

Detecção de atividade antibacteriana *in vitro* nos extratos brutos obtidos a partir do plasmódio de *Physarella oblonga* (Berk. & Curt.) Morgan (Myxomycetes)

Sheyla M. Ribeiro^{1*}; Laise H. Cavalcanti²; Eugênia C. Pereira³; Norma B. Gusmão⁴; Nicácio H. Silva⁵

¹Doutorado em Ciências Biológicas, Departamentos de Botânica, ³Ciências Geográficas, ⁴Antibióticos, ⁵Bioquímica; Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/nº, 50670-901, Recife, PE, Brasil
sheyla_ribeiro@bol.com.br

Resumo

Utilizando-se o teste de difusão em meio sólido, detectou-se atividade antibacteriana em extratos de *Physarella oblonga* (Physaraceae) obtidos a partir de imobilização plasmodial e do plasmódio *in natura*. Os extratos foram ativos contra *Staphylococcus aureus* (halos=14 mmf) e *Mycobacterium smegmatis* (halos=12 mmf e 13 mmf). Menor inibição foi observada frente a *Bacillus subtilis* (halos=10 mmf e 9 mmf) e *Pseudomonas aeruginosa* (halos=10 mmf e 8 mmf). *Escherichia coli* apresentou resistência a todos os extratos testados. O cromatograma evidenciou semelhanças na composição química dos extratos, justificando as similaridades no potencial inibitório de ambos, sendo as substâncias com *Rf* 0,91 e 0,82, presentes em ambas as amostras, os prováveis inibidores do crescimento bacteriano.

Abstract

Diffusion solid medium test was used to detect antibacterial activity in *Physarella oblonga* (Physaraceae) extracts obtained from plasmodial immobilization and *in natura* plasmodium. The extracts presented activity against *Staphylococcus aureus* (halos=14 mmf) and *Mycobacterium smegmatis* (halos=12 mmf e 13 mmf). Slower inhibition was obtained against *Bacillus subtilis* (halos=10 mmf e 9 mmf) and *Pseudomonas aeruginosa* (halos=10 mmf e 8 mmf). *Escherichia coli* presented resistance to all tested extracts. The chromatogram revealed likeness in the chemical composition of the extracts, explaining similarities in inhibitory potential. The substances with *Rf* 0,91 and 0,82, present in both extracts, could be inhibitor agents of bacterial growth.

leveduras^{1,2,3}. Atividade antiviral também foi reportada para substâncias isoladas do Myxomycetes *Lycogala epidendrum* (L.) Fries⁴.

A natureza química dessas substâncias ainda não é bem conhecida. Locquin & Prevot¹ detectaram atividade antibacteriana em etálios de *Fuligo septica* (L.) Wigg. e reportaram os compostos antraquinônicos como possíveis agentes inibidores do crescimento bacteriano. Outros autores também relatam a presença de compostos fenólicos em várias espécies de mixomicetos^{2,4,5}.

As substâncias produzidas por mixomicetos são sintetizadas em quantidades muito pequenas, o que limita sua utilização em experimentos laboratoriais, tanto no que se refere à atividade biológica como à identificação dessas substâncias. Com o desenvolvimento de técnicas de imobilização plasmodial tornou-se possível a síntese de substâncias de *Physarella oblonga*, em laboratório, a partir de fragmentos plasmodiais imobilizados em caulinita⁶.

Dando continuidade a esses estudos, o presente trabalho objetivou detectar atividade antibacteriana em *Physarella oblonga*, e comparar o efeito inibitório dos extratos obtidos a partir de imobilização plasmodial com extratos obtidos a partir do mesmo plasmódio mantido em condições naturais, de temperatura e luminosidade ambiente.

Detectou-se atividade antibacteriana nos extratos obtidos a partir do plasmódio de *Physarella oblonga*, imobilizado e *in natura*, não se observando diferenças no potencial inibitório entre os dois extratos. *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* mostraram-se mais sensíveis, com halos de inibição variando de 12mm a 14mm de diâmetro; *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*, embora com menor sensibilidade, foram inibidos, principalmente, pelo extrato obtido a partir do plasmódio imobilizado; não se observou inibição do crescimento das colônias de *Escherichia coli* (Tabela 1). As similaridades no potencial inibitório dos dois extratos, indicam uma semelhança na composição química dos mesmos, como pôde ser evidenciado nos testes cromatográficos (Tabela 2).

O cromatograma revelou a presença de três substâncias no plasmódio *in natura* de *P. oblonga*, duas das quais coincidiram em relação aos valores de *Rf* e reação de coloração, com as substâncias produzidas pelo plasmódio imobilizado. A substância com *Rf* igual a 0,97, não detectada no plasmódio *in natura*, apresentou correspondência com o padrão antraquinona utilizado como referência. Por sua vez, o plasmódio *in natura* apresentou uma substância (*Rf*=0,50), não observada no plasmódio imobilizado, que pode tê-la sintetizado em quantidade tão pequena que não foi possível detectá-la pelo método cromatográfico empregado (Tabela 2). Nair & Zabka⁵ encontraram três substâncias no extrato metanólico do plasmódio de *P. oblonga*, que apresentaram baixa polaridade e foram reportadas como possíveis compostos fenólicos.

Os mixomicetos sintetizam substâncias com atividade biológica, sendo referidas como inibidoras da germinação de sementes e raízes de vegetais superiores, e de microrganismos patogênicos, principalmente bactérias Gram-positivas e

Tabela 1. Atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos de *Physarella oblonga* (Berck. & Curt.) Morgan (Myxomycetes) obtidos a partir do plasmódio imobilizado e *in natura*

MICROORGANISMOS	EXTRATOS	HALOS DE INIBIÇÃO (f)
<i>Staphylococcus aureus</i>	P ₁	14 mm
	P ₂	14 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	P ₁	10 mm
	P ₂	9 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P ₁	10 mm
	P ₂	8 mm
<i>Escherichia coli</i>	P ₁	Sem inibição
	P ₂	Sem inibição
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	P ₁	12 mm
	P ₂	13 mm

P1 Extrato obtido a partir de imobilização plasmodial

P2 Extrato obtido a partir do plasmódio *in natura*

Tabela 2. Valores de *R_f* e reação de coloração dos componentes cromatográficos visualizados nos extratos orgânicos obtidos a partir do plasmódio de *Physarella oblonga* (Berk. & Curt.) Morgan (Myxomycetes)

Extratos	Componentes cromatográficos				
	<i>R_f</i>	Coloração	Revelação		
			UV	Iodo ressublimado	
			254 nm	366 nm	
Plasmódio <i>in natura</i>	0,91	Púrpura	-	+	-
	0,82	Amarelo intenso	+	-	+
	0,50	Amarelo pálido	+	-	+
Plasmódio imobilizado em caulinita	0,97	Castanho	+	+	-
	0,91	Púrpura	-	+	-
	0,82	Amarelo intenso	+	-	+

Considerando-se que em outros organismos os compostos fenólicos apresentam atividade antimicrobiana, é possível que a natureza das substâncias bioativas aqui detectadas pertençam a este grupo.

Neste trabalho foi possível demonstrar que além do plasmódio de *P. oblonga* manter-se vivo quando imobilizado em caulinita⁶, ele também é capaz de produzir substâncias bioativas por este processo. Como nos ensaios antimicrobianos os dois extratos apresentaram atividade similar, é provável que as duas bandas que coincidiram em relação aos valores de *R_f* e reação de coloração no teste cromatográfico, sejam as substâncias inibidoras do crescimento bacteriano, podendo estar agindo isoladamente ou em sinergismo contra os microrganismos testados.

Material e Métodos

Utilizou-se faneroplasmódio de *Physarella oblonga* coletado sobre *Elaeis guineensis* L. (Arecaceae) na Reserva Florestal de Gurjaú, Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. Este material foi conduzido ao laboratório e dividido em três amostras: a) mantida na presença de luz até a esporulação, b) utilizada para o processo de imobilização, c) submetida à

extração orgânica para avaliação das substâncias produzidas pelo plasmódio *in natura*. Exsicata representativa do material estudado (amostra a) foi depositada no herbário UFP, da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, sob o n° 27.874.

Os extratos foram obtidos a partir de fragmentos plasmodiais (amostra b) enclausurados em caulinita, sendo extraídos com 25 ml de éter/acetato de etila (65:35; V/V) e clorofórmio/acetoneitrila (60:40; V/V), seguindo a ordem de polaridade dos solventes⁶. O plasmódio *in natura* (amostra c) também foi submetido à extração orgânica com 5 ml de éter/acetato de etila (65:35; V/V), mantendo-se em agitação por 1 h e, em seguida, em repouso por 24 h a, aproximadamente, 6 °C. Após filtrado, o resíduo foi extraído com o mesmo volume de clorofórmio/acetoneitrila (60:40; V/V), nas mesmas condições. Os extratos obtidos para cada amostra foram reunidos e evaporados à temperatura ambiente, sendo mantidos em dessecador até peso constante.

Esses extratos foram ressuspenso nos mesmos solventes utilizados para extração, na concentração de 1 mg/ml, e submetidos à cromatografia em camada delgada, em placa de silicagel 60 F₂₅₄₊₃₆₆ (Merck). O cromatograma foi desenvolvido no sistema de solventes tolueno/acetato de etila/ácido fórmico

(8:1:1; V/V)⁷, e visualizado sob luz ultra-violeta a 254 nm e 366 nm. As bandas obtidas foram reveladas com vapores de iodo ressublimado⁸ e comparadas através de coloração e valores de *Rf* com o padrão antraquinona (9,10-antraquinone/ Merck), utilizado como referência.

Para os testes de atividade antimicrobiana foram selecionados representantes de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* DAUFPE-01, *Bacillus subtilis* DAUFPE-16), Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* DAUFPE-39, *Escherichia coli* DAUFPE-224) e álcool-ácido resistentes (*Mycobacterium smegmatis* DAUFPE-71), cedidas pelo Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (DAUFPE).

Os ensaios antibacterianos foram realizados pelo teste de difusão em meio sólido, segundo Grove & Randall⁹, com três repetições para cada microrganismo. Placas de Petri (9 cmf) contendo 15 ml de meio ágar Mueller-Hinton foram inoculadas com 50 ml das suspensões de microrganismos na concentração de 10⁷ UFC/ml, padronizadas pelo método de Bauer et al.¹⁰.

Discos de papel xarope (6 mmf) foram impregnados com 25 ml de cada extrato orgânico na concentração de 1 mg/ml, sendo depositados sobre o meio previamente inoculado. Como controle utilizaram-se discos impregnados com os respectivos solventes utilizados para extração.

As placas de Petri foram mantidas sob refrigeração (8 °C) durante 24 h³. Em seguida foram incubadas a 38 °C por 24 h, para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e 48 h para a bactéria álcool-ácido resistente. Os resultados foram avaliados medindo-se o diâmetro dos halos de inibição em volta dos discos, e expressos pela média das três repetições.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Departamento de Antibióticos da UFPE, pelos microrganismos cedidos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Referências

- ¹ Locquin A, Prevot AR. Étude de quelques antibiotiques produits par les Myxomycetes. Annales de L'Institut Pasteur. 1948; 75:8-13
- ² Hashimoto T, Akazawa K, Tori M, Kan Y, Kusumi, T, Takahashi, H, Asakawa Y. Three novel polyacetylene triglycerides, lycogarides A-C, from the *Lycogala epidendrum* (Myxomycetes). Chemical Pharmaceutical Bulletin. 1994a; 42:1531-1533
- ³ Chiappeta AA, Sena KX, Rocha CS, Cavalcanti LH. Efeito do tempo de difusão no teste de atividade antimicrobiana de extratos de *Fuligo septica* (Myxomycetes). Revista da Universidade do Amazonas, Série Ciências Biológicas. 1999; 3:53-60
- ⁴ Hashimoto T, Yasuda A, Akazawa K, Takaoka S, Tori M,

- Asakawa Y. Three novel dimethyl pyrroledicarboxylate, lycogarubins A-C, from the *Lycogala epidendrum* (Myxomycetes). Tetrahedron Letters. 1994b; 35:2559-2560
- ⁵ Nair P, Zabka G. Pigmentation and sporulation in selected Myxomycetes. American Journal of Botany. 1966; 53:887-892
- ⁶ Ribeiro SM, Cavalcanti LH, Pereira EC, Silva NH. Production of substances by kaolinite-immobilized plasmodium of *Physarella oblonga* (Berk. & Curt.) Morgan (Myxomycetes). Submetido ao Canadian Journal of Microbiology
- ⁷ Albuquerque SSC. Atividade antimicrobiana dos extratos de etálios de *Lycogala epidendrum* (L.) Fries (Myxomycetes). Tese de Doutorado em Botânica/UFRPE. 1998; 183p
- ⁸ Cavalcanti LH, Silva JB. Aplicação da cromatografia em camada delgada na identificação dos Myxomycetes. Acta Cient. Venezuelana. 1977; 28:346-350
- ⁹ Groove DC, Randal WA. Assay methods antibiotic activity: a laboratory manual. New York, Medical Encyclopedia. 1955; 238p
- ¹⁰ Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Truck M Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. The American Journal of Clinical Pathology. 1966; 45:493-496