

CONIC-SEMESP

13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DOS EXTRATOS HIDROALCÓOLICO DE CYMBOPOGON CITRATUS, CHENOPODIUM AMBROSIODES, ALLIUM SATIVUM, ALLIUM CEPA E CASCA DE SACCHARUM OFFICINARUM E PUNICA GRANATUM SOBRE BACTERIAS E FUNGOS DE INTERESSE CLÍNICO.

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUIÇÃO: CENTRO UNIVERSITÁRIO DO MARANHÃO

AUTOR(ES): NADINE CUNHA COSTA, ENZO ELDER COSTA RIBEIRO

ORIENTADOR(ES): PATRÍCIA DE MARIA SILVA FIGUEIREDO

Realização:



Apoio:



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DOS EXTRATOS HIDROALCÓOLICO DE *Cymbopogon citratus*, *Chenopodium ambrosioides*, *Allium sativum*, *Allium cepa* E CASCA DE *Saccharum officinarum* e *Punica granatum* SOBRE BACTERIAS E FUNGOS DE INTERESSE CLÍNICO.

RESUMO DO TRABALHO

Com o surgimento de novas doenças infecciosas, o reaparecimento de várias infecções que pareciam ter sido controladas, e o aumento da resistência bacteriana existe a necessidade de pesquisas dirigidas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

Nos países em desenvolvimento as doenças estão relacionadas com a falta de saneamento básico, desnutrição e dificuldade de acesso aos medicamentos (KUMATE, 1997). Neste contexto e decorrente do uso etnomedicinal, a fitoterapia é amplamente praticada. Entre as plantas medicinais mais utilizadas pela população poucas têm ação comprovada.

A utilização de produtos naturais pelo homem é tão antiga quanto sua própria história. Seu uso se dava tanto para fins nutricionais como para fins terapêuticos. Produtos naturais de algumas plantas, fungos, bactérias e outros organismos continuam a ser usados em preparações farmacêuticas, e em composto puro ou extratos (ARAÚJO ; LEON, 2001).

Portanto, diante do exposto e principalmente à resistência dos microorganismos frente aos antimicrobianos disponíveis e tendo em vista a riqueza de fontes naturais, especialmente de origem vegetal como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento, pretende-se com este trabalho, avaliar a atividade antimicrobiana de diversos extratos hidroalcoolicos de plantas contra bactérias de interesse clínico.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de plantas contra bactérias e fungos patogênicos.

Específicos

Verificar a atividade microbicida *in vitro* da tintura etanólica das plantas de uso popular contra espécies bacterianas (ATCC) e isolados clínicos de espécies de bactérias através do método de disco- difusão;

Determinar quantitativamente a atividade antimicrobiana *in vitro* da tintura etanólica das plantas de uso popular sobre amostras bacterianas através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM);

Analisar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de plantas com atividade antimicrobiana de uso popular contra microrganismos patogênicos através da determinação da concentração microbicida mínima (CMM).

METODOLOGIA

Teste de Difusão em meio sólido:

Para a análise microbiológica, culturas bacterianas desenvolvidas em BHI por 24 horas foram diluídas convenientemente (cerca de 10^8 UFC/mL) e semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton. A seguir, discos de papel de filtro impregnados com a tintura serão colocados sobre a superfície do ágar inoculado.

Concentração Inibitória Mínima (CIM): A determinação da CIM será realizada em meio líquido, através da técnica de macrodiluição (PHILLIPS, 1991; PIDDOCK, 1990). Para isto, cada suspensão bacteriana será homogeneizada em caldo BHI na proporção 1:1000 (v/v), de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL. Após a homogeneização, 3ml serão transferidos em tubos de vidro estéreis, sendo posteriormente pipetados 3ml de diluições seriadas em 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 estéreis da tintura das folhas do ou controle negativo (etanol 30%). Os tubos serão em seguida homogeneizados com auxílio de um vórtex em baixa velocidade e incubados nas mesmas condições descritas anteriormente. A CIM será a menor concentração da tintura etanólica onde não houver crescimento.

Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os tubos incubados para determinação da CIM em meio líquido serão utilizados para determinação da CFM (PHILLIPS, 1991; PIDDOCK, 1990). Uma alíquota (1ml) será inoculada em placas de Muller Hinton e posteriormente as placas incubadas em ambiente a 37°C por 18-24h. A CBM será a menor concentração do extrato onde não houver crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte microbiana).

RESULTADOS

Os extratos etanólicos brutos de *S. officinarum* na concentração de 0,3 g/mL testados, não obtiveram a presença de halos de inibição sobre nenhuma das cepas ATCC e isolados clínicos utilizadas no teste demonstrando ausência de atividade inibitória tanto em bactérias como em fungos, somente apresentando halo no controle positivo Cloranfenicol (1g/10mL) para bactérias e Fluconazol (0,0128g/10mL) para controle positivo dos fungos. De acordo com estudos da atividade antimicrobiana de vários compostos frente as diversos microrganismos foram propostos valores que têm sido considerados como referência e que seguem a seguinte interpretação: inibição alta - CIM até 0,5 mg/mL; inibição moderada- CIM entre 0,6 e 1,55 mg/mL; inibição baixa – CIM acima de 1,65 mg/mL⁽¹⁸⁾. Para a detecção da CIM do extrato etanólico bruto da casca de *S. officinarum* observou-se que as concentrações necessárias para obtenção da atividade antimicrobiana variaram entre 18 a 75 mg/mL. Para os fungos, a CIM foi determinada como 18 mg/mL para *C. parapsilosis*, 75 mg/mL para *C. tropicalis* e 37 mg/mL para as demais espécies. Já para as bactérias verificou-se CIM de 37 mg/mL para bactéria *P. aeruginosa* e nenhuma atividade para as outras bactérias testadas.

O resultado dos testes da detecção da atividade *in vitro* da tintura hidroalcoólica das cascas da romã por disco difusão em meio sólido c estudadas foram sensíveis à tintura hidroalcoólica das cascas da romã *Punica granatum* (0,4g/mL) com exceção da *Escherichia coli*. Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado por Burt e Reinder (2003) onde não foi observado efeito inibitório desta espécie sobre *Escherichia. coli*. Já em um estudo realizado por Michelin, *et al.*,(2005), o extrato etanólico de romã (*Punica granatum*) apresentou halo de 11 mm, frente à cepa de *E. coli*.

Os tamanhos dos halos de inibição de crescimento bacteriano, variaram entre 10mm e 15mm como demonstrado (Figura 1).



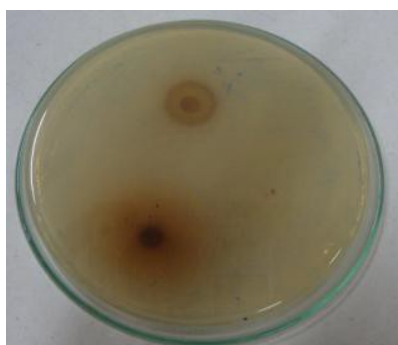
S. aureus

S. pyogenes

E.coli

Figura 1: Halo de crescimento bacteriano

Todos os fungos estudados foram sensíveis a tintura hidroalcoólica das cascas da romã *Punica granatum* (0,4g/mL). O fungo *Candida albicans* foi o mais sensível ao efeito da tintura de *Punica granatum*, pois apresentou halo de inibição de crescimento microbiano de 15mm. Tais resultados podem explicar o uso etnobotânico da espécie estudada para o tratamento de várias doenças infecciosas.



C. albicans

Nos testes para detecção da Concentração Inibitória mínima (CIM) os resultados observados confirmam os encontrados no teste de difusão em meio sólido e demonstram que as concentrações mínimas necessárias para obtenção de atividade antimicrobiana nas bactérias e fungos verificados foram de 0,10 g/mL para *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, e 0,20 g/mL para *Staphylococcus aureus*. 0,03 g/mL

para *Candida albicans*, *C.parapsilosis*, *C.rugosa*, *C. glabrata* e 0,05 g/mL para *C.tropicalis*.

No teste de difusão em meio sólido não houve presença de halo de inibição para nenhum dos microrganismos utilizados nos extratos de *Cymbopogon citratus*, *Chenopodium ambrosioides*, testados nesta pesquisa, somente apresentando halo no controle positivo cloranfenicol (1g/10mL) para bactérias e fluconazol (0,0128g/10mL) para controle positivo dos fungos.

No teste para detecção da CIM da tintura de folhas de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) observou-se que as concentrações necessárias para obtenção da atividade antimicrobiana variaram entre 50 a 25 mg/mL.

Para os fungos, a CIM foi determinada como 50 mg/mL para *Candida parapsilosis* e 25 mg/ml para todas as outras espécies de *Candida* analisadas. Já para as bactérias, verificou-se CIM de 50 mg/mL para bactérias Gram-positivas e *Acinetobacter* spp é de 25 mg/mL para as outras espécies Gram negativas analisadas.

No teste para detecção da CIM da tintura de folhas *Cymbopogon citratus* (Capim Limão) observou-se que as concentrações necessárias para obtenção da atividade antimicrobiana variaram entre 25 a 6,25 mg/mL. Para os fungos, a CIM foi determinada como 6,25 mg/mL para *Candida parapsilosis*, *C.glabrata* e *C.rugosa*; para as espécies *C. tropicalis* e *C.albicans* foi obtido um resultado de 25 e 12,5 mg/mL, respectivamente. A atividade antifúngica de *Cymbopogon citratus* frente a diferentes espécies de dermatófitos foi avaliada e verificou-se ação contra tais fungos¹². Já para as bactérias verificou-se CIM 25 mg/mL para bactérias Gram-positivas e *E.coli* 12,5 mg/mL.

Nos testes de detecção da atividade *in vitro* da tintura hidroalcoólica 50%, obtida a partir dos bulbos de alho, *A. sativum*, e cebola *A. cepa*, os resultados demonstraram ausência de atividade inibitória tanto em bactérias como em fungos. Os extratos em estudo não foram capazes de inibir o crescimento das bactérias e fungos testados, evidenciando a resistência das mesmas.

Entretanto nos testes para determinação da CIM realizados em meio de cultura líquido, a tintura hidroalcoólica 50% dos bulbos de alho, apresentou atividade inibitória principalmente contra as espécies de *Candida* sp com CIM de 6,25 mg/mL.

A concentração inibitória mínima (CIM) para obtenção de atividade antimicrobiana foi entre 50mg/mL e 12,5mg/mL para as espécies bacterianas estudadas.

Este resultado é semelhante ao descrito em um trabalho que avaliou a atividade antimicrobiana do extrato do alho *A. sativum* contra cepas resistentes de *S. mutans*. Observaram que a cepa em estudo foi sensível ao extrato do alho nessas mesmas concentrações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, diante do exposto e principalmente à resistência dos microorganismos frente aos antimicrobianos disponíveis e tendo em vista a riqueza de fontes naturais, especialmente de origem vegetal como uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas como medicamento é importante que se estude o potencial dos produtos naturais contra microorganismos patogênicos.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, A.L.; SCHWAN, R F.; DIAS,D.R.; SCHWAN-ESTRADA,K.R.F.;BRAVO-MARTINS, C.E.C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactéria patogênicas humanas. **Rev Bras Pl. Med.**, Botucatu, v 9, p.98-91, 2007.

ARAÚJO, C.A.C. & Leon L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. Vol. 96, p.723-728. 2001.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In:**Antibiotics in Laboratory Medicine**, ed. 3, edited by V. LORIAN, Willians & Wilkins, Baltimore, ch. 21. 1991.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. **Plantas medicinais do cultivo a terapêutica**. 2 ed.1991.

DI STASI, Luís Claudio. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo, editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

DINIZ MFFM, Oliveira RAG, Medeiros ACD, Malta Júnior A. Memento Fitoterápico: **as plantas como alternativa terapêutica**: aspectos populares e científicos. João Pessoa: Editora Universitária; 1997.

ELISABETSK E 1987. **Pesquisa em plantas medicinais**. *Ciências e Cultura* 39: 607-702

KUMATE 1997. Infectious disease in the 21st century. *Arch Med Res* 28: 155-161.

LANSKY, E.; SHUBERT, S.; NEEMAN I. **Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate**. Israel: CIHEAM-Options Mediterraneennes, 231-235, 2004.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil** – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001. 1088p.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: IOCE, 1989, 2v, p74- 5.

MIYAKE, M. A.; CANIELLO, M.; BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Inquérito, sobre uso de plantas medicinais para tratamento de afecções otorrinolaringológicas entre pacientes de um hospital pública terciário. São Paulo: Caderno de Debates da RBORL,70: 43-55, 2004.

National Committee for clinical Laboratory Standards – NCCLS. Performance

PAZHANI, G.P. et al. Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* Type 1 strains associated with epidemic and sporadic dysenteries in Eastern India. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.2, p.681-4, 2004.

PHILLIPS, I. A guide to sensitivity testing **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. N.27, p.1-50, 1991.

PIDDOCK, L.J.V. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, 68, p.307-318, 1990.

