000 µg/ml. Os microrganismos Gram –, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentaram Concentração Mínima Inibitória, de 500 µg/ml e Concentração Bactericida Mínima > 1000 µg/ml.

Na Tabela 5 encontraram-se os resultados da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Bactericida Mínima do extrato aquoso, mostrando que não ocorreu atividade antimicrobiana contra micobactéria, cuja Concentração Mínima Inibitória e Bactericida Mínima foi $\geq 1000\mu\text{g/ml}$. Esse mesmo extrato não apresentou atividade antimicrobiana nas amostras de *Candida albicans* testadas (Concentração Mínima Inibitória $\geq 1000\mu\text{g/ml}$ e Concentração Fungicida Mínima $> 1000\mu\text{g/ml}$).

Tabela (4) – Determinação da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Bactericida Mínima do extrato aquoso de *Cotyledon orbiculata* frente à bactérias Gram positivas e Gram negativas.

MICRORGANISMOS	CMI*				CBM**
	50 μg	200 μg	500 μg	1000 μg	> 1000 μg
Gram +					
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-	-	+
Gram -					
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	-	-	+

LEGENDA: (+) Crescimento; (-) Não Crescimento; (*) Concentração Mínima Inibitória; (**) Concentração Bactericida Mínima.

Tabela (5) – Determinação da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Bactericida Mínima e Concentração Fungicida Mínima do extrato aquoso de *Cotyledon orbiculata* frente a Micobácteria e Fungos Leviduriformes.

MICROORGANISMOS	*CMI					**CBM
	50 µg	200 µg	500 µg	1000 µg	> 1000 µg	***CFM
Micobactérias						
<i>Mycobacterium gordonae</i>	+	+	+	+	+	+
Fungos Leviduriformes						
<i>Cândida albicans</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Cândida albicans</i>	+	+	+	+	+	+

LEGENDA: (+) Crescimento; (-) Não Crescimento; (*) Concentração Mínima Inibitória; (**) Concentração Bactericida Mínima; (***) Concentração Fungicida Mínima.

DISCUSSÃO

As doenças infecciosas são a causa de morte de cerca de 50.000 pessoas por dia no mundo. A emergência de bactérias patogênicas multirresistentes de origem humana e de animais têm sido relatadas em todos os continentes. O uso indiscriminado de antimicrobianos vem contribuindo bastante para o aparecimento dessas amostras resistentes. Além do problema de aparecimento de resistência, os efeitos colaterais de alguns desses antimicrobianos têm contribuído para aumentar o interesse na pesquisa de drogas antimicrobianas originárias de plantas com uma menor toxicidade (Ahmad, Beg, 2001). É esperado que os extratos originários de plantas apresentem novos sítios-alvo, além daqueles conhecidos tradicionalmente, que são responsáveis pela atividade antimicrobiana dos antibióticos e quimioterápicos, ou seja, antimicrobianos que atuam ao nível de parede celular, membrana citoplasmática, síntese protéica, metabólitos intermediários e ácidos nucleicos. Entretanto, existe muito pouca informação disponível sobre a atividade antimicrobiana de plantas medicinais (Hasegawa et al., 1995; Lee et al, 1998).

Estudos tem demonstrado que extratos alcoólicos, hidroalcoólicos e aquosos são solventes capazes de extrair substâncias antimicrobiologicamente ativas (Tomassini et al, 1997; Ahmad et al, 1998). Em nossa investigação, o extrato aquoso apresentou boa atividade antimicrobiana, sendo que o mesmo não foi observado com o extrato etanólico.

Palombro & Semple (2001) estudando a atividade antibacteriana de extratos vegetais de algumas plantas utilizadas na medicina aborígene australiana, demonstraram que os extratos apresentavam uma maior atividade contra bactérias Gram-positivas. A maior resistência de bactérias Gram-negativas aos extratos de plantas têm sido demonstrado em outros estudos (Paz et al, 1995; Kudi et al, 1999) e foi, também, confirmada em nosso estudo, onde as duas bactérias Gram-negativas testadas apresentaram MICs ≥ 500 $\mu\text{g/mL}$. Estas observações são, provavelmente, devido à diferenças nas paredes celulares dessas bactérias. As bactérias Gram-negativas apresentam em sua parede, uma membrana externa que pode atuar como uma barreira para muitas substâncias ambientais, incluindo antimicrobianos e substâncias fitoterápicas (Tortora, 2001). Enquanto que as micobactérias apresentam uma grande quantidade de ácidos graxos e ceras (ésteres de ácidos graxos) na sua parede celular. A presença de grande quantidade de lipídio na parede celular pode dificultar a absorção de substâncias ambientais, tornando esses microrganismos mais resistentes à substâncias de caráter básico e ácido, como o hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, aos antissépticos e, também, podem explicar a maior resistência das micobactérias a muitos antimicrobianos e o mecanismo de atuação da isoniazida, que atua na síntese dos ácidos graxos (Trabulsi, 1999). Em nossa investigação, o extrato testado não apresentou nenhuma atividade contra este microrganismo.

Um estudo realizado na Argentina (Ferresin et al, 2001) mostrou que os extratos de algumas plantas medicinais, utilizadas na província de San Juan, não foram ativos contra

fungos leveduriformes (*Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*) e nem fungos filamentosos (*Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus*). No entanto, um estudo realizado no Brasil, conduzido por Magalhães et al (2001) analisando a atividade antifúngica de extratos vegetais de alecrim, boldo, arruda, camomila, demonstrou que as preparações brutas destes vegetais têm apresentado atividade contra fungos como, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra* e *Malassezia furfur*. Contrariamente ao estudo de Magalhães et al. 2001, as amostras de *Candida albicans* testadas em nosso estudo foram resistentes ($\geq 1000 \mu\text{g/mL}$) ao extrato arbóreo de *Cotyledon orbiculata*.

Estudos quimiotaxônicos na família *Crassulaceae* têm demonstrado que todos os gêneros desta família, incluindo *Cotyledon* sp., apresentam proantocianidinas (taninos condensados) e estéres de galoil, compostos que vem sendo utilizados na classificação e na determinação do parentesco entre os gêneros *Crassula* e *Cotyledon* dentro dessa família (Van Wyk & Winter, 1995). Outros estudos têm demonstrado a presença de glicosídeos cardiotônicos, substâncias que apresentam atividade analgésica, antiinflamatória, cicatrizante, digestiva e vermífuga, em *Cotyledon orbiculata*. No entanto, a ingestão de glicosídeos cardiotônicos em elevada quantidade pode causar intoxicação, principalmente, em animais como cabras e ovelhas. Os sintomas mais comuns são a fraqueza e convulsões, seguidas de paralisia (Tustin et al., 1984; Anderson et al., 1985).

Não há na literatura nacional e internacional, nenhum estudo científico demonstrando a atividade antimicrobiana do extrato de *Cotyledon orbiculata* frente à patógenos bacterianos, fúngicos ou viróticos, sendo que o nosso estudo é o primeiro a demonstrar a presença da atividade antimicrobiana do extrato vegetal bruto de *Cotyledon orbiculata*. Novas classes de possíveis agentes antimicrobianos podem ser descobertas a partir da análise dos compostos fitoquímicos desse vegetal.

CONCLUSÕES

- ✓ O extrato vegetal alcoólico de *Cotyledon orbiculata L.* não apresentou nenhuma atividade antibacteriana ou fúngica, nas condições em que foram testadas.
- ✓ O extrato vegetal aquoso apresentou um maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, nas condições que foram testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, I.; MAHRNOOD. Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**, 62 p. 183-193, 1998.
- ANDERSON L. A. P.; SCHULTZ R. A.; KELLERMAN T. S.; et al. Isolation and characterization of and some observations on poisoning by bufadienolides from *Collydon orbiculata* var *orbiculata* onderstepoort. **Jornal of veterinary Research**. 52: (1), p. 21-24, 1985.
- BALOWS A.; HAUSLER W. J.; TRUANT, J. P. **Manual Of Clinical Microbiology**, 7^a ed. ASM Press, 1999.
- BLASQUEZ J.; ESPINOSA L. M. L. E; SAMPER S.; MARTIN C.; et al. Genetic Characterization of multidrug - resistant Mycobacterium bovis strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus - positive patients. **J Clin Microbiol**, 35 : p. 1390 - 1393, 1997.
- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos Naturais,: Interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um paratubano. **Química Nova**. 17, 5, 405-445. 1994
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention: **Interim guidelines for prevention and control of Staphylococcal infection associated with reduced susceptibility to vancomycin**. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1997a, 46: 626-8, 635.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Outbreaks of Escherichia coli O157: H7 infection and cryptosporidiosis associated with drinking unpasteurized apple cider - Connecticut and New York, October 1996**. Jama 1997b, 277: 781 - 782.

DAGAN R.; MELAMED R.; MUALLEM M, et al. **Nasopharyngeal colonization in southern israel with antibiotic-resistant pneumococci during the first 2 years of life: relation to serotypes likely to be included in pneumococcal conjugate vaccines.** J Infect Dis 1996, 174: 1352-1355.

ENZO, A.; PALOMBO, A.; SUSAN, J. et al Antibacterial activity of traditional Australian Medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(2001) 151-157.

FERESIN, Gabriela, A., B., TAPIA, Alejandro, A, B, LÓPEZ, Sílvia N. C., SUSANA EGLY A., ZACCHINO C. Short communication Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentina. *Journal Of Ethnopharmacology*, 78 (2001) 103-107.

GALIMAND M, GUIYOULE A, GERBAUD G, RASOAMANANA B., CHANTEAU S, CARNIEL E, COURVALIN P. **Multidrug resistance in Yersinia pestis mediated by a transferable plasmid see comments).** N Engl J Med 1997, 337;667-680.

HASEGAWA, H., MATSUMYA, S., YAMASAK, K. Reversal of efflux mediated tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates by *Ginseng prosaponenins*. *Phytotherapy Research* 9(4), 260-263.

IQBAL, Ahmad, BEG, Arina Z., Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 74 (2001) 113-123.

- JENSEN G, WANDALL DA, GAARSLEV K, PANAVALAS S, GUTSCHIK E. **Antibiotic resistance in Shigella and Salmonella in a region of Lithuania.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996, 15: 872 – 876.
- KUDI, A. C., UMOH, J.U., EDURINE, L. O.,TEFU, J. Some Nigerian medicinal Plantas for antibacterial. Activity. *Journal of. Ethnopharmacology* 1999, 67, 225 – 228.
- LEE, C., KIM, H., MOON, K. H., SHUN, K. H. **Screening. And isolation of. Antibiotic resistance inhitors from herb.** Materials – resistance inhibition of volatile Components of Korean aromatic herbs. *Archives of Pharmaceutical Research* 1998, 21 (1), 62 – 66.
- MacCORMICK, JB. **Epidemiology of emerging/re-emerging antimicrobial-resistant bacterial pathogens.** Current Opinion in Microbiology 1998, 1:125-129.
- MAGALHÃES, L.G. **Atividade antifúngica de extratos vegetais diversos.** Anais do XXI Congresso de Microbiologia, Foz do Iguaçu 2001, p.219, MB076.
- NASCIMENTO MS, DANTAS S. L. L, AZEVEDO-XIMENES E. **Antibacterial activity of Spiggelia flemmingiana .** Fitoterapia, , 1998, LXIX, 3.
- PAZ, E. A., CERDEIROS, M. P., FERNANDEZ J. et al., Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 1995, 45, 67-70,
- PIO CORREA, M. **Dicionário das Plantas do Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas.** Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. IBDF, 1978.
- ROWE B, WARD LR, THRELFALL EJ. **Multidrug - resistance Salmonella typhi: a worldwide epidemic.** Clin Infect Dis 1997, 24 (Suppl 1 : 106 - 109).

SADOYAMA G, GONTIJO FILHO, P.P. Risk factors for Methicillin Resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. **Infection in a Brazilian University Hospital. The Brazilian Journal of Infections Diseases**, 2000, V.04, N.3, pág. 135 – 143.

TOMASSINI ET AL. Avaliação de atividade antimicrobiana do extrato vegetal de *Physalis angulata* L. **Anais do XIX Congresso de Microbiologia** 1997, p. 164, MB109.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C.L. CC., *microbiology: an introduction.*, San Francisco: Benjamin Cummings, 2001, p.88.

TRABULSI, L.R. *Microbiologia*. 3 ed. Editora Atheneu, Rio de Janeiro: 1999, p. 303-314.

TUSTIN RC, THORNTON DJ, KLEU CB. An outbreak of *Coltiledon orbiculata* L poisoning in a flock of angora goat rams. **Journal Of The South African Veterinary Association-tydskrif van die. Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging**. 1984, 55: (4) 181-184.

VAN WYK, Bem-Erik, , WINTER, Pieter J. D. *Biochemical Systematics and Ecology* 1995, Vol. 23 (3). 291-293.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials** 1998, p.41-43.