

Efeito antimicrobiano e modulador do extrato hidroalcoólico de *Genipa americana* (Jenipapo)

Antimicrobial effect and modulator of the hydroalcoholic extract of *Genipa americana* (Jenipapo)

Dárcio Luiz de Sousa Júnior, Ítalo Mykaell da Silva Benjamim, Luiz Eduardo Oliveira Teotônio, Filipe Joaquim Gonçalves, Carla Morgana Tôrres Salviano, Renata Correia Leandro, Maria Janice Pereira Lopes, Pedro Everson Alexandre de Aquino, Nadghia Figueiredo Leite

RESUMO

Genipa americana, pertencente à família Rubiaceae, árvore de grande porte que é encontrada em várias áreas do Brasil, popularmente conhecida como Jenipapeiro sendo utilizada para no combate à doenças hepáticas e inflamatórias, além de reduzir o colesterol. Este estudo tem como principal objetivo avaliar a prospecção fitoquímica, antibacteriana e modulatória do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Genipa americana* frente a cepas de bactérias padrões e multirresistentes. Para a análise da atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico, foi realizado o teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), e a modulação de antimicrobianos por meio de gentamicina, amicacina e clindamicina. Os resultados obtidos da CIM pelas bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* foram $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$. Na modulação modificação da concentração de dois antibióticos para cada cepa bacteriana. Assim, é fato rematar que este extrato tem notável atividade moduladora principalmente quando testados contra bactérias de interesse clínico como a *P. aeruginosa*, bactérias oportunista, ressaltando que deve-se ser realizados mais estudo sobre o potencial desta espécie, que possui compostos fitoquímicos importantes capazes de reduzir a resistência a antimicrobianos.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Modulação. *Genipa americana*.

ABSTRACT

Genipa americana, belonging to the family Rubiaceae, a large tree that is found in several areas of Brazil, popularly known as Jenipapeiro being used to combat liver and inflammatory diseases, and reduce cholesterol This study has as main objective to evaluate the phytochemical, antibacterial and modulatory prospection of the hydroalcoholic extract of the stem bark of *Genipa americana* against strains of standard and multiresistant bacteria. For the analysis of the antibacterial activity of the hydroalcoholic extract, the broth microdilution test was carried out to determine the minimum inhibitory concentration (MIC), and the antimicrobial modulation by means of gentamicin, amikacin and clindamycin. The results obtained from the MIC by the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were $\geq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$. In the modulation modulation of the concentration of two antibiotics for each bacterial strain. Thus, it is a fact to conclude that this extract has remarkable modulatory activity, especially when tested against bacteria of clinical interest, such as *P. aeruginosa*, opportunistic bacteria, stressing that more research should be done on the potential of this species, which has important phytochemical compounds capable to reduce antimicrobial resistance.

Keywords: Antimicrobials. Modulation. *Genipa americana*.

Como citar este artigo:

Júnior, D; Benjamim, I; Teotônio, L; Gonçalves, F; Salviano, C; Leandro, R; Lopes, M; Aquino, P; Leite, N. Efeito antimicrobiano e modulador do extrato hidroalcoólico de *Genipa americana* (Jenipapo) Revista Saúde (Sta. Maria). 2019; 45 (1).

Autor correspondente:

Nome: DÁRCIO LUIZ DE SOUSA JÚNIOR
E-mail: darcio.arquivos@gmail.com
Telefone: (88) 998015508
Formação Profissional:
BIOMÉDICO, ESPECIALISTA EM FARMACOLOGIA CLÍNICA PELA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI (URCA), CRATO, CE, BRASIL
correspondência:
Rua: GETÚLIO VARGAS n°: 120
Bairro: VILA ALTA Cidade: CRATO Estado: CE CEP: 63119-175

Data de Submissão:

03/07/2018

Data de aceite:

07/04/2019

Conflito de Interesse: Não há conflito de interesse



INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o uso de plantas medicinais para tratamento ou prevenção de saúde e de várias doenças como medicina tradicional, alternativa ou complementar²².

Ultimamente os medicamentos antibióticos estão sendo usados erroneamente causando no aumento de microrganismos multirresistentes. Este fato acontece devido a que as bactérias possuem alguns mecanismos para adquirir e repassar uma resistência contra estes fármacos, tornando cada vez mais dificultoso um tratamento eficaz¹⁰.

Com o passar do tempo, a utilização de plantas medicinais para a prevenção ou tratamentos de muitas doenças tem evoluído, desde as formas mais tradicionais como as mais avançadas utilizadas nos dias atuais. Dessa forma o homem percebeu que nas plantas haviam propriedades, que atualmente são chamadas de princípios ativos, as quais poderiam gerar reações benéficas ao organismo, resultando na recuperação da saúde¹².

A espécie *Genipa americana*, pertencente à família Rubiaceae apresenta em sua composição fitoquímica principalmente iridóides, que nas plantas, servem para a autoproteção, possuem também vitamina C, cafeína, manitol e alguns ácidos. Sua utilização popular se dá para o tratamento de doenças hepáticas e antidiarreicas^{7,9}. Foi relatado um efeito anti-inflamatório em um extrato hidro propilenoglicólico das folhas dessa espécie³, assim como na prevenção e tratamento da diabetes por conseguir inibir enzimas como a tirosinase e α -glicosidase²⁰.

A busca por novos agentes antimicrobianos é de extrema importância, devido a vários microrganismos já serem resistentes a alguns destes fármacos, contudo, é necessário que se tenha uma validação científica para o uso correto dessas espécies vegetais ou de seus compostos ativos, comumente chamados de fitoterápicos, na promoção da saúde, principalmente em se tratando de dose, parte da planta utilizada, assim como as suas propriedades terapêuticas¹⁵. Desse modo busca-se neste estudo o potencial antimicrobiano e modulador do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Genipa americana*.

METODOLOGIA

Preparo do extrato

As cascas do caule de *Genipa americana* (Jenipapo) foram coletadas no Distrito Dom Quintino, Município de Crato - CE, as 12h00min, em seguida foram pesadas 300g das cascas em balança semi-analítica, após isso foram colocados em recipiente de vidro com tampa, onde será adicionado 300ml de etanol 70%. O extrato foi levado ao evaporador rotativo (model Q-214M2 - Quimis, Brazil) para a retirada do solvente e concentrado em banho-maria a 60 °C. O rendimento dos extratos foi calculado pela expressão: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato}/\text{massa do material vegetal}) \times 100$. Pesou-se em uma balança analítica 0,01g do extrato num eppendorf de 2mL. Adicionou-se 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) e a solução foi levada ao vortex para completa homogeneização. Transferiu-se a mistura para um tubo falcon e adicionou-se 8,8mL de água destilada.

Meios de cultura e microrganismos

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar Brain Heart Infusion - BHI (Sigma®) na concentração indicada pelo fabricante e esterilizados em autoclave. As bactérias utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Cedidas pelo Laboratório de Microbiologia e Biologia

Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos foram realizados segundo a metodologia de Matos, (1997), no qual foram submetidos com a função de detectar os metabólitos secundários presentes nos extratos. Para obter o resultado, foi observado a mudança de cor e a formação do precipitado, após a adição de reagentes específicos (NAOH e HCL)^{8,13}.

Concentração inibitória mínima (CIM):

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Eppendorfs foram preparados com 1350 µl de meio BHI 10% e 150 µl de inóculo.

Em seguida foram distribuídos 100 µl desta solução em cada cavidade da placa de microdiluição e logo após adicionou-se 100 µl de extrato na primeira cavidade, passando para as demais, através de sucessivas diluições na proporção de 1:1, até a penúltima cavidade, variando nas concentrações de 512 a 8 µg/mL. Esta última foi reservada como controle. Estas colocadas em estufa a 37°C/24h. Para a leitura as placas foram reveladas com corante específico, a resazurina, um indicador colorimétrico de óxido-redução, utilizando-se de 20µl deste corante em cada cavidade das placas e incubá-las por 1 h em temperatura ambiente¹⁶.

A revelação da CIM considerada como inibição do crescimento para os poços que permaneceram com a coloração azulada e não-inibição os que apresentaram coloração avermelhada.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de impedir o crescimento bacteriano, nas cavidades da placa de microdiluição conforme detectado macroscopicamente¹⁴.

Modulação da ação de drogas antimicrobianas

Para averiguar a modulação da ação dos antibióticos frente às cepas testadas, utilizou-se o método de Coutinho et al. (2008)⁴, onde a solução do extrato foi testada em concentração sub-inibitória (CIM/8) de 128 µg/ mL. Foram preparados tubos eppendorf contendo cada um deles 1,5 mL de solução, com 1.162 µL de BHI 10%, 150 µL da suspensão bacteriana e 188 µL do extrato.

Para o controle foram preparados tubos eppendorf com 1,5 mL de solução contendo 1.350 µL de BHI 10% e 150 µL de suspensão de microrganismos. A placa foi preenchida no sentido alfabético adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço. Em seguida, 100 µL da droga na concentração de 1024 µg/mL (Amicacina, Gentamicina e Clindamicina) foram misturadas ao primeiro poço, procedendo a microdiluição em série, numa proporção de 1:1 até a penúltima cavidade. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Análise estatística

Os resultados dos ensaios foram feitos em triplicata, e expressos como a média geométrica. A análise estatística foi aplicada à análise de variância two-way ANOVA seguida pelo de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (onde $p < 0,05$ é considerado significativo e $p > 0,05$ não significativo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização do teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) com bactérias (*E. coli*, *S. aureus* e *P.*

aeruginosa) foram obtidos resultados $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ em todas as cepas

GRÁFICO 1. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de antimicrobianos na ausência e presença do EHGA frente à *Staphylococcus aureus*.

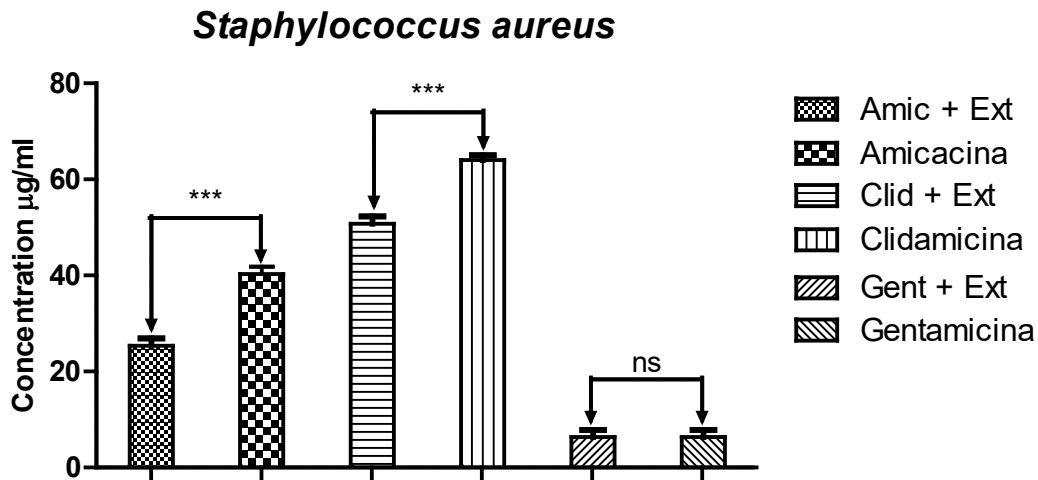


GRÁFICO 2. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de antimicrobianos na ausência e presença do EHGA frente à *Escherichia coli*.

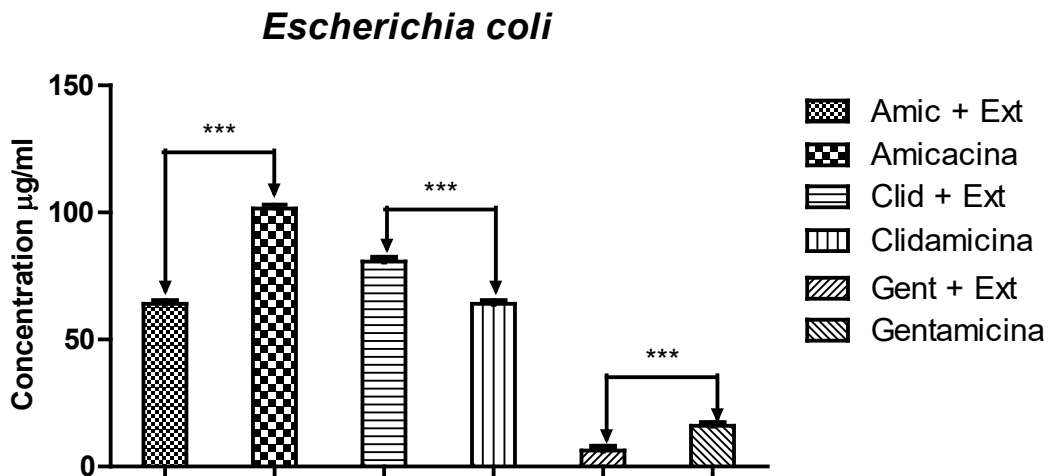


GRÁFICO 3. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) de antimicrobianos na ausência e presença do EHGA frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa

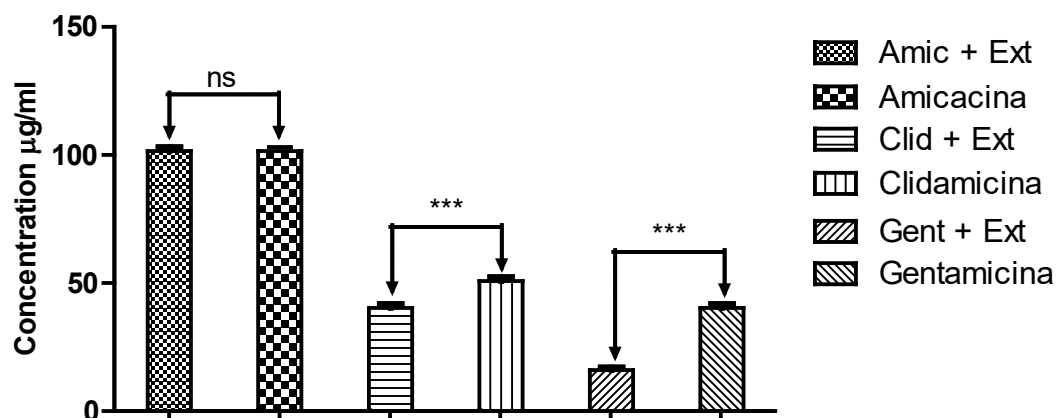


TABELA 1. 1-Fenóis; 2-Taninos Condensados; 3-Antacioninas; 4-Antacianidinas; 5-Flavonas; 6-Flavonóis; 7-Xantonas; 8-Chalconas; 9-Auronas; 10-leucoantocianidinas; 11-Catequinas; 12-Flavanonas; (+) Presença; (-) Ausência. EHGA – Extrato Hidroalcoólico de *Genipa americana*

METABÓLITOS

| | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| EXTRATO | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |

Apartir da prospecção fitoquímica preliminar foram encontrados taninos flababênicos (condensados) e flavanonas, metabólitos secundários com ação antioxidante e antimicrobiana, possuindo alguns mecanismos de ação capazes de inibir a proliferação bacteriana e de potencializar antibióticos, diminuindo a concentração destes fármacos pela ação conjunta, abrandando, assim, efeitos colaterais causados por estes medicamentos¹⁹.

Estes metabólitos também são encontrados em várias pesquisas, corroborando que tanto a família Rubiaceae, quanto a espécie em questão possuem muitos metabólitos secundários com poder antimicrobiano²¹.

Foi observado que o extrato hidroalcoólico da casca do caule do Jenipapo conseguiu modular a ação de dois antibióticos para cada cepa bacteriana utilizada. Estes resultados vão de encontro quando comparados aos de Santos, Ramos & Miyagaku (2017)¹⁷, onde o extrato hidroalcoólico dos frutos de Jenipapo apresentou atividade antimicrobiana quando testados contra as três espécies utilizadas no presente estudo, contudo, foi utilizado nesta pesquisa, o método de disco difusão em altas concentrações além do teste de microdiluição para a CIM.

Outro relato da ação antimicrobiana foi visto no estudo de Almeida et al, (2017)¹, também realizado pelo método de disco difusão, onde a partir de um extrato clorofórmico das folhas de *Genipa americana* L. e também de sua fração clorofórmica apresentaram halo de inibição frente à *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922), já as frações utilizadas não apresentaram ação contra a *E. coli*, isto comprova que não apenas extratos brutos tem ação antibacteriana, como também frações e isolados destes produtos naturais, salientando a pesquisa aprofundada de todos os compostos encontrados¹⁸.

O óleo essencial de *Genipa americana* L. também apresentou notável atividade antimicrobiana frente às bactérias

de relevância clínica, como apresentado por Barbosa (2008)², que realizou testes de disco difusão com o óleo essencial dos frutos de Jenipapo utilizando várias bactérias multirresistentes como a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 25923), onde se obteve um halo de inibição, confirmando a ação farmacológica desta espécie tanto isoladamente, como juntamente com medicamentos sintéticos.

Na associação com a Clindamicina frente à *Escherichia coli* houve um aumento na concentração do antibiótico. Isto pode ser devido que essa classe de antibiótico não é eficaz contra bactérias gram-negativas^{11,22}. Mostrado no estudo de Donovan et al. (1979)⁶ que este pôde ter ação quando associado à um aminoglicosídeo.

As três cepas, quando testadas com aminoglicosídeos tiveram um resultado relevante, onde *P. aeruginosa* e *E. coli* foram mais susceptíveis à Gentamicina e *S. aureus* à Amicacina, assim como no estudo de Martinez, Gironi e Santos (1996)¹³. A capacidade modificadora que extratos vegetais têm sobre medicamentos antimicrobianos é confirmada a partir de estudos já realizados mostrando a redução da resistência já existente⁵.

CONCLUSÃO

Diante do exposto nesta pesquisa, é certo concluir que o extrato da casca do caule de *Genipa americana*, não possui uma CIM favorável, mas tem notável atividade moduladora tanto para amiglicosídeos (Amicacina e Gentamicina) quanto para as lincosamidas (Clindamicina) principalmente quando testados contra bactérias de interesse clínico como a *Pseudomonas aeruginosa*, grande causadora de infecções hospitalares. Deve-se ser realizados mais estudo sobre o potencial desta espécie, que possui compostos fitoquímicos importantes capazes de reduzir a resistência a antimicrobianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

23. WHO: World Health Organization. Health Topics: Traditional Medicine. 2014. Disponível em: < http://www.who.int/topics/traditional_medicine/en/>. Acessado em: 20 de janeiro de 2017. [\[Link\]](#)
10. Hamdan JS, Hahn RC. Antifungal drugs for systemic mycosis: an overview of mechanism of action and resistance. *Antifungal Agents Med Chem*. 2006. [\[CrossRef\]](#)
12. LORENZI Harri; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. 2. ed. São Paulo: Instituto plantarum de estudos da flora Ltda, 2008.
7. Erbano M, Duarte MR. Morfoanatomia de folha e caule de *Genipa americana* L., Rubiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 20, n. 6, p. 825-832. 2010. [\[CrossRef\]](#)
9. Gupta MP, Mireya DCA, Pablo NS, Jones A, Galdames C, Guionneau-sinclair F. Medicinal plants inventory of Kuna Indians: Part 1. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 40, p. 77-109. 1993. [\[Link\]](#)
3. Bernard P, Scior T, Didier B, Hibert M, Berthon JY. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A(2) inhibitors. *Phytochemistry*. v. 58, p. 865-874. 2001. [\[Link\]](#)
21. Souza PM, Sales PM, Simeoni LA, Silva EC, Silveira D, Magalhães PO. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta Medica*, v. 78, p. 393-399. 2012. [\[CrossRef\]](#)
16. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001. [\[Link\]](#)
8. Firmo WCA, Miranda MV, Coutinho GSL, Silveira LMS, Olea RSG. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antibacteriana de *Lafoensia Pacari* (Lythraceae). *Revista Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 20, n. 1, p. 7-12, Junho 2014. [\[Link\]](#)

-
14. MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2ª Ed. –Fortaleza: UFC. 1997.
17. Salvat A, Antonacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM. Screening of some plants from northern argentina for their antimicrobial activity. Letters in Applied Microbiology. 32: 293-297, 2001. [[CrossRef](#)]
15. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Pennsylvania, USA, 2003. [[Link](#)]
4. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. Chemotherapy. 2008. [[Crossref](#)]
20. Simões CO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick, PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.
22. Dias Souza RK, Mendonça ACAM, Silva MAP. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos y farmacológicos de espécies de Rubiaceae en Brasil. Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 18, n. 1, p. 140-156, 2013. [[Link](#)]
18. Santos FBD, Ramos MIL, Miyagusku L. Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from genipap, baru and taruma. Ciência Rural, v. 47, n. 8, 2017. [[CrossRef](#)]
19. Silva JR. Abordagem antimicrobiana de extrato, frações e substâncias obtidas de *Ixora brevifolia* Benth (Rubiaceae). Uniciências, v. 19, n. 2, 2016. [[Link](#)]
1. Almeida SM, Teixeira KCS, Estevam CS, Santos SB. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato e frações da folha de *Genipa americana* L. Anais do VI Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco – PLAMEVASF. Juazeiro-BA, 2017. [[Link](#)]
11. Klainer AS. Clindamycin. Med Clin North Am, 1987. [[PubMed](#)]
2. Barbosa DA. Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae). Rio de Janeiro. 2008. Mestrado [Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas] – Universidade Federal do Rio de Janeiro. [[Link](#)]
6. Donovan IA, Ellis D, Gatehouse D, Little G, Grimley R, Armistead S, Keighley RB, Strachan CJL. One dose antibiotic prophylaxis against wound infection after appendicectomy: A randomized trial of clindamycin, cefazolin sodium and a placebo. BJS, 1979. [[Link](#)]
13. Martinez R, GIRONI RH, dos Santos VR. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos, usados na prática médica-Ribeirão Preto-SP-1994. Medicina (Ribeirao Preto. Online), v. 29, n. 2/3, p. 278-284, 1996.
5. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2010. [[Link](#)]