

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO FOLIAR DE
PLANTAS COLETADAS NA RESERVA DO CAMPUS DA UFAM**

NANI OLIVEIRA CARVAALHO

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0067/2012

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO EXTRATO FOLIAR
DE PLANTAS COLETADAS NA RESERVA DO CAMPUS DA UFAM**

Bolsista: Nani Oliveira Carvalho, FAPEAM.

Orientador: Raimundo Felipe da Cruz Filho

MANAUS

2013

SUMÁRIO

1.RESUMO.....	4
2.INTRODUÇÃO.....	5
3 OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo geral	6
3.2 Objetivos Específicos	6
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
5 MATERIAL E MÉTODOS	9
5.1 Material vegetal	9
5.2 Preparação das amostras	9
5.3 Definição do espaço amostral	9
5.4 Ensaio biológico	9
5.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	10
5.6 Teste toxicidade com Artemia	10
6 RESULTADOS	12
6.1 Das coletas de material	12
6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	12
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
8 CONOGRAMA DE ATIVIDADES	14

1 RESUMO

A busca de novas substâncias com propriedades antimicrobianas vem se intensificando a cada dia, dado o número cada vez maior de microrganismos que apresentam resistência aos antibióticos usuais. A resistência microbiana está aumentando e a perspectiva para o uso de drogas antimicrobianas no futuro é ainda indecisa. Portanto, ações devem ser tomadas para reduzir esse problema, por exemplo, controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para a melhor compreensão do mecanismo genético de resistência, e continuar estudos para desenvolver novas drogas, sintéticas ou naturais. Em muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza geralmente o único recurso terapêutico. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo, quanto à espécie humana. Em função do exposto acima há a necessidade de se avaliar o potencial antimicrobiano em espécies da família Myrtaceae, Asteraceae, Anacardiaceae e Oxalidaceae. As folhas foram coletadas em plantas domésticas e nativas na reserva do Campus universitário. O material coletado foi triturado em água destilada, centrifugada 8000xg e o sobrenadante filtrado em membrana 0,22 µm e armazenado em tubo Falcon 15mL. As folhas foram submetidas à secagem a 50°C por 24h. Os testes do potencial antimicrobiano foi o de difusão em ágar (Kirby-Bauer) e se confirmadas à presença de antagonismo foi realizada uma bioautografia para se determinar o Rf das moléculas antibióticas. Os micro-organismos testes foram repicados em PCA e incubadas a 37°C por 24 h. Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada micro-organismo foram padronizadas em salina estéril segundo a escala 0,5 de MacFarland. Os extratos testados foram hidratado 10% (p/v) e filtrado. A Semeadura foi tipo tapete com “Swab”, 100µL dos extratos foram colocados em “Cup plate” incubados por 24h a 37 °C. A Semeadura foi tipo tapete utilizando “Swab”. A CIM foi considerada a menor concentração que inibiu o desenvolvimento microbiano. A toxicidade foi determinada pelo teste frente à *Artemia*. Foram coletadas todas as amostras vegetais das famílias Myrtaceae, Oxalidaceae, Anacardiaceae. Os gêneros coletados por famílias foram: Myrtaceae os gênero: *Eugenia*, *Myrcia*, *Myrciaria*, *Psidium*; da família Oxalidaceae os gênero: *Averhoa*, *Oxalis*; da família Anacardiaceae os gênero: *Anacardium*, *Mangifera*, *Spondias*, *Tapirira*. A CIM foi observada a 10⁻¹ do extrato da amostra da Amostra CA da família Myrtaceae nº1 apresentou inibição frente a *Staphylococcus aureus*. O extrato de carambola (*A. carambola* L.) apresentou atividade antifúngica (17mm) e a CIM apresentou inibição na concentração 10⁻². Nas demais amostras a concentração inibitória mínima não ocorreu. Todas as diluições apresentaram turvação, mostrando que a concentração dos extratos não eram adequadas ao teste antimicrobiano. As famílias Myrtaceae, Asteraceae, Anacardiaceae e Oxalidaceae apresentam potencial biotecnológico no que se refere a atividade antimicrobiana.

2 INTRODUÇÃO

A seleção etno-farmacológica de plantas para pesquisa e desenvolvimento baseia-se, na alegação popular quanto ao seu efeito terapêutico. Fato este que pode ser um valioso atalho na descoberta de fármacos. Neste contexto, o uso tradicional pode ser encarado como uma pré-triagem quanto às propriedades terapêuticas. Entretanto, isso não implica que plantas medicinais estejam destituídas de toxicidade (ELISABETSKY, 2003).

Um desses princípios, atualmente muito pesquisado, é o potencial antimicrobiano de plantas. Os estudos antimicrobianos na farmacoterapia, evoluiu consideravelmente nos últimos cinquenta anos, possibilitando o controle efetivo de muitos microrganismos patogênicos através de vários mecanismos. Uma das principais fontes de investigação na busca por novas substâncias com potencial antimicrobiano são as espécies vegetais, uma vez que estas possuem como principal mecanismo de defesa contra seus predadores, a síntese de compostos originados de vias metabólicas secundárias (LIMA, 2001)

Durante um longo período de tempo, plantas têm sido avaliadas como fonte de produtos naturais para conservar a saúde humana, especialmente nas últimas décadas, com estudos intensivos para terapia natural.

A propósito, o uso de componentes das plantas na área farmacêutica tem gradualmente aumentado no Brasil. De acordo com Organização Mundial de Saúde, plantas medicinais deveriam ser a melhor fonte de obter-se uma variedade de drogas. (BERTINI et al., 2005)

O aumento do consumo de medicamentos fitoterápicos pode ser associado ao fato de que as populações questionam os perigos do uso dos medicamentos alopáticos associados a seus custos muitas vezes dispendiosos e procuram substituí-los pelo uso de plantas medicinais (TOMAZZONI et al 2006)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar o potencial antimicrobiano de espécies da família Myrtaceae, Asteraceae, Anacardiaceae e Oxalidaceae

3.2 Objetivos Específicos:

- Verificar a ação antimicrobiana de espécies da família Myrtaceae, Asteraceae, Anacardiaceae e Oxalidaceae frente a micro-organismos teste.
- Determinar da CIM do fragmento foliar que apresentarem atividade frente aos micro-organismos teste.
- Verificar a toxicidade do extrato que apresentarem atividade frente aos micro-organismos teste frente à larva de Artêmia.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde os primórdios da humanidade, o homem se dedica a estudar os efeitos terapêuticos das plantas, e com a evolução da Ciência Farmacêutica, novas ferramentas vem permitindo avaliar esses efeitos, gerando conhecimento científico embasado no uso popular de certas plantas (CALIXTO,2003).

O Brasil detém 20% de todas as espécies vegetais do planeta, representando um grande desafio, o aproveitamento racional de sua biodiversidade visando a produção de medicamentos, com base no imenso patrimônio natural de suas riquezas (CALIXTO, 2003).

Os estudos antimicrobianos na farmacoterapia evoluíram consideravelmente nos últimos cinquenta anos, possibilitando o controle efetivo de muitos microrganismos patogênicos através de vários mecanismos. Uma das principais fontes de investigação na busca por novas substancia com potencial antimicrobiano são as espécies vegetais, uma vez que estas possuem como principal mecanismo de defesa contra seus predadores, a síntese de compostos originados de vias metabólicas secundarias (LIMA, 2001).

A busca de novas substâncias com propriedades antimicrobianas vem se intensificando a cada dia, dado o número cada vez maior de microrganismos que apresentam resistência aos antibióticos usuais (ALENCAR,2009)

Os naturais ganham espaço, a preferência por eles têm sido uma realidade marcante e, sobretudo a adoção de terapias com uso de plantas medicinais, nesse contexto as farmácias de manipulação, empresas ligadas à farmacologia ganham espaço, e investem em pesquisas para o descobrimento e fabricação de novos medicamentos. (ElvinLewis,2001).

As pesquisas com produtos naturais tem aumentado nos últimos anos devido a busca por novos produtos com maior atividade farmacológica, com menor toxicidade e mais biocompatíveis, além de apresentarem custos mais acessíveis a população (CASTILHO et al., 2007).

Com base no uso e conhecimento popular, o importante crescimento mundial da fitoterapia dentro de programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme (BUFFON et al., 2001).

As plantas medicinais, utilizadas há milhares de anos, constituem importantes recursos terapêuticos para o tratamento da saúde humana e servem de base para estudos na produção de novos fármacos (MACEDO et al., 2002). Estima-se que 80% da população dos países em desenvolvimento fazem uso de fitoterápicos, sendo que 85% destes possuem extratos de plantas medicinais (OMS, 1991).

A eficácia antimicrobiana aparente da planta original depende de fatores como o método de extração dos óleos essenciais, fase de crescimento, meio de cultura utilizado e propriedades extrínsecas e intrínsecas dos alimentos, tais como pH, teor em gordura, proteína, água, antioxidantes e conservantes, assim como o tempo de incubação/temperatura de incubação.

O consumidor tem se tornado cada vez mais exigente e mais criterioso com a qualidade do produto que consome. É crescente a sua preocupação em fazer uso de produtos menos agressivos de origem natural ou o mais próximo possível desta origem (PACKER, 2006).

Substâncias antimicrobiana ou antibiótica constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, e além de prevenir o desenvolvimento de microorganismos resistentes devem apresentar ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro e estabilidade química, entre outras características (COWAN, 1999)

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobiana tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Em amplos estudos sobre plantas medicinais foi feita uma avaliação concreta sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de espécies vegetais (LIMA, 2001)

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material vegetal

As folhas das espécies da família da Myrtaceae, Asteraceae, Anacardiaceae e Oxalidaceae, foram coletadas em plantas domesticas e em plantas nativas da reserva do Campus da UFAM e confirmadas às espécies no Herbário do ICB-UFAM.

5.2 Preparação das amostras

O material coletado (folhas) foi triturada e diluído em água destilada na proporção 1/1(p/v), centrifugada 8000 xg, o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,22 µm e armazenado em tubo Falcon15mL. As folhas também foram submetidas à secagem para desidratação à 50 °C por 24 h, posteriormente trituradas, ambos os extratos foram conservados ao abrigo de luz e umidade (adaptado da metodologia de CUNICOET al., 2004).

5.3 Definições do espaço amostral

Devido ao grande número de plantas nativas presentes na área da reserva do Campus Universitário/Ufam-Manaus e o mesmo de plantas domesticas na cidade de Manaus, há a necessidade de delimitação do número de amostras a serem analisadas. Foram coletados três (3) indivíduos por espécie e cinco (5) espécies por família, totalizando 60 indivíduos.

5.4 Ensaio biológicos

Foram utilizados no teste do potencial antimicrobiano das amostras selecionadas, os métodos de difusão em ágar (Kirby-Bauer) e se confirmadas à presença de antagonismo foi realizado bioautografia para se determinar o “Rf” das moléculas antibióticas (CUNICO et al., 2004), Os micro-organismos teste foram os sugeridos por Cruz Filho et al. (2007) identificados na tabela 1.

<i>Candidaalbicans</i> 78	Micotec-DPUA-UFAM.
<i>Escherichia coli</i> 123	CPqLMD-Fiocruz/AM.
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 73	INCQ-Fiocruz
<i>Staphylococcus aureus</i> 26	CPqLMD-Fiocruz/AM

Tabela 1 - Micro-organismos s-teste a serem utilizados nos teste antimicrobianos.

Os micro-organismos testes foram repicadas em meio Plate Count Agar (PCA) e incubadas à 37 °C por 24 h antes de cada teste. Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada micro-organismo foram padronizadas em salina estéril segundo a escala 0,5 de Mac Farland. A Semeadura foi do tipo tapete utilizando “Swab”, os extratos foram colocados em “Cupplate” e incubados a 37 °C por 24 h (CUNICO et al., 2004).

5.5 Determinações da concentração inibitória mínima (CIM)

Os extratos que apresentou resultados positivos nos ensaios biológicos foram pesados e realizados diluições seriadas ao dobro em água destilada (200mg/2mL). Transferindo-se um mL dessa diluição para o tubo subsequente, cujo procedimento repete-se até a diluição de 10^{-8} . Em cada tubo, contendo as respectivas diluições, adicionando-se 19,0 mL de ágar Mueller-Hinton, que foram vertidas em placas de Petri. Dessa forma, obteve-se a faixa de concentração de 5 a 0,04 mg/mL. A Semeadura foi tipo tapete utilizando “Swab”, incubados por 24 h a 37 °C. A CIM foi considerada a menor concentração que inibiu o desenvolvimento microbiano (FERNANDES et al., 2005).

5.6 Teste toxicidade com *Artemia*

A toxicidade foi determinada pelo teste frente a *Artemia salina*, segundo a metodologia descrita por Graça et al. (2010). O teste de mortalidade foi realizado em triplicada dentro de poços individuais de placas multipoços 6x4 aos quais foram inseridas alíquotas de 100 µL a 1000 µL do extrato e 1000 µL de suspensão de “nauplios” previamente eclodidos em solução de sal marinho não iodado 3% (p/v). No controle utilizou-se apenas solução salina. O ensaio foi mantido sob luminosidade constante a 30 °C, por 24 horas. Após esse período, a mortalidade de larvas de *A.salina* foi determinada em estéreo-microscópio com base na imobilidade interna ou externa, observada durante 20 seg. Ao término da contagem dos náuplios mortos, adicionou-se formol em cada poço para contagem do total de larvas presentes. A taxa de mortalidade foi determinada dividindo-se o número de náuplios mortos pelo número total de indivíduos e multiplicando o resultado por 100. O grau de toxicidade foi classificado de acordo a

mortalidade observada: 0-9% = não tóxico (NT); 10-49% = ligeiramente tóxico (LT); 50-89% = tóxico (T); 90-100% = altamente tóxico (AT).

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das coletas de material

Foram coletadas todas as amostras vegetais das famílias Myrtaceae, Oxalidaceae, Anacardiaceae. A Coleta das amostras vegetais da família Asteraceae não pôde ser realizada.

Da seleção dos gêneros das famílias foram selecionados;

Da Família Myrtaceae: Gênero Eugenia, Gênero Myrcia, Gênero Myrciaria, Gênero Psidium

Da Família Oxalidaceae: Gênero Averhoa, Gênero Oxalis

Da Família Anacardiaceae : Gênero Anacardium, Gênero Mangifera, Gênero Spondias, Gênero Tapirira

A seleção dos gêneros das famílias foi de acordo com os mesmo existentes no campus da UFAM, de acordo, com os dados disponíveis no herbário

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

No estudo referente a com concentração inibitória mínima (CIM), foi observado que a concentração 10^{-1} do extrato bruto da amostra da Amostra CA da família Myrtaceae n°1 apresentou inibição frente a *Staphylococcus aureus*. O extrato foliar de carambola (*A. carambola* L.) apresentou atividade antifúngica (17mm) e a CIM apresentou inibição na concentração 10^{-2} .

Nas demais amostras a concentração inibitória mínima não ocorreu. Todas as diluições apresentaram turvação, mostrando que a concentração dos extratos não eram adequadas ao teste antimicrobiano.



Figura 1: Halos de inibição da amostra 1 e 2 frente a *Staphylococcus aureus* em placa de Agar PCA. Fonte: Cavalho, N. O. (2013)

Obs. A bioautografia e o teste de Artêmia serão refeitos a ser apresentado na próxima submissão e no Conic.

7 CONCLUSÃO

- As famílias Myrtaceae, Anacardiaceae e Oxalidaceae apresentam potencial biotecnológico no que se refere a atividade antimicrobiana.

R8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALENCAR, B. C.M.; LUCENA, J. M. V.M.; PAES, L. S. Avaliação da atividade biológica de alguns extratos naturais sobre *Enterococcusfaecalis*. In: Anais da 61^o Reunião anual da SBPC,Manaus, 2009.
- ARAÚJO, N. R. R. (2010). Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre micro-organismos s relacionados à lesão de mucosite oral. Dissertação. Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal Do Pará- UFPA.
- BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos e essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil.Infarma, v.17, n. 3/4,p. 80-83, 2005.
- BRASIL, PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 23 jun. 2006.
- CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, NS. M.S.A.Q.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia, Ano. V, n. 11, Jun. 2007.
- CRUZ FILHO, R. F; FERNANDES, O. C. C; PORTO, A. L. F; TEIXEIRA, M. F. S. Produção de Pigmentos por Espécies de Serratia Isoladas da Amazônia. In: XVI Simpósio Brasileiro de Fermentação. Anais eletrônicos, Curitiba: UFP, 2007.
- CUNICO, M. M.; CARVALHO, J. L. S.; KERBER, V. A.; HIGASKINO, C. E. K.; CRUZ ALMEIDA, S. C.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottoniamartiana*Miq. (Piperaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 14, n. 2, p.97-103, 2004.
- FERNANDES, T. T.; SANTOS, A. T. F.; 2 E PIMENTA, F. C. Atividade antimicrobiana das plantas: *Plathymeniareticulata*, *Hymenaeacourbaril* e *Guazumaulmifolia*. Revista De Patologia Tropical. v. 34, n. 2, p.113-122. maio-ago. 2005.
- GRAÇA, R. R.; TEIXEIRA, M. F.; SILVA, A. B.; PALHETA, R. A.; SILVA, T. A.; LIMA, E. S. Avaliação citotóxica do chá da espécie Amazônica *Licariapuchury*-major. In: anais 62^a Reunião Anual da SBPC, UFRN, Natal-RN, 2010.
- OMS (Organização Mundial da Saúde)
<http://www.who.int/mediacentre/news/notes/2004/np3/en/> acessado em 06/04/2012
- VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants; safe cure. Química Nova, v. 28, p. 519-528, set. 2005.

