

**ATIVIDADE DE PRODUTOS VEGETAIS  
CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS  
PARA PEIXES**

**SANDRA BERTELLI RIBEIRO DE CASTRO**

**2008**

**SANDRA BERTELLI RIBEIRO DE CASTRO**

**ATIVIDADE DE PRODUTOS VEGETAIS  
CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS  
PARA PEIXES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Castro, Sandra Bertelli Ribeiro de.

Atividade de produtos vegetais contra bactérias patogênicas para peixes /  
Sandra Bertelli Ribeiro de Castro. -- Lavras : UFLA, 2008.

53 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo.

**Bibliografia.**

**1. Extratos vegetais. 2. Antimicrobianos. 3. Bactérias patogênicas. 4. Peixes. 5. Ácido ursólico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.**

CDD – 589.90634  
615.32

**SANDRA BERTELLI RIBEIRO DE CASTRO**

**ATIVIDADE DE PRODUTOS VEGETAIS  
CONTRA BACTÉRIAS PATOGÊNICAS  
PARA PEIXES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 13 de fevereiro de 2008.

Prof. Dr. Denilson Ferreira de Oliveira UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan UFLA

Prof. Dr. Douglas Antônio de Carvalho UFLA

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo  
UFLA  
**(Orientador)**

**LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roosevelt e Márcia, pela compreensão, dedicação e apoio incondicional. Às minhas irmãs, Cintia e Simone, pela amizade e amor.

A minha filha, Emanuela, um presente em nossas vidas, que trouxe serenidade, aconchego e motivação para os desafios enfrentados. Ao meu companheiro, Nicodemos, que tornou esta conquista possível, pela paciência a cada final de semana em que estive ausente. A Marcilene, pela amizade e dedicação.

Ao Professor Henrique César Pereira Figueiredo, pela oportunidade, ensinamentos e orientações na execução deste trabalho. Ao Professor Denilson Ferreira Oliveira, pela atenção e sugestões.

A Professora Rosane Freitas Schawn e ao Professor Douglas Antônio de Carvalho, pelas modificações sugeridas.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola, pela oportunidade. À Capes e à Fapemig, pelo financiamento deste projeto.

À Dircéia Aparecida Costa Custódio, pela amizade, confiança, dedicação e paciência.

Aos amigos Helvécio Santos Martins, Aline Tirelli e Carlos Augusto Leal, pela intensa colaboração. Às pós-graduandas Daniela Tupy Godoy e Gláucia Frasnelli Mian, pela ajuda e conselhos que foram fundamentais para a realização deste trabalho. À Glei pelo companheirismo e atenção.

Aos colegas do Departamento de Biologia, do Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos e do Laboratório de Produtos Naturais, pelos bons momentos compartilhados, em especial ao Alan, pela constante ajuda.

Aos amigos Cristina, Luciana e Cristian, pela verdadeira amizade.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE TABELA</b> .....	i
<b>ÍNDICE DE FIGURA</b> .....	ii
<b>RESUMO</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	3
2.1 A importância socioeconômica da aquicultura.....	3
2.2 Bactérias patogênicas relevantes para peixes.....	4
2.2.1 <i>Aeromonas</i> sp.....	5
2.2.2 <i>Streptococcus</i> sp.....	6
2.2.3 <i>Flavobacterium columnare</i> .....	7
2.3 A quimioterapia antimicrobiana.....	8
2.3.1 A resistência aos antibióticos.....	12
2.3.2 Extratos e substâncias purificadas de espécies vegetais com atividade antimicrobiana.....	14
2.3.3 Perspectivas terapêuticas do ácido ursólico.....	17
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólicos.....	19
3.1.1 Extratos metanólicos.....	19
3.1.2 Teste <i>in vitro</i> para avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólicos.....	21
3.1.2.1 Teste de difusão em ágar.....	21
3.1.2.2 Concentração inibitória mínima.....	22

3.2 Purificação e verificação do teor de ácido ursólico obtido do extrato bruto de <i>Merremia tomentosa</i> (Choisy) Hallier.....	24
3.3 Avaliação da atividade antibacteriana do ácido ursólico.....	28
3.3.1 Bactérias.....	28
3.3.2 Preparo do ácido ursólico para realização da CIM.....	31
3.3.3 Concentração inibitória mínima.....	32
<b>4 RESULTADOS</b> .....	33
4.1 Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos testados.....	33
4.2 Concentração inibitória mínima do ácido ursólico.....	37
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	47

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Exemplos de classes de antimicrobianos e seus respectivos mecanismos de ação.....	9
TABELA 2	Mecanismos de resistência de microrganismos a agentes antimicrobianos.....	13
TABELA 3	Exemplos de espécies vegetais contendo substância com atividade antimicrobiana.....	15
TABELA 4	Espécies vegetais famílias e parte da planta utilizada para a produção dos extratos metanólicos.....	19
TABELA 5	Frações combinadas da cromatografia em coluna da fração Jr 2-18-03.....	26
TABELA 6	Frações ricas em ácido ursólico antes e após a passagem em carvão ativado.....	27
TABELA 7	Isolados utilizados na verificação da atividade antibacteriana do ácido ursólico.....	28
TABELA 8	Tamanho dos halos de inibição formados em função dos extratos metanólicos vegetais testados.....	34
TABELA 9	Concentrações inibitórias mínimas dos extratos metanólicos vegetais.....	37
TABELA 10	Concentração inibitória mínima do ácido ursólico, frente aos isolados bacterianos de peixes.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 Estruturas moleculares de algumas substâncias com atividade antimicrobiana isoladas de plantas.....	16
FIGURA 2 Estrutura do ácido ursólico.....	17
FIGURA 3 Procedimentos utilizados para a obtenção do ácido ursólico a partir de <i>Merremia tomentosa</i> (Choisy) Hallier.....	25

## RESUMO

Castro, Sandra Bertelli Ribeiro. **Atividade de produtos vegetais contra bactérias patogênicas para peixes**. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

No Brasil, a ocorrência de doenças infecciosas é um dos principais pontos críticos para a aquicultura, ocasionando elevados prejuízos ao setor. Populações bacterianas resistentes a antibióticos são comumente encontradas em ambientes aquáticos, o que torna necessária a busca por terapias alternativas para o controle das doenças. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de plantas e do fitoquímico ácido ursólico frente a bactérias patogênicas para peixes. Realizou-se o teste de difusão em ágar com 45 extratos metanólicos, contra os isolados *Streptococcus agalactiae* (SA 16-06), *Flavobacterium columnare* (FL 02-07L) e *Aeromonas hydrophila* (AE 255-03). Posteriormente, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos ativos. O ácido ursólico foi isolado de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hallier e teve seu efeito antimicrobiano avaliado por meio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) contra 48 isolados bacterianos patogênicos para peixes. Dos 45 extratos, observou-se que 31 apresentavam atividade antibacteriana, tendo o isolado FL 02-07L sido o mais sensível. Os valores da CIM variaram de 93,75 a 1500 µg/mL, para os extratos e, para o ácido ursólico, foram de 62,5 e 125 µg/mL. Os isolados de *Aeromonas hydrophila* foram resistentes a este triterpenóide. Os extratos avaliados e o ácido ursólico apresentam potencial para uso em controle de infecções bacterianas na piscicultura.

---

\* Comitê Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (Orientador) e Denilson Ferreira Oliveira – UFLA (CO-orientador).

## ABSTRACT

Castro, Sandra Bertelli Ribeiro. **Activity of plant products against to fish pathogenic bacteria**. 2008. 53p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

In Brazil, infectious diseases are common in aquaculture and causes high economic losses. *Streptococcus agalactiae*, *Flavobacterium columnare* and *Aeromonas hydrophila* are major pathogens for several fish species. The common treatment used is the oral administration of antibiotics. The aim of this work was to evaluate the antimicrobial activity of plant extracts and the ursolic acid. A screening of 45 methanol plant extracts was performed to identify antibacterial properties against the pathogens *Streptococcus agalactiae* (SA 16-06), *Flavobacterium columnare* (FL 02-07L) and *Aeromonas hydrophila* (AE 255-03). After that, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the active extracts was determined. The ursolic acid was isolated from *Merremia tomentosa* (Choisy) Hallier and its antimicrobial effect determined by the minimum inhibitory concentration (MIC) against 48 strains of fish pathogenic bacteria. 31 of the 45 extracts analyzed showed antibacterial activity. The MIC values ranged from 93,75 to 1500 µg/mL to extracts, the strain FL 02-07L was the most sensitive. To ursolic acid the MIC values were 62,5 and 125 µg/mL. The strains of *Aeromonas hydrophila* were resistant to this triterpenoid. The plant extracts and ursolic acid evaluated in this study showed a good potential for the control of bacterial infections in aquaculture.

---

\* Comitê Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo – UFLA (Orientador) e Denilson Ferreira Oliveira – UFLA (CO-orientador).

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a identificação de substâncias terapêuticas para o uso em seres humanos ou animais impulsionam várias pesquisas, no sentido de introduzir novas drogas no mercado farmacêutico. Entre as classes farmacológicas de interesse, os antimicrobianos se destacam pela constante demanda, em função da ineficácia diante de microrganismos resistentes.

A redução gradativa da ação de substâncias antimicrobianas existentes deve-se à elevada capacidade adaptativa dos microrganismos, que podem adquirir mecanismos de resistência a essas drogas, por meio de modificações do seu material genético. Sendo assim, um isolado bacteriano, que hoje é sensível a um antimicrobiano, pode, com o decorrer do tempo e pelo contato com outras bactérias, tornar-se resistente.

A resistência a antimicrobianos ocasiona sérios problemas de saúde pública e prejudica diversos segmentos da produção animal. Ambos os fatores causam impacto na agropecuária, principalmente quando atingem atividades voltadas para a produção de alimentos, como é o caso da piscicultura. Por meio desses fatores pode ocorrer a introdução na cadeia alimentar humana de patógenos e microrganismos não patogênicos contendo genes de resistência a antibióticos.

A piscicultura é uma atividade econômica que vem encontrando crescente evolução nas últimas décadas e da qual um dos principais obstáculos é a ocorrência de doenças infecciosas. Essas ocasionam prejuízos diretos, oriundos da morte dos animais e queda na produtividade e indiretos, frente ao aumento no custo de produção devido ao dispêndio financeiro com tratamentos, controle e prevenção.

O uso de antibióticos na aquicultura, de forma geral, é altamente problemático em função de uma série de fatores. Apesar disso, a antibioticoterapia é a principal ferramenta utilizada no tratamento de doenças infecciosas.

Outro aspecto relevante é a ausência de antibióticos para uso exclusivo na aquicultura. Esse emprego comum de drogas pode potencializar a indução da resistência microbiana, atingindo a saúde dos seres humanos, pois microrganismos patogênicos para peixes também podem ser infectantes ao homem.

A junção dos fatores citados expõe o potencial de disseminação da resistência bacteriana a partir do ambiente e produtos aquícolas, o que torna evidente a necessidade de novas fontes de antibióticos para este e outros setores.

A investigação de substâncias presentes em plantas é uma prática cada vez mais comum entre os grupos que trabalham na pesquisa de fármacos. As atividades farmacológicas dos extratos vegetais são verificadas por meio de ensaios laboratoriais e clínicos, direcionando os estudos para o isolamento e a identificação de compostos ativos denominados fitoquímicos, dentre os quais vários com atividade antimicrobiana já foram identificados.

Considerando-se a necessidade de novas substâncias antimicrobianas e o potencial das plantas para produzi-las, o objetivo da realização deste trabalho foi verificar a atividade *in vitro* de extratos vegetais e do fitoquímico ácido ursólico contra bactérias patogênicas para peixes.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Importância socioeconômica da aquicultura**

A aquicultura é uma atividade em crescimento rápido e contínuo, impulsionada, nos últimos anos, pelas mudanças nos hábitos alimentares das populações e pelo aumento da demanda mundial por alimento (FAO, 2007).

Em 1950, a produção aquícola mundial era de aproximadamente 1 milhão de toneladas. Cinquenta anos depois, este número aumentou significativamente, atingindo, no ano de 2004, um valor quantitativo de 59,4 milhões de toneladas.

Os países da Ásia e do Pacífico são responsáveis por 91,5% da produção mundial e 80,5% da renda gerada. A China destaca-se pela magnitude de sua contribuição, que é de 69,6% do montante mundial. A Europa concorre com 3,9%, enquanto que a América do Norte e a América do Sul, incluindo a região do Caribe, colaboram com 1,3% e 2,3% da produção, respectivamente. O continente Africano é responsável por 1,1% do volume global (FAO, 2006).

Na América do Sul, o desenvolvimento da aquicultura está concentrado em três países: Equador, Chile e Brasil (FAO, 2006). No Brasil, vários fatores justificam o crescimento da aquicultura, sendo a grande disponibilidade dos recursos hídricos renováveis, que abrange 18% da disponibilidade mundial, o fator principal dessa expansão (IBAMA, 2007).

O crescimento da aquicultura colabora para o desenvolvimento econômico do país, por meio da produção de alimentos e de outros artigos para consumo interno e exportação, incremento no número de postos de trabalho, diversificação e otimização no aproveitamento das áreas de produção agropecuária, entre outros (FAO, 2007).

No Brasil, o crescimento das atividades relacionadas à aquicultura ocorreu a partir de 1990, com o planejamento da expansão desta atividade por meio da produção de camarões (*Panaeus vannamei*), tilápias (*Oreochromis* sp.), carpas (*Cyprinus carpio*) e tambaquis (*Colossoma macroponum*) (FAO, 2007).

Dentre as espécies de peixes cultivadas no Brasil, destaca-se a tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*), introduzida, inicialmente, na região nordeste, posteriormente espalhando-se por todo o território nacional (Boscolo et al., 2001). A fácil adaptação aos sistemas de cativeiro, a aceitação de rações com grande facilidade, o hábito alimentar onívoro e a resistência à alta temperatura e à baixa concentração de oxigênio tornam esta espécie a mais explorada na piscicultura brasileira (Boscolo et al., 2001).

No ano de 2004, o Brasil ocupou a sétima posição entre os maiores produtores mundiais de tilápia, produzindo 69.078 toneladas, em comparação com a China, que ocupa a primeira posição, sendo responsável pela produção de 897.276 toneladas de tilápia (FAO, 2006).

## **2.2 Bactérias patogênicas relevantes para peixes**

Os peixes são susceptíveis a diversas infecções bacterianas. Essas podem acarretar prejuízos econômicos para as pisciculturas em função da alta mortalidade gerada durante os surtos ou, ainda, das perdas financeiras em virtude da diminuição na eficiência produtiva (Hatha et al., 2005; Figueiredo et al., 2006).

Entre as bactérias patogênicas para peixes destacam-se, no Brasil, as *Aeromonas* móveis, *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare* (Berridge et al., 2000; Evans et al., 2004; Miller & Nelly, 2004; Figueiredo et al., 2005; Figueiredo et al., 2006; Hirsch et al., 2006; Godoy, 2006).

### 2.2.1 *Aeromonas* sp.

As bactérias do gênero *Aeromonas* são bastonetes gram-negativos, não formadores de esporos, fermentadores e anaeróbios facultativos, presentes em ambientes aquáticos (Hatha et al., 2005).

Este gênero é dividido em dois grupos distintos, segundo suas características de motilidade e de temperatura de crescimento. O primeiro grupo é composto de bactérias não móveis e psicrotróficas, enquanto o segundo é representado pelas *Aeromonas* móveis e mesófilas (Mian, 2006; Buur & Frey, 2007).

O principal representante do grupo de *Aeromonas* não móveis é *Aeromonas salmonicida*, causadora de furunculose em peixes (Buur e Frey, 2007). Entre as *Aeromonas* móveis patogênicas para peixes, destacam-se *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. sobria*, *A. bestiarum* e *A. veronii* (Kozinska, 2007).

*Aeromonas hydrophila* é o patógeno, dentre as *Aeromonas* móveis, de maior importância para seres humanos e peixes. Essa bactéria é caracterizada como bastonete gram-negativo, móvel e causador de doenças septicêmicas em diversos hospedeiros. Em seres humanos, estão envolvidas, principalmente, em casos de gastroenterites, infecções cutâneas e septicemias (Yu et al., 2007).

Os principais fatores de virulência associados aos processos infecciosos causados por esse agente são: presença de flagelos, secreção de exotoxinas, como hemolisinas, glicerolfosfolídeos-colesterol aciltransferases (GCAT) e lipases. Entretanto, faltam investigações com relação ao número e à quantidade destas proteínas secretadas. Diversos isolados de *A. hydrophila* apresentam o sistema de secreção tipo III caracterizado pela formação de um canal no interior da bactéria, que é projetado através da parede celular e interage com a membrana e o citosol da célula hospedeira, com posterior secreção de proteínas (Yu et al., 2007).

Os sinais clínicos mais frequentes nas infecções causadas por *A. hydrophila* em peixes são ulcerações cutâneas, que evoluem para septicemia. Na prática, um alto índice de mortalidade é observado durante a manifestação da doença (Wahli et al., 2005).

### 2.2.2 *Streptococcus* sp.

O gênero *Streptococcus* é composto por bactérias gram-positivas causadoras de doenças em diversos hospedeiros, desde peixes até mamíferos. Dentre os microrganismos desse gênero, a bactéria *Streptococcus agalactiae* é um patógeno de destaque, sendo o agente etiológico de infecções no sistema nervoso de seres humanos e peixes (Berridge et al., 2001).

Em seres humanos, as infecções por *Streptococcus agalactiae* podem ser caracterizadas por quadros de septicemia, pneumonia e meningite em neonatos e também nos indivíduos imunocomprometidos (Magalhães et al., 2007; Pettersson, 2007).

Em neonatos, a infecção ocorre em função da contaminação do feto pelo líquido amniótico, quando a mãe é portadora do microrganismo. O processo de infecção nos recém-nascidos envolve a contaminação pulmonar, seguida pela invasão da corrente sanguínea e da eventual colonização das meninges (Magalhães et al., 2007; Pettersson, 2007).

*Streptococcus agalactiae* é um patógeno emergente para peixes de água doce e salgada. Infecções causadas por esse agente ocasionam quadros com intensa mortalidade e conseqüente impacto econômico (Pasnik et al., 2005).

Em 1957, no Japão, foi relatado o primeiro caso de infecção por *Streptococcus* sp. em trutas. Desde então, casos da doença têm sido descritos em várias espécies de peixes (Yanong & Francis-Floyd, 2006).

Os sinais clínicos apresentados por peixes infectados com *Streptococcus agalactiae* são natação errática, letargia, escurecimento, exoftalmia uni ou

bilateral, opacidade da córnea, áreas hemorrágicas ao redor dos olhos, brânquias ou outras partes do corpo, ascite e ulcerações (Yanong & Francis-Floyd, 2006).

Surtos provocados pela bactéria *S. agalactiae* são freqüentes nas tilapiculturas. Ela gera alta mortalidade no início da infecção, atingindo, posteriormente, uma taxa constante até o emprego de tratamento adequado. No Brasil, freqüentemente, os casos de infecção são desencadeados nos períodos em que a água atinge temperaturas próximas ou superiores a 30°C. Nestas condições, o patógeno encontra condições ideais para o seu desenvolvimento (Salvador et al., 2005; Figueiredo et al., 2006).

Além do *S. agalactiae*, outras espécies do gênero *Streptococcus* são descritas na literatura como patógenos importantes para peixes de água doce, como o *S. iniae*. O primeiro isolamento desta espécie ocorreu no ano de 1976, a partir da lesão subcutânea de um golfinho na Amazônia. Atualmente, sabe-se que o *S. iniae* é capaz de causar infecção em 24 tipos de peixes, incluindo o gênero *Oreochromis*. Os peixes infectados por *S. iniae* e *S. agalactiae*, geralmente, apresentam sinais clínicos similares (Miller & Nelly, 2004).

### 2.2.3 *Flavobacterium columnare*

*Flavobacterium columnare* é um bastonete gram-negativo, causador da columnariose, doença que afeta a maioria das espécies de peixes de água doce. O primeiro isolamento desta bactéria foi relatado em 1922, em surto no rio Mississippi (EUA), sendo posteriormente caracterizada como patogênica para várias espécies de peixe em cultivo e de vida livre (Grabowski et al., 2004).

Os sinais clínicos típicos da columnariose são lesões da pele e nadadeiras, que evoluem para a necrose dos tecidos adjacentes. A doença acomete principalmente alevinos, porém, pode atingir também peixes adultos. As lesões podem apresentar secreção amarelada com tênue inflamação. Em alguns casos ocorre adesão do microrganismo às brânquias e dependendo da

patogenicidade da amostra bacteriana os peixes podem morrer antes da observação de qualquer sinal clínico (Figueiredo et al., 2005; Suomalainen et al., 2005; Zangh et al. 2006).

Nos Estados Unidos, é a segunda doença mais impactante na indústria de *catfish* (*Ictalurus punctatus*) (Zhang et al., 2006). No Brasil, isolados bacterianos obtidos de lesões em peixes sugestivas de columnariose foram caracterizados por reações bioquímicas, produção de enzimas, perfis de ácidos graxos e análise molecular, sendo todos identificados como *F. columnare* (Figueiredo et al., 2005).

A variabilidade na patogenicidade de diferentes amostras da bactéria se traduz em manifestações diferenciadas da doença, dificultando a elaboração de um tratamento padrão. Essas diferenças são expressas, inclusive, com relação às exigências físico-químicas durante o cultivo do microrganismo em laboratório. Dessa forma, para diferentes isolados de *F. columnare*, a tolerância ao cloreto de sódio, a temperatura ótima para o crescimento e o pH do meio podem ser diferenciados (Jinu & Goowin, 2004; Figueiredo et al., 2005).

As infecções causadas por *F. columnare*, geralmente, estão associadas às condições ambientais, como densidade animal, estresse com mudança de temperatura, perdas de escamas dos peixes durante o manejo, aumento de nitrito e queda do teor de oxigênio na água (Grabowski et al., 2004; Figueiredo et al., 2005; Figueiredo & Leal, 2007).

### **2.3 Quimioterapia antimicrobiana**

Os antibióticos são drogas de origem natural ou sintética, capazes de matar ou inibir o crescimento de microrganismos, sendo utilizados para o tratamento de doenças infecciosas em seres humanos, em animais e em plantas (Serrano, 2005).

Durante os séculos XIX e XX, várias substâncias antimicrobianas foram identificadas, entretanto, muitas não foram aplicadas na clínica, devido à alta toxicidade. O desenvolvimento da quimioterapia antimicrobiana começou em 1936, com o uso da sulfanilamida e, posteriormente, com a produção da penicilina. Esta evolução terapêutica possibilitou que milhões de pacientes com infecções potencialmente fatais fossem tratados, obtendo-se um prognóstico favorável (Chambers & Sande, 1996).

Os antimicrobianos são classificados, principalmente, em função de sua estrutura química e mecanismo de ação (Chambers & Sande, 1996). Na Tabela 1 estão descritas, resumidamente, as principais classes de antibióticos e seus respectivos mecanismos de ação.

TABELA 1 Exemplos de classes de antimicrobianos e seus respectivos mecanismos de ação

<b>Classe de antimicrobianos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Fármacos representantes das classes</b>
Sulfonamidas	Atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. São compostos químicos com estrutura análoga à do ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA), que agem de forma a impedir a utilização do PABA na síntese do ácido fólico. Não afetam as células dos mamíferos, pois estes necessitam ingerir o ácido fólico pela dieta, uma vez que são incapazes de sintetizá-lo.  O uso de sulfonamidas foi acentuadamente reduzido até a associação de Sulfametoxazol com Trimetoprima, o que aumentou a eficiência destas drogas.	Sulfametoxazol Sulfadiazina Sulfametizol Sulfasalazina Sulfacetamida

“... continua...”

“TABELA 1, Cont.”

Classe de antimicrobianos	Mecanismo de ação	Fármacos representantes das classes
$\beta$ -lactâmicos	Alta atividade contra bactérias gram-positivas, mas também atuam em bactérias gram-negativas. Inibem a ação de enzimas envolvidas na transpeptidação, que são responsáveis pela ligação das cadeias tetrapeptídicas na constituição da parede celular. Com isso, promovem o rompimento da parede celular.	Penicilina G Ampicilina Amoxicilina Cefalexina Cefaclor Imipenem
Aminoglicosídeos	Atividade basicamente contra bacilos gram-negativos. Os aminoglicosídeos agem na síntese protéica, por meio dos seguintes mecanismos: - ligação com a subunidade 30S do ribossomo, o que impede a ligação da subunidade 50S; - bloqueio da tradução, dando origem à proteína incompleta; - incorporação de aminoácidos incorretos, o que gera proteínas alteradas.	Estreptomicina Gentamicina Tobramicina Amicacina Netilmicina Canamicina Neomicina
Tetraciclina	Possuem amplo espectro de ação. Inibem a síntese protéica. Ligam-se à subunidade 30S do ribossomo e impedem o acesso do RNA transportador aminoacil ao sítio de ligação.	Clortetraciclina Oxitetraclina Metaciclina
Quinolonas	Atuação mais eficiente contra bactérias gram-negativas. Inibe a DNA girase, ausente em células eucariotas, que atua durante o processo de replicação ou transcrição do DNA (ácido desoxiribonucleico).	Ác. Oxolínico Norfloxacina Ciprofloxacina

“... continua...”

“TABELA 1, Cont.”

<b>Classe de antimicrobianos</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Fármacos representantes das classes</b>
Bacitracina	Atua sobre bactérias gram-positivas. Seu uso é limitado à aplicação tópica. Seu mecanismo de ação consiste em inibir a síntese da parede celular.	Bacitracina
Cloranfenicol	Apesar do amplo espectro de ação, este antibiótico tem seu uso limitado por inibir a síntese protéica mitocondrial em células de mamíferos. Na bactéria, o cloranfenicol liga-se à subunidade 50S do ribossomo, no local da peptidiltransferase, bloqueando a síntese protéica.	Cloranfenicol
Macrolídeos	São ativos contra bactérias gram-positivas. Atuam na síntese protéica, ligando-se à subunidade 50S do ribossomo e impedindo a translocação da cadeia do peptídeo.	Eritromicina Claritromicina Azitromicina
Polimixina e Colistina	Atuam em bactérias gram-negativas. Alteram a permeabilidade da membrana celular bacteriana, devido à característica anfipática.	Polimixina B Colistina
Vancomicina	Atua em bactérias gram-positivas. Inibe a síntese da parede celular. Liga-se com alta afinidade ao terminal D-alanil-D-alanina (unidades precursoras da parede celular).	Vancomicina

---

Adaptado de Woods, 1999; Serrano, 2005.

### **2.3.1 A resistência aos antibióticos**

Os microrganismos apresentam proteção contra a ação de substâncias químicas em função de sua própria constituição celular. As bactérias gram-negativas, por exemplo, possuem a membrana externa que age como uma barreira física contra a entrada de diversas moléculas, incluindo os antibacterianos. Já as bactérias gram-positivas, em função da ausência de membrana externa, tornam-se mais susceptíveis à ação de agentes tóxicos à célula (Wright, 2007).

O perfil de resistência bacteriana pode ser intrínseco, de forma que a droga não atue sobre o microrganismo por ausência de sítio de ação, penetração ineficaz ou incapacidade de causar danos a processos vitais da célula (Chambers & Sande, 1996; Serrano, 2005).

A segunda forma é a resistência adquirida por elementos genéticos móveis, como os transposons e os plasmídeos. A conjugação, a transformação e a transdução são os três mecanismos utilizados na aquisição de novos genes (Serrano, 2005; Wright, 2007).

Na conjugação, o material genético é transferido entre bactérias de uma mesma espécie ou espécies diferentes, por meio de uma estrutura tubular denominada pilus. Na transformação, a bactéria adquire os novos genes assimilando-os do ambiente externo. No processo de transdução, a transferência do material genético ocorre por meio da infecção da célula bacteriana por bacteriófagos (Serrano, 2005).

A rápida expansão de resistência aos agentes antimicrobianos pode gerar um problema de saúde pública, como o reaparecimento de doenças infecciosas que estavam total ou parcialmente controladas (Wright, 2007).

Na Tabela 2 estão resumidos os principais mecanismos de resistência bacteriana a agentes antimicrobianos.

TABELA 2 Mecanismos de resistência de microrganismos a agentes antimicrobianos.

Mecanismo de resistência	Exemplo da aplicação dos mecanismos
Receptores alterados	<b>Resistência à vancomicina:</b> os microrganismos resistentes alteram a porção terminal N-acil-D-Ala-D-Ala do peptidoglicano, para N-acil-D-Ala-D-lactato, reduzindo a afinidade do antibiótico, que atua inibindo a síntese da parede celular. Esse processo é regulado por 5 genes (vanR-vanS-vanH-vanA-vanX) que atuam como uma unidade coordenada da expressão gênica (operon).
Inativação enzimática	<b>Resistência a aminoglicosídeos:</b> durante a biosíntese da estreptomicina, o microrganismo produtor altera a estrutura do antibiótico mediante a produção de aminoglicosídeo quinase que é inativo. Logo após a liberação desta substância da célula produtora, uma fosfatase atua sobre a mesma, transformando-a na substância ativa. Estudos indicam que a capacidade de síntese destas quinases, que, em princípio, funcionariam apenas como proteção para o microrganismo produtor, foi transmitida, via transposons e plasmídeos, às bactérias patogênicas, gerando grupos resistentes.
Transporte alterado do antibiótico	<b>Resistência à tetraciclina:</b> algumas bactérias possuem a resistência à tetraciclina por efluxo ativo (Tet A efflux), o que ocorre pela expressão do gene tet A. Por este mecanismo, a bactéria expulsa a molécula de antibacteriano da célula, impedindo sua ligação à unidade 30S do ribossomo.

Fonte: Wright, 2007.

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) de Atlanta (EUA), um fator relevante na propagação da resistência de microrganismos aos antibacterianos consiste no uso comum de drogas para o tratamento em humanos e animais. Os resíduos das drogas utilizadas ficam acumulados nos produtos manufaturados, propiciando o desenvolvimento de bactérias resistentes no trato gastrintestinal de seres humanos (Serrano, 2005).

Em função da pouca disponibilidade de antimicrobianos específicos para o uso na aquicultura, o controle das doenças infecciosas em peixes é realizado com drogas aplicáveis também em seres humanos. Entretanto, algumas bactérias causadoras de doenças em peixes também acometem seres humanos, como é o caso de *Streptococcus agalactiae* (Koneman, 2001). Na avaliação da viabilidade da bactéria *S. agalactiae* na carcaça de tilápia, constatou-se que, mesmo após o congelamento a  $-70^{\circ}\text{C}$ , por cinco e nove meses, foi possível realizar o isolamento de colônias viáveis do patógeno (Evans et al., 2004).

Os dados obtidos no estudo exposto corroboram com a suposição de que os peixes podem ser importantes veículos de bactérias patogênicas ou resistentes para a cadeia alimentar humana, sendo necessárias a normatização e implementação de programas e medidas sanitárias, com o objetivo de garantir a segurança alimentar e saúde da população (Serrano, 2005).

### **2.3.2 Extratos e substâncias purificadas de espécies vegetais com atividade antimicrobiana**

O principal fator que impulsiona as pesquisas na descoberta de antimicrobianos a partir de espécies vegetais é a necessidade de novos compostos para esta classe terapêutica (Cowan, 1999).

As espécies vegetais são ricas em substâncias secundárias utilizadas para a proteção da planta contra predadores, tais como compostos fenólicos, terpenóides, alcalóides, óleos essenciais, lectinas, polipeptídeos e poliacetilenos. Alguns destes compostos com atividade antimicrobiana são apresentados na Tabela 3 (Cowan, 1999).

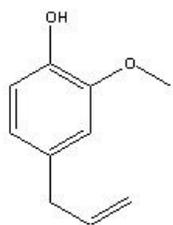
TABELA 3 Exemplos de espécies vegetais contendo substâncias com atividade antimicrobiana.

Nome popular	Nome científico	Componente antimicrobiano
Alho	<i>Allium sativum</i> L.	Alicina
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr & L. M. Perry	Eugenol
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.	Ácido gálico
Henna	<i>Lawsonia inermis</i> L.	Ácido gálico
Óleo de oliva	<i>Olea europaea</i> L.	Hexanal
Pimenta-da-jamaica	<i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	Eugenol
Hortelã	<i>Mentha piperita</i> L.	Mentol
Saborosa	<i>Satureja montana</i> L.	Carvacrol

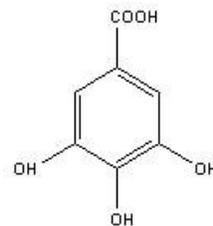
Fonte: Cowan, 1999.

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fitofármacos revela resultados promissores, principalmente com relação à ação sinérgica, possibilitando que antibióticos já ineficazes sejam novamente eficientes, quando associados aos extratos ou substâncias purificadas de plantas (Nascimento et al., 2000).

As estruturas moleculares de algumas substâncias com propriedades antimicrobianas isoladas de espécies vegetais estão representadas na Figura 1.



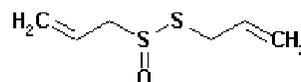
Eugenol



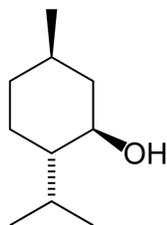
Ácido gálico



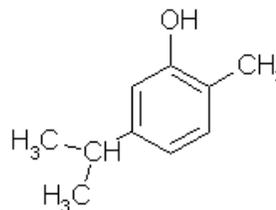
Hexanal



Alicina



Mentol



Carvacrol

FIGURA 1 Estruturas moleculares de algumas substâncias com atividade antimicrobiana isoladas de plantas

Estudos *in vitro* das atividades antimicrobianas de exemplares da flora brasileira têm fornecido resultados promissores, permitindo a identificação e a purificação dos compostos responsáveis pela inibição do crescimento de

microrganismo (Nascimento et al., 2000; Farago et al., 2004; Antunes et al., 2006; Oliveira et al., 2007).

No extrato bruto de determinada espécie vegetal, é possível o isolamento de mais de uma substância com atividade antimicrobiana (Oliveira et al., 2007).

### 2.3.3 Perspectivas terapêuticas do ácido ursólico

O ácido ursólico ( $3\beta$ -3-hidroxi-urs-12-en-28-oico) é um triterpenóide pentacíclico (Figura 2). Atualmente, essa substância é obtida para uso comercial a partir da extração e da purificação de espécies vegetais (Saravanan & Pugalendi, 2006; Ovesná et al., 2006; Peschel et al., 2007).

Desde 1930, são encontrados relatos da identificação deste fitoquímico na constituição de frutas. Entretanto, hoje é possível isolá-lo de uma grande variedade de alimentos, ervas medicinais e outras plantas (Sando, 1930; Liu, 2005).

A baixa toxicidade deste composto para células eucariotas tem estimulado os estudos para a elucidação dos seus mecanismos de ação como hepatoprotetor, antineoplásico, antiinflamatório e antimicrobiano (Liu, 2005; Ovesná, 2006).

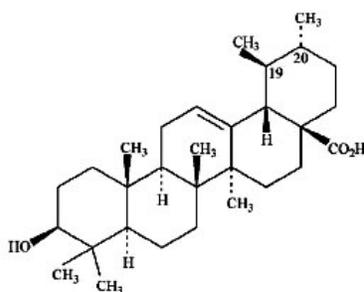


FIGURA 2 Estrutura do ácido ursólico.

Com relação à atividade antimicrobiana, observa-se maior sensibilidade das bactérias gram-positivas ao ácido ursólico, visto que o crescimento de bactérias gram-negativas praticamente não é inibido por este triterpenóide (Mallavadhani et al., 2004; Becker et al., 2005; Kato et al., 2006).

Estudos avaliando a formação de biofilme revelam que a expressão e a atividade de fatores de virulência de bactérias gram-negativas são afetadas na presença do ácido ursólico. Essa droga, apesar de não inibir a multiplicação bacteriana, diminuiu a formação de biofilmes por bactérias, como *Escherichia coli* (Ren et al., 2005).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólicos

##### 3.1.1 Extratos metanólicos

Quarenta e cinco extratos metanólicos brutos provenientes de espécies vegetais do Vale São Francisco e do município de Lavras, estado de Minas Gerais, foram testados para a verificação da atividade contra bactérias patogênicas para peixes. Todos os extratos foram produzidos e fornecidos pelo Laboratório de Produtos Naturais, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) (Tabela 4).

TABELA 4 Espécies vegetais, famílias e parte da planta utilizada para a produção dos extratos metanólicos

Espécies	Localidade	Famílias	Parte da Planta usada
<i>Actinostemon concolor</i> (Sprengel) Müll. Arg.	Iguatama	Euphorbiaceae	Folhas
<i>Allophylus edulis</i> ( A.St.-Hil., Cambess. & A.Juss) Radlk.	BambuÍ	Sapindaceae	Folhas
<i>Amaioua guianensis</i> Aubl.	Lagoa da Prata	Rubiaceae	Folhas
<i>Andira fraxinifolia</i> Benth.	BambuÍ	Fabaceae	Folhas
<i>Bathysa meridionalis</i> L.B Sm. & Downs	BambuÍ	Rubiaceae	Folhas
<i>Bauhinia longifolia</i> (Bongard) Steudel	BambuÍ	Fabaceae	Folhas
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	BambuÍ	Meliaceae	Cascas
<i>Calyptranthes clusiifolia</i> (Miq.) O. Berg	Lagoa da Prata	Myrtaceae	Folhas
<i>Cariniana legalis</i> (Mart.) Kuntze	BambuÍ	Lecythidaceae	Cascas
<i>Celtis iguanaea</i> Jacq. Sar.	BambuÍ	Cannabaceae	Cascas
<i>Celtis iguanaea</i> Jacq. Sar.	Lassance	Cannabaceae	Folhas

“... continua...”

“TABELA, Cont.”

Espécies		Famílias	Parte da planta usada
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	BambuÍ	Euphorbiaceae	Cascas
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	BambuÍ	Euphorbiaceae	Folhas
<i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez	Lassance	Lauraceae	Cascas
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	BambuÍ	Sapindaceae	Cascas
<i>Erythrina falcata</i> Benth.	BambuÍ	Fabaceae	Folhas
<i>Eugenia florida</i> DC.	Iguatama	Myrtaceae	Folhas
<i>Eugenia handroana</i> D. Legrand	Lagoa da Prata	Myrtaceae	Folhas
<i>Guarea guidonia</i> (L.) Sleumer	Iguatama	Meliaceae	Cascas
<i>Heisteria silvianii</i> Schwacke	Iguatama	Olacaceae	Folhas
<i>Inga marginata</i> Willd.	BambuÍ	Fabaceae	Cascas
<i>Machaerium hirtum</i> (Vell.) Stellfeld	BambuÍ	Fabaceae	Folhas
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Iguatama	Sapindaceae	Folhas
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Iguatama	Sapindaceae	Cascas
<i>Maytenus glazioviana</i> Loes.	Iguatama	Celastraceae	Folhas
<i>Maytenus glazioviana</i> Loes.	Iguatama	Celastraceae	Cascas
<i>Merremia tomentosa</i> (Choisy) Hallier	Lavras	Convolvulaceae	Folhas
<i>Mollinedia argyrogyna</i> Perkins	Lagoa da Prata	Monimiaceae	Casca
<i>Mollinedia argyrogyna</i> Perkins	Lagoa da Prata	Monimiaceae	Folhas
<i>Myrcia tomentosa</i> (Aubl.) DC.	Abaeté	Myrtaceae	Folhas
<i>Myrcia velutina</i> O.Berg	Abaeté	Myrtaceae	Cascas
<i>Pêra glabrata</i> (Schott) Poepp.	Lagoa da Prata	Euphorbiaceae	Folhas
<i>Platycyamus regnellii</i> Benth.	BambuÍ	Fabaceae	Folhas
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	Lagoa da Prata	Burseraceae	Folhas
<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.	Lagoa da Prata	Burseraceae	Folhas
<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.	Lagoa da Prata	Burseraceae	Cascas
<i>Ruprechtia laxiflora</i> Meisn.	Iguatama	Polygonaceae	Folhas
<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	Iguatama	Anacardiaceae	Cascas
<i>Securinega guaraiuva</i> Kuhlman.	Iguatama	Euphorbiaceae	Folhas
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Abaeté	Siparunaceae	Cascas
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Abaeté	Siparunaceae	Folhas

“... continua...”

“TABELA 4, Cont.”

Espécies		Familias	Parte da planta usada
<i>Swartzia apetala</i> Raddi.	Lagoa da Prata	Fabaceae	Folhas
<i>Virola sebifera</i> Aubl.	BambuÍ	Myristiaceae	Folhas
<i>Xylosma</i> sp. I	Iguatama	Salicaceae	Folhas
<i>Xylosma</i> sp. II	Iguatama	Salicaceae	Folhas
<i>Zanthoxylum riedelianum</i> Engl.	Iguatama	Rutaceae	Folhas

### 3.1.2 Teste *in vitro* para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólicos

A atividade antibacteriana de cada extrato bruto foi avaliada em relação a três principais espécies bacterianas patogênicas para peixes *Streptococcus agalactiae* (SA 16-06), *Flavobacterium columnare* (FL 02-07L) e *Aeromonas hydrophila* (AE 255-03), provenientes do banco de bactérias do Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (AQUAVET), no Departamento de Medicina Veterinária da UFLA.

#### 3.1.2.1 Teste de difusão em ágar

Os testes de difusão em ágar foram realizados de acordo com o método recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, com algumas modificações (CLSI, 2006). As amostras foram descongeladas e repicadas em meios de cultura apropriados. As bactérias *A. hydrophila* e *S. agalactiae* foram cultivadas, a 30°C, por 24 horas, em ágar Müeller-Hinton (Difco, EUA). Para o isolado de *S. agalactiae*, suplementou-se o meio com 10% de sangue de equino. O cultivo de *F. columnare* foi realizado em ágar MHS (Bader et al., 2003), por 48 horas, a 26°C.

As suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina 0,85% e ajustadas à turbidez de 0,5 da escala de McFarland, equivalente a uma população de  $10^8$  UFC/mL (CLSI, 2006). Para o isolado de *Flavobacterium columnare*, o inóculo foi padronizado em caldo MHS, atingindo uma densidade populacional de  $10^8$  UFC/mL, que foi obtida por medida da absorvância (0,230) por espectrofotometria (660nm).

Com o suabe estéril, as suspensões foram distribuídas nas superfícies dos meios indicados para cada espécie bacteriana. Em seguida, foram feitos 7 furos por placa, com o diâmetro de 6 mm, nos quais foram aplicados 40  $\mu$ L de solução do extrato em etanol:água (7:3), na concentração de 10 mg/mL.

Após 24 horas de incubação, a 30°C, para *Streptococcus agalactiae* e *Aeromonas hydrophila* e a 26°C, para *Flavobacterium columnare*, as placas foram analisadas visualmente quanto à formação de halo de inibição ao redor dos poços. Os diâmetros dos halos formados foram medidos com régua milimetrada, seguindo-se as recomendações do CLSI (2006) para a definição de zona de inibição. Para todos os extratos, os testes foram realizados em duplicata.

### **3.1.2.2 Concentração inibitória mínima**

As concentrações inibitórias mínimas dos extratos (CIM) que apresentaram atividade antibacteriana no teste de difusão em ágar foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo.

Para os isolados AE 255-03 e SA 16-06, foi utilizado o meio Müeller-Hinton (Difco, EUA) suplementado com os cátions divalentes  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  (CAMHB); para o *S. agalactiae* (SA 16-06) suplementou-se este caldo também com 2,5% de sangue lisado de cavalo (CLSI, 2006). Para a amostra de *F. columnare*, o meio utilizado foi o MHS.

Realizou-se a microdiluição em microplacas de 96 poços, em duplicata. Nos orifícios da primeira coluna foram adicionados 200 $\mu$ L de meio contendo o

extrato solubilizado em 3% (g/mL) de dimetilsulfóxido (DMSO). Aos demais, foram adicionados 100 µL dos respectivos caldos. Posteriormente, realizaram-se 9 diluições seriadas de base 2, com concentrações do extrato variando de 3000 µg/mL a 11,71 µg/mL.

O inóculo foi preparado transferindo-se colônias bacterianas para solução salina até uma turvação equivalente a 0,5 da escala de MacFarland (CLSI,2006). Essa suspensão em salina foi diluída na proporção 1:9 em CAMHB (para *Streptococcus*, realizou-se a diluição em CAMHB suplementado com 2,5% de sangue lisado de cavalo), obtendo-se uma população de, aproximadamente,  $10^7$  UFC/mL.

Para o isolado de *F. columnare*, preparou-se o inóculo diretamente no meio MHS. Realizou-se a leitura espectrofotométrica a 660 nm. A absorvância obtida foi equivalente a  $10^8$  UFC/mL. Diluiu-se essa suspensão em MHS, na proporção 1:9, atingindo uma população aproximada de  $10^7$  UFC/mL.

Em cada poço da placa de microdiluição foram adicionados 5µL do inóculo. As placas foram lacradas com filmes seladores estéreis, homogeneizadas em minishaker por 10 minutos e incubadas, por 24 horas, a 30°C, para isolados SA 16-06 e AE 255-03, e a 26°C, para FL 02-07L.

Para as leituras das concentrações inibitórias mínimas utilizou-se o revelador cloridrato de trifeniltetrazolium (TTC), aplicando-se 25µL de solução aquosa de TTC (Merck) a 2mg/mL em cada poço da placa, após período de incubação, aguardando-se 10 minutos para proceder a leitura. O aparecimento da coloração rosada demonstrou onde ocorreu crescimento bacteriano. A CIM correspondeu à menor concentração do extrato em que não foi possível verificar o crescimento de microrganismo a olho nu.

O florfenicol foi utilizado como controle para os três isolados testados.

### **3.2 Purificação de ácido ursólico a partir do extrato bruto de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hallier**

A partir do extrato de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hallier, foi realizada a purificação do ácido ursólico, como descrito por Santos Júnior (2007), com algumas modificações (Figura 3). O material botânico coletado no município de Lavras, Minas Gerais, foi seco, triturado e armazenado em freezer.

Para a obtenção do ácido ursólico, a primeira etapa realizada foi o refluxo a quente, com hexano P.A. (Hex), por uma hora, sendo a proporção de material vegetal por líquido extrator de 0,08g/mL. Foram feitos seis refluxos para cada 80 g de folhas secas trituradas.

Os filtrados obtidos do refluxo de 1.226,03 g do material vegetal (Filtrado1) foram concentrados em evaporador rotatório. O material proveniente da evaporação do solvente foi transferido ao liofilizador, gerando 34,16g de extrato hexânico SA 1-32-01.

Realizou-se o fracionamento dos 34,16 g de extrato hexânico por meio de 9 lavagens com 700 ml da solução de acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) na proporção 1:1, gerando 9 filtrados que foram combinados (filtrado 2). A solução resultante foi concentrada em evaporador rotatório e levada ao liofilizador, dando origem à fração Jr2-16-01(24,01g). Realizou-se a monitorização da extração de ácido ursólico nos filtrados por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de alumínio recobertas com sílica gel 60 (Merck) impregnada com indicador de fluorescência UV 254. Para eluir as substâncias, empregou-se Hex:AcOEt (5:2) e, para revelá-las, foi utilizado ácido fosfomolibdico a 5% em etanol (Figura 3).

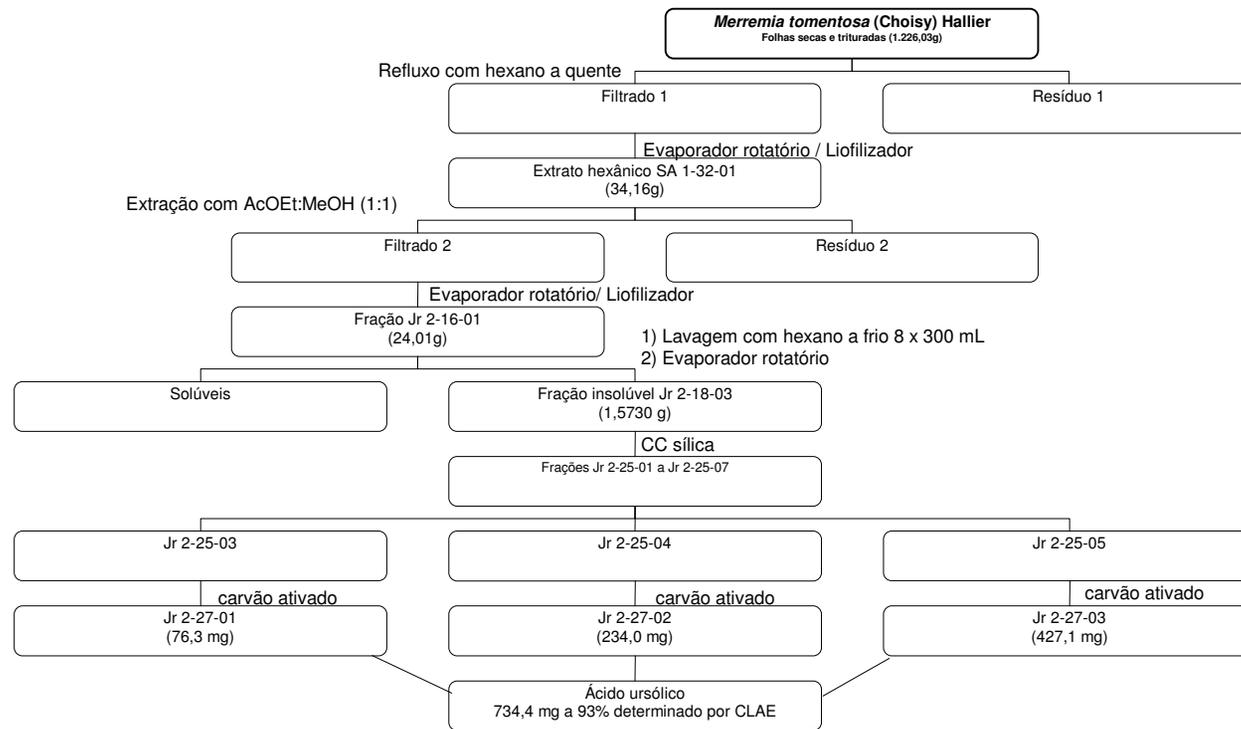


FIGURA 3 Procedimentos utilizados para a obtenção do ácido ursólico a partir de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hallier

Após lavagens com hexano P.A. (8x300mL) da fração Jr2-16-01(24,01g), a parte insolúvel foi submetida à evaporação do solvente em evaporador rotatório e liofilizadora, resultando em 3,15 g de um sólido denominado Jr2-18-03.

Em seguida, 1,57 g da fração Jr 2-18-03 foi pulverizado em almofariz com cerca de 3 g de sílica gel, acrescentado ao topo de uma coluna e fracionado por cromatografia em coluna do tipo *flash* com 6,5 x 15 cm de sílica gel 60 (230–400 mesh, Merck). Por meio desta, com velocidade aproximada de 2,5 cm/min, eluíram-se 800 mL de Hex: AcOEt (5:1), 2.000 mL de Hex: AcOEt (5:2) e 1.200 ml de Hex: AcOEt (2:1). Todos os eluentes possuíam 1% de ácido acético (AcOH) P.A. Coletaram-se 56 frações de, aproximadamente, 70 ml que, após serem analisadas por CCD, foram agrupadas conforme a semelhança, concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas, resultando em 7 combinações (Jr 2-25-01 a Jr 2-25-07), conforme apresentado na Tabela 5.

TABELA 5 Frações combinadas da cromatografia em coluna da fração Jr 2-18-03.

Frações combinadas	Código	Massa (mg)
1-17	Jr 2-25-01	6,56
18-19	Jr 2-25-02	10,3
20	Jr 2-25-03	109,4
21-23	Jr 2-25-04	532,3
24-41	Jr 2-25-05	550,8
42-52	Jr 2-25-06	50,8
53-56	Jr 2-25-07	5,06

As frações Jr 2-25-03, Jr 2-25-04 e Jr 2-25-05, ricas no ácido ursólico, foram submetidas a uma limpeza com carvão ativado P.A. por extração em fase

sólida. Tais frações foram solubilizadas em metanol (MeOH):AcOEt (1:1) e transferidas separadamente para uma coluna 2x4 cm de carvão ativado, por meio da qual foram eluídas com MeOH:AcOEt (1:1). As novas frações obtidas são apresentadas na Tabela 6.

TABELA 6 Frações ricas em ácido ursólico antes e após a passagem em carvão ativado.

<b>Código após passagem</b>	<b>Massa (mg) antes da passagem em carvão ativado</b>	<b>Massa (mg) após passagem em carvão ativado</b>
Jr 2-27-01	160,2	76,3
Jr 2-27-02	532,3	234,0
Jr 2-27-03	550,8	427,0

As análises em CLAE foram realizadas em aparelho Shimadzu<sup>®</sup> com detector de ultravioleta-visível (UV-Vis) do tipo detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A, equipado com duas bombas LC-6AD, injetor automático SIL-10Avp, degaseificador de solventes (modelo DGU-20A<sub>3</sub>), interface CBM-20A (SCL-10Avp), coluna analítica de sílica – C18 Phenomenex Gemini<sup>®</sup> (5 µm, 250 x 4,6 mm). Para a operação do aparelho e a extração dos dados dos cromatogramas, utilizou-se o software LC-SOLUTION Versão 1.21 (Shimadzu<sup>®</sup>).

Como padrão, empregou-se ácido ursólico 97% (Sigma-Aldrich) para o preparo de uma solução padrão estoque a 0,1mg/mL, em acetronitrila:água pura tipo I (92:8). Esta solução padrão foi diluída até 20, 30, 40, 60 e 80 µg/mL para a construção da curva de calibração, que foi obtida pela injeção de 30 µL de cada concentração no aparelho. A amostra analisada foi preparada em uma

concentração correspondente ao ponto médio da curva de calibração (40 µg/mL). Todas as análises foram feitas em triplicata.

Estabeleceram-se as seguintes condições para a análise cromatográfica: eluição isocrática com acetronitrila:água ultrapura tipo I (92:8), fluxo de 0,8 mL/minuto, varredura de comprimento de onda de 200 a 400 nm e quantificação feita a 205 nm.

O grau de pureza do ácido ursólico obtido a partir de *Merremia tomentosa* Hallier correspondeu a 93%.

### 3.3 Avaliação da atividade antibacteriana do ácido ursólico

A atividade antibacteriana do ácido ursólico purificado foi avaliada em relação a três gêneros de bactérias patogênicas para peixes, isoladas de casos clínicos. A CIM foi determinada pelo método de microdiluição em caldo.

#### 3.3.1 Bactérias

As bactérias utilizadas pertencem ao banco de isolados do laboratório AQUAVET. As espécies bacterianas utilizadas, os respectivos códigos de identificação dos isolados, os estados de origem e as espécies de peixes acometidas são descritos na Tabela 7.

TABELA 7 Isolados utilizados na verificação da atividade antibacteriana do ácido ursólico.

Espécie bacteriana	Isolado	Estado de origem	Espécie de peixe
Gram-positivas			
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA 01-03	MG	Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> )
	SA 02-03	MG	

“...continua...”

“TABELA 7, Cont.”

Espécie bacteriana	Isolado	Estado de origem	Espécie de peixe
Gram-positivas			
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA 03-03	MG	Tilápia-do-nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> )
	SA 04-03	MG	
	SA 05-04	ES	
	SA 06-04	ES	
	SA 07-05	BA	
	SA 08-05	BA	
	SA 09-05	ES	
	SA 11-05	ES	
	SA 13-05	SP	
	SA 16-06	PR	
	SA 17-06	SP	
	SA 18-06	SP	
	SA 19-06	PR	
	SA 20-06	PR	
	SA 26-06	PR	
	SA 33-06	SP	
	SA 34-06	SP	
	SA 36-06	SP	
	SA 37-06	SP	

“...continua...”

“TABELA 7, Cont.”

Espécie bacteriana	Isolado	Estado de origem	Espécie de peixe
Gram-positivas			
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA 38-06	SP	Tilápia-do-nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> )
	SA 39-06	SP	
<i>Streptococcus</i> sp	SA 21-06	SP	
	SA 22-06	PR	
	SA 23-06	PR	
	SA 24-06	PR	
	SA 29-06	PR	
	SA 30-06	SP	
	SA 31-06	SP	
	SA 32-06	SP	
	SA 25-06	PR	
	SA 27-06	PR	
	SA 28-06	PR	
	SA 35-06	SP	
Gram-negativas			
<i>Flavobacterium columnare</i>	FL01-03 L	MG	
	FL02-07 L	MG	
	FL03-07 L	MG	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AE 025-02	MG	
	AE 049-02	MG	
	AE 103-02	MG	

“...continua...”

“TABELA 7, Cont.”

Espécie bacteriana	Isolado	Estado de origem	Espécie de peixe
Gram-negativas			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AE 110-02	MG	Tilápia-do-nylo ( <i>Oreochromis niloticus</i> )
	AE 113-02	MG	
	AE 255-03	MG	
	AE 366-03	MG	
	AE 413-04	MG	
	AE 414-04	MG	
	AE 298-03	MG	Piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> )

Adicionalmente, foi determinada a concentração inibitória mínima do ácido ursólico para quatro amostras de referência: *American Type Culture Collection* (ATCC): *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), como controle de qualidade dos testes.

### 3.3.2 Preparo do ácido ursólico para realização da CIM

O ácido ursólico foi solubilizado em NaOH 1N e diluído em água, obtendo-se uma concentração final de 4mg/ml.

Para verificar a esterilidade da solução, foi realizado o plaqueamento de 100 µL desta em meio de cultura TSA (Difco, EUA). Após incubação, a 37°C, por 24 horas, foi avaliada a presença ou a ausência de crescimento microbiano, considerando-se estéril a solução que não deu origem a crescimento microbiano.

### **3.3.3 Concentração inibitória mínima**

A concentração inibitória mínima para o ácido ursólico foi determinada conforme o procedimento descrito no item 3.1.2.2, segundo os parâmetros estabelecidos pelo CLSI (2006).

As concentrações de ácido testadas variaram de 1.000 µg/mL a 3,9 µg/mL. Para as amostras ATCC, o meio utilizado na determinação da CIM foi o Mueller-Hinton suplementado com os cátions divalentes. As CIMs para o antibiótico cloranfenicol, frente às bactérias *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), foram determinadas como controle de reprodutibilidade interplaca de interdia.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos testados

Dos 45 extratos metanólicos testados, 31 apresentaram atividade antibacteriana contra pelo menos uma das espécies bacterianas. O tamanho dos halos variou de 7 a 22 mm. O microrganismo mais sensível à ação dos extratos foi *Flavobacterium columnare* (FL 02-07L), apresentando halo de inibição para 31 extratos (Tabela 8).

Para *A. hydrophila* e *S. agalactiae*, ocorreu a formação de halo de inibição frente a 45 extratos, respectivamente, não tendo nenhum deles provocado efeito simultâneo sobre esses dois isolados.

Os extratos que apresentaram formação de halo foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima mediante o microrganismo correspondente (Tabela 9).

Para o isolado de SA 16-06, dos cinco extratos testados, verificou-se que apenas dois apresentaram concentrações inibitórias no intervalo avaliado (Tabela 9).

Os valores das concentrações inibitórias para os extratos metanólicos testados variaram de 93,75 a 1500 µg/mL.

TABELA 8 Tamanho dos halos de inibição formados em função dos extratos metanólicos vegetais testados.

Espécies	Parte da planta utilizada	Tamanho do halo de inibição formado (mm)		
		SA 16-06* <sup>1</sup>	FL 02-07L* <sup>2</sup>	AE 255-03* <sup>3</sup>
<i>Actinostemon concolor</i> (Sprengel) Müll. Arg.	Folhas	-	22	-
<i>Allophylus edulis</i> ( A.St.-Hil., Cambess.& A.Juss) Radlk.	Folhas	-	-	-
<i>Amaioua guianensis</i> Aubl.	Folhas	-	11	-
<i>Andira fraxinifolia</i> Benth.	Folhas	-	14,5	-
<i>Bathysa meridionalis</i> L.B Sm. & Downs	Folhas	-	11	-
<i>Bauhinia longifolia</i> (Bongard) Steudel	Folhas	-	11	-
<i>Cabrlea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Cascas	-	11	-
<i>Calyptranthes clusiifolia</i> (Miq.) O. Berg	Folhas	8	12,5	-
<i>Cariniana legalis</i> (Mart.) Kuntze	Cascas	-	13	13
<i>Celtis iguanaea</i> Jacq. Sar.	Cascas	-	17	-
<i>Celtis iguanaea</i> Jacq. Sar.	Folhas	-	-	-
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	Cascas	-	14	11,5
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	Folhas	7	17,5	-
<i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez	Cascas	-	15,5	-
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Cascas	-	12	-
<i>Erythrina falcata</i> Benth.	Folhas	-	-	-
<i>Eugenia florida</i> DC.	Folhas	-	12	10

“...continua...”

“TABELA 8, Cont.”

Espécies	Parte da planta utilizada	Tamanho do halo de inibição formado (mm)		
		SA 16-06* <sup>1</sup>	FL 02-07L* <sup>2</sup>	AE 255-03* <sup>3</sup>
<i>Eugenia handroana</i> D. Legrand	Folhas	-	12	-
<i>Guarea guidonia</i> (L.) Sleumer	Cascas	-	17	-
<i>Heisteria silvianii</i> Schwacke	Folhas	8	11	-
<i>Inga marginata</i> Willd.	Cascas	-	-	-
<i>Machaerium hirtum</i> (Vell.) Stellfeld	Folhas	-	-	-
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Folhas	-	-	-
<i>Matayba elaeagnoides</i> Radlk.	Cascas	-	-	-
<i>Maytenus glazioviana</i> Loes.	Folhas	-	-	-
<i>Maytenus glazioviana</i> Loes.	Cascas	-	14	-
<i>Merremia tomentosa</i> (Choisy) Hallier	Folhas	7,5	18,5	-
<i>Mollinedia argyrogyna</i> Perkins	Casca	-	-	-
<i>Mollinedia argyrogyna</i> Perkins	Folhas	-	10	-
<i>Myrcia tomentosa</i> (Aublet) DC.	Folhas	-	15,5	-
<i>Myrcia velutina</i> O.Berg	Cascas	-	15	12
<i>Pêra glabrata</i> (Schott) Poepp.	Folhas	-	-	-
<i>Platycyamus regnellii</i> Benth.	Folhas	-	-	-

“...continua...”

TABELA 8, Cont.”

Espécies	Parte da planta utilizada	Tamanho do halo de inibição formado (mm)		
		SA 16-06* <sup>1</sup>	FL 02-07L* <sup>2</sup>	AE 255-03* <sup>3</sup>
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	Folhas	-	10	-
<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.	Folhas	-	13,5	-
<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.	Cascas	-	10	-
<i>Ruprechtia laxiflora</i> Meisn.	Folhas	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	Cascas	-	12	-
<i>Securinea guaraiuva</i> Kuhlmann	Folhas	-	9	-
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Cascas	-	11,5	-
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Folhas	-	-	-
<i>Swartzia apetala</i> Raddi.	Folhas	-	-	-
<i>Virola sebifera</i> Aubl.	Folhas	-	14,5	-
<i>Xylosma</i> sp. I	Folhas	-	-	-
<i>Xylosma</i> sp. II	Folhas	-	12	-
<i>Zanthoxylum riedelianum</i> Engl.	Folhas	7	11,5	-

( - )Não apresentaram halos de inibição

\*<sup>1</sup> *Streptococcus agalactiae*, \*<sup>2</sup> *Flavobacterium columnare*, \*<sup>3</sup> *Aeromonas hydrophila*.

TABELA 9 Concentrações inibitórias mínimas dos extratos metanólicos vegetais

Espécies	Parte da planta utilizada	Valores de CIM (µg/mL)		
		SA 16-06* <sup>1</sup>	FL 02-07L* <sup>2</sup>	AE 255-03* <sup>3</sup>
<i>Actinostemon concolor</i> (Sprengel) Müll. Arg.	Folhas	*	93,75	*
<i>Amaioua guianensis</i> Aubl.	Folhas	*	375	*
<i>Andira fraxinifolia</i> Benth.	Folhas	*	375	*
<i>Bathysa meridionalis</i> L.B. Smith & Downs	Folhas	*	375	*
<i>Bauhinia longifolia</i> (Bongard) Steudel	Folhas	*	750	*
<i>Cabralea canjerana</i> (Vell.) Mart.	Cascas	*	187,5	*
<i>Calyptranthes clusifolia</i> (Miq.) O. Berg	Folhas	1500	187,5	*
<i>Cariniana legalis</i> (Mart.) Kuntze	Cascas	*	93,75	187,5
<i>Celtis iguanaea</i> Jacq. Sarg.	Cascas	*	187,5	*
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	Cascas	*	93,75	375
<i>Croton floribundus</i> Spreng.	Folhas	-	93,75	*
<i>Cryptocarya aschersoniana</i> Mez	Cascas	*	93,75	*
<i>Cupania vernalis</i> Cambess.	Cascas	*	750	*
<i>Eugenia florida</i> DC.	Folhas	*	375	1500
<i>Eugenia handroana</i> D. Legrand	Folhas	*	187,5	*
<i>Guarea guidonia</i> (L.) Sleumer	Cascas	*	187,5	*
<i>Heisteria silvianii</i> Schwacke	Folhas	-	750	*

“...continua...”

“TABELA 9, Cont.”

Espécies	Parte da planta utilizada	Valores de CIM (µg/mL)		
		SA 16-06* <sup>1</sup>	FL 02-07L* <sup>2</sup>	AE 255-03* <sup>3</sup>
<i>Maytenus glazioviana</i> Loes.	Cascas	*	187,5	*
<i>Merremia tomentosa</i> (Choisy) Hallier	Folhas	1500	93,75	*
<i>Mollinedia argyrogyna</i> Perkins	Folhas	*	375	*
<i>Myrcia tomentosa</i> (Aublet) DC.	Folhas	*	93,75	*
<i>Myrcia velutina</i> O.Berg	Cascas	*	187,5	375
<i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand	Folhas	*	750	*
<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.	Folhas	*	375	*
<i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engl.	Cascas	*	375	*
<i>Schinus terebinthifolia</i> Raddi	Cascas	*	187,5	*
<i>Securinega guaraiuva</i> Kuhlmann	Folhas	*	1500	*
<i>Siparuna guianensis</i> Aubl.	Cascas	*	93,75	*
<i>Virola sebifera</i> Aubl.	Folhas	*	93,75	*
<i>Xylosma</i> sp. II	Folhas	*	375	*
<i>Zanthoxylum riedelianum</i> Engler	Folhas	-	1500	*
Florfenicol	-	2	1	2

(\*) Não determinou valores de CIM.

(-) Não apresentou valor de CIM nas concentrações testadas.

\*<sup>1</sup> *Streptococcus agalactiae*, \*<sup>2</sup> *Flavobacterium columnare*, \*<sup>3</sup> *Aeromonas hydrophila*.

#### 4.2 Concentração inibitória mínima do ácido ursólico

As concentrações inibitórias mínimas do ácido ursólico, para os 48 isolados bacterianos testados, são apresentadas na Tabela 10.

Os valores de CIM variaram entre 62,5 a 125 µg/mL, para os isolados de *Streptococcus*. Entre os microrganismos gram-negativos, o gênero *Flavobacterium columnare* apresentou CIM de 1.000 µg/mL para um dos isolados e 62,5 µg/mL para os demais.

*Aeromonas hydrophila* não foi sensível à ação do ácido ursólico nas concentrações testadas.

TABELA 10 Concentração inibitória mínima do ácido ursólico e florfenicol frente aos isolados bacterianos de peixes.

Espécie bacteriana	Isolado	Valores de CIM (µg/mL)	
		Ácido ursólico	Florfenicol
Gram-positivas			
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA 01-03	125	2
	SA 02-03	125	1
	SA 03-03	62,5	2
	SA 04-03	125	2
	SA 05-04	125	2
	SA 06-04	62,5	4
	SA 07-05	125	2
	SA 08-05	125	8
	SA 09-05	125	2
	SA 11-05	125	2
	SA 13-05	125	4
	SA 16-06	62,5	2
	SA 17-06	62,5	2
	SA 18-06	125	2
	SA 19-06	125	2
	SA 20-06	125	2

“...continua...”

“TABELA 10, Cont.”

Espécie bacteriana	Isolado	Valores de CIM (µg/mL)	
		Ácido ursólico	Florfenicol
Gram-positiva			
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SA 26-06	125	2
	SA 33-06	125	2
	SA 34-06	125	4
	SA 36-06	125	4
	SA 37-06	125	2
	SA 38-06	125	2
	SA 39-06	125	2
<i>Streptococcus</i> sp	SA 21-06	125	2
	SA 22-06	125	1
	SA 23-06	125	2
	SA 24-06	125	8
	SA 29-06	125	2
	SA 30-06	125	2
	SA 31-06	125	2
	SA 32-06	125	2
	SA 25-06	125	1
	SA 27-06	125	2
	SA 28-06	125	2
	SA 35-06	125	2
	Gram-negativas		
<i>Flavobacterium columnare</i>	FL 01-03L	1000	1
	FL 02-07L	62,5	0,5
	FL 03-07L	62,5	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AE 025-02	-	0,5
	AE 049-02	-	1
	AE 103-02	-	0,5
	AE 110-02	-	0,5
	AE 113-02	-	0,5
	AE 255-03	-	2
	AE 366-03	-	1

“...continua...”

“TABELA 10, Cont.”

Espécie bacteriana	Isolado	Valores de CIM (µg/mL)	
		Ácido ursólico	Florfenicol
Gram-negativa			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AE 413-04	-	1
	AE 414-04	-	1
	AE 298-03	-	1

( - ) Não apresentou valor de CIM.

## 5 DISCUSSÃO

A pesquisa por terapias alternativas eficientes no combate de doenças infecciosas de peixe foi realizada, no presente projeto, por meio da investigação de compostos antimicrobianos em espécies selecionadas da flora brasileira.

As bactérias testadas são isolados gram-negativos e gram-positivos provenientes de infecções em peixes. A importância da utilização de microrganismos provenientes de vários estados e de gêneros diferentes reside no perfil variado de patogenicidade e resistência.

Dentre os 45 extratos metanólicos testados, 31 apresentaram atividade antimicrobiana 9 manifestaram efeito para mais de um isolado. A avaliação dos extratos brutos deverá ser realizada de forma individual para os microrganismos testados. Pelo fato de existir uma mistura de substâncias em um extrato, tais como flavonóides, triterpenóides, quinonas e óleos essenciais, é possível que ele seja ativo frente a microrganismos de gêneros e origens diferentes, inclusive contra gram-positivos e gram-negativos.

Entre as plantas analisadas, há relatos prévios da atividade antimicrobiana para algumas espécies vegetais, como, por exemplo, o *Schinus terebinthifolia* Raddi e *Xylosma* sp.

O extrato de *Schinus terebinthifolia* Raddi apresentou atividade antimicrobiana associada à presença de compostos triterpenóides contra isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a fluoquinolonas e macrolídeos (Lima et al., 2006). Outros estudos ampliam a atividade antimicrobiana desta espécie vegetal frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (Guerra et al., 2000).

Espécies do gênero *Xylosma* também apresentaram bons resultados de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* com CIM variando de 2,5 mg/mL a 1,2 mg/mL, respectivamente (Mosaddik et al., 2004).

Entre os dados obtidos no teste de difusão em ágar e concentração inibitória mínima, o isolado *Flavobacterium columnare* foi o microrganismo mais susceptível aos extratos metanólicos testados. Entretanto, é importante ressaltar que a bactéria *F. columnare* é altamente sensível a tratamentos com substâncias antissépticas mais simples, como permanganato de potássio, peróxido de hidrogênio e cloramina que, quando aplicados na prática, promovem resultados eficientes no tratamento de columnariose. Estudos recentes demonstram, inclusive, sensibilidade *in vitro* desta bactéria ao aumento da concentração de cloreto de sódio e da acidez da água, que podem diminuir sua viabilidade (Suomalainen et al, 2005; Thomas-Jinu e Goodwin, 2004).

Dessa forma, pela própria característica de baixa resistência de *F. columnare*, é justificável que um grupo maior de extratos testados tenha atividade frente a este bacilo gram-negativo, ao contrário do que pode ser observado para os isolados de *A. hydrophila* e *Streptococcus agalactiae*. Esses resultados abrem novas perspectivas para o tratamento da columnariose, pois os extratos brutos podem ser utilizados via banho de imersão, dispensando, inicialmente, os ensaios de farmacocinética e farmacodinâmica, exigindo apenas um estudo de toxicidade pré-clínica.

Entretanto, o interesse pela descoberta de substâncias alternativas para o tratamento dos peixes é maior para os gêneros *Aeromonas* e *Streptococcus*, por serem potencialmente patogênicos para seres humanos e relevantes no que diz respeito ao abrigo e à troca de genes de resistência.

De maneira geral, os extratos testados foram mais eficientes contra *Aeromonas hydrophila* e *Flavobacterium columnare* em relação ao isolado de

*Streptococcus agalactia* e para o qual os valores de CIM foram mais altos e com sensibilidade a um número menor de espécies vegetais.

Tendo em vista a identificação prévia do ácido ursólico nas folhas de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hallier (Santos, 2007), este triterpenóide foi extraído e analisado com relação à atividade antimicrobiana. O estudo de substâncias isoladas proporciona uma perspectiva mais exata do potencial antimicrobiano presente nas espécies vegetais, pois, neste caso, utiliza-se uma substância isolada e purificada de plantas em vez de um grupo de componentes ativos, como ocorre no extrato.

Os resultados obtidos para as amostras de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus* sp. são compatíveis com os valores de outras pesquisas que relatam a ação mais efetiva deste composto frente aos isolados gram-positivos (Malladhani et al., 2004; Becker et al., 2005; Kato et al., 2006). Mais estudos serão necessários para a determinação da farmacocinética e da farmacodinâmica, bem como ensaios *in vivo* para estabelecer o real potencial terapêutico dessa substância no controle de infecções em peixes.

O bastonete gram-negativo *Flavobacterium columnare* foi sensível ao ácido ursólico, entretanto, com uma variação discrepante entre FL 01-03L em relação aos outros dois isolados, podendo este fato ser indicativo de algum mecanismo de resistência de FL 01-03L. Para *Aeromonas hydrophila*, a ação do ácido ursólico nas concentrações testadas não inibiu o crescimento, sendo todos os isolados testados resistentes a este triterpeno.

A CIM dos extratos metanólicos e do ácido ursólico teve pouca variação frente os isolados de *Flavobacterium columnare*; os valores das concentrações de inibição foram relativamente próximos, 93,75 µg/mL para o extrato e 62,5 µg/mL para o ácido. Isso pode ser explicado como consequência da ação sinérgica de outras substâncias presentes no extrato bruto que, provavelmente, atuaram na viabilidade da bactéria. Já o isolado *Streptococcus agalactiae*

apresentou CIM com valores discrepantes para o ácido ursólico (62,5 µg/mL) e o correspondente extrato bruto de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hallier (1500 µg/mL). Provavelmente, a ação do conjunto de substâncias que compõem o extrato não teve efeito sobre o microrganismo, reservando ao ácido ursólico a propriedade antimicrobiana.

## 6 CONCLUSÃO

Dos 45 extratos brutos utilizados na realização dos testes de verificação da atividade antimicrobiana, 68,9% apresentaram atividade contra pelo menos um isolado bacteriano testado, sendo o gênero *Flavobacterium columnare* o mais sensível.

O triterpenóide ácido ursólico isolado do extrato metanólico de *Merremia tomentosa* é um componente ativo contra os isolados de *Streptococcus* sp., *Streptococcus agalactiae* e *Flavobacterium columnare*. *Aeromonas hydrophila* foi resistente à ação deste fitoquímico.

Os extratos brutos e os fitoquímicos isolados responsáveis pela ação antimicrobiana podem ser fontes de terapias alternativas na piscicultura contra as bactérias patogênicas testadas, desde que novas etapas experimentais, com a finalidade de determinar o comportamento da substância no organismo infectado, sejam realizadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, R. M.P.; LIMA, E.O; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, X.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.4, p.517-524, 2006.

BADER, J. A; NUSBAUM, K. E.; SHOEMAKER, C. A. Comparative challenge model of *Flavobacterium columnare* using abraded und unabrased channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 8, p. 461-467, 2003.

BECKER, H.; SCHER, J.M.; SPEAKMAN, J.B.; ZAPP, J. Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 580-584, 2005.

BERRIDGE, B. R.; BERCOVIER, H.; FRELIER, P. F. *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus difficile* 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 78, p. 165-173, 2001.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M.; FURUYA, W.M.; MEUER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n.5, p. 1391-1396, 2001.

BURR, S. E.; FREY, J. Analysis of type III effector genes in typical and atypical *Aeromonas salmonicida*. **Journal of Fish Diseases**, v. 30, p. 711-714, 2007.

CHAMBERS, H.F.; SANDE, M. A. Fármacos antimicrobianos. In: \_\_\_\_\_. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996. p. 757-789.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacterial isolated from aquatic animals**, approved guideline. Wayne, PA: 2006a. (CLSI/NCCLS. Document M42-A).

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for broth dilution susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals**, approved guideline. Wayne, PA: 2006b. (CLSI/NCCLS Document M49-A).

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

EVANS, J. J.; WIEDENMAYER, A.A.; KLESZIUS, P.H.; SHOEMAKER, C.A. Survival of *Streptococcus agalactiae* from frozen fish following natural and experimental infections. **Aquaculture**, v. 233, p. 15-21, 2004.

FARAGO, P. V.; PAULA, J.P.; BITTENCOURT, J.M.; ZARPELLON, V.; CHECCHIA, L.E.M. Atividade Antibacteriana de Óleos Essenciais de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae). **Biologia Saúde**, v. 10, p. 59-63, 2004.

FIGUEIREDO, H. C. P.; CARNEIRO, D.O.; FARIA, F.C.; COSTA, G. M. *Streptococcus agalactiae* associado à meningoencefalite e infecção sistêmica em tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n.4, p. 678-680, 2006.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Columnariose doença da piscicultura moderna. **Panorama da Aquicultura**, n. 101, p. 32-37, maio/jun. 2007.

FIGUEIREDO, H. C. P.; KLESIOUS, P.H.; ARIAS, C.R.; EVANS, J.; SHOEMAKER, C.A.; PEREIRA, D.J. Jr.; PEIXOTO, M.T. Isolation and characterization of strains of *Flavobacterium columnare* from Brazil. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 199 -204, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **the state of world aquaculture**. Roma, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **The state of world fisheries and aquaculture**. Roma, 2007.

GODOY, D.T. **Eficácia *in vitro* de florfenicol e biciclomicina para bactérias patogências de peixes de água doce**. 2006. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

GRABOWSKI, L. D.; LAPATRA, S. E.; CAIN, K. D. Systemic and mucosal antibody response in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), following immunization with *Flavobacterium columnare*. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, p. 573-581, 2004.

GUERRA, M. J. M; BARREIRO, M.L.; RODRIGUES, Z.M.; RUBALCABA, Y. Atividade antimicrobiana de um extrato fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Copal). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 5, p. 23-25, 2000.

HATHA, M; VIVEKANANDHAN, A.A; JOICE, G.J.; CHRISTOL. Antibiotic resistance pattern of motile aeromonads from farm raised fresh water fish. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 131-134, 2005.

HIRSCH, D; PEREIRA JUNIOR, D.J; LOGATO, P.V.R.; PICOLLI-VALLE, R.H.; FIGUEIREDO, H.C.P. Identificação e resistência a antimicrobianos de espécies de *Aeromonas* móveis isoladas de peixes e de ambientes aquáticos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, p. 1211-1217, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Recursos hídricos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>. Acesso em: 8 dez. 2007.

JINU, T. S.; GOOWIN, E. Acute columnaris infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque): efficacy of practical treatments for warmwater aquaculture ponds. **Journal of Fish Diseases**, v. 27, p. 23-28, 2004.

KATO, L.; OLIVEIRA, C.M.A; NASCIMENTO, C.A.; LIÃO, L.M. Atividade antimicrobiana de *Palicourea coriacea* (Cham.) K. Schum. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, 2006. Águas de Lindóia. **Anais...** Sociedade Brasileira de Química, 2006.

KONEMAN, E. W et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5.ed. Tradução e Supervisão Arlete Emily Cury. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.

KONZINSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **Journal of Fish Diseases**, v. 30, p. 293-301, 2007.

LIMA, M. R. F.; LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C. SANT'ANA, A. E.G.; GENET, J.P.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L.; MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 137-147, 2006.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 100, p. 92-94, 2005.

MAGALHÃES, V.; MALTA, I.V.; ALMEIDA, M.R., BAPTISTA, M. RIBEIRO, A., CUOT, P.T., FERREIRA, P. Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in *Streptococcus agalactiae* and enhances its virulence in a mouse model. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1276-1284, 2007.

MALLAVADHANI, U. V.; MAHAPATRA, A; JAMIL, K; REEDY, P.S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3 *O*-lipophilic chains. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1576-1579, 2004.

MILLER, J. D.; NEELY, M. N. Zebrafish as a model host for streptococcal pathogenesis. **Acta Tropica**, n. 91, p. 53-68, 2004.

MIAN, G.F. **Concentração inibitória mínima de antibióticos usados em aquicultura frente as aeromonas móveis**. 2006. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MOSADDIK, M.A; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P.G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for *in vitro* antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, n. 11, p. 461-466, 2004.

NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 247-256, 2000.

OVESNÁ, Z.; KOZICS, K.; SLAMENOVA, D. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutation Research**, v. 600, p. 131-137, 2006.

OLIVEIRA, D.F.; PEREIRA, A.C.; FIGUEIREDO, H.C.P; CARVALHO, D.A.; SILVA, G.; NUNES, A.S.; ALVES, D.S; CARVALHO, H.W.P. Antibacterial activity of plants extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, n. 78, p. 142-145. 2007.

PASNIK, D.J.; EVANS, J.J; PANANGALA, V.S; KLESIUS, P.H; SHELBY, R.A. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy. **Journal of Fish Diseases**, v. 28, p. 205-212, 2005.

PESCHEL, S.; FRANKE, R.; SCHEIBER, L.; KNOCHER, M. Composition of the cuticle of developing sweet cherry fruit. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1017-1025, 2007.

PETTERSON, K. Perinatal infection with group B streptococci. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, n. 12, p. 193-197, 2007.

REN, D.; ZUO, R.; BARRIOS, A.F.G.; BEDZYK, L.A.; ELDRIDGE, G.R.; PASMORE, M.E.; WOOD, T.K. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4022-4034, 2005.

SALVADOR, R.; MULLER, E.E.; FREITAS, J.C.; LEONHADT, J.H.; GIORDANO, L.G.P.; DIAS, J.A. Isolation and characterization of *Streptococcus* spp. Group B in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) reared in hapas nets and earth nurseries in the northern region of Paraná State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1374 -1378, 2005.

SANDO, C. E. Ursolic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, n.96, p. 477-495, 1930.

SANTOS JUNIOR, H.M. **Estudos fitoquímico das folhas de *Merremia tomentosa* (Choisy) Hall. F. (Convolvulaceae), *Sabicea brasiliensis* Wernh. (Rubaceae) e *Heteropterys byrsonimifolia***. 2007. 359 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SARAVANAN, R.; PUGALENDI, V. Impact of ursolic acid on chronic ethanol-induced oxidative stress in the rat heart. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 41-47, 2006.

SERRANO, P. H. **Responsible use of antibiotics in aquaculture**. Roma: Food and Agriculture Organization, 2005.

SOUMALINEN, L. R.; TIROLA, M.; VALTONEN, E. T. Treatment of columnaris diseases of rainbow trout: low pH and salt as possible tools? **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 65, p.115-120, 2005.

WAHLI, T.; BURR, S.E.; PUGOVKIN, D.; MUELLER, O.; FREY, J. *Aeromonas sobria*, a causative agent of disease in farmed perch, *Perca fluviatilis* L. **Journal of Fish Disease**, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2005.

WOODS, G. L. Testagem *in Vitro* de agentes antimicrobianos. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19.ed. Tradução de Maria Terezinha Carneiro Leão. São Paulo: Manole, 1999. 1170 - 1182p.

WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews**, n. 5, p. 175-184, 2007.

YANONG, R. P. E.; FRANCIS – FLOYD, R. **Streptococcal infections of fish**. The Institute University of Florida. Food and Agricultural Sciences, 2006. p. 1-6. (Circular, 57).

YU, B.H., KAUR, R.; LIM, S.; WANG, X.H.; LEUNG, K.Y. Characterization of extracellular proteins produced by *Aeromonas hydrophila* AH-1. **Microbiology**, n. 7, p. 436-449, 2007.

ZANG, Y.; ARIAS, C.R.; SHOEMAKER, C.A.; KLESIUS, P.H. Comparison of lipopolysaccharide and protein profiles between *Flavobacterium columnare* strains from different genotypes. **Journal of Fish Diseases**, n. 29, p. 657-663, 2006.