

Charles Teilor Rodrigues, Walter O. Beys da Silva, Lucélia Santi, Jorge A. Guimarães & Marilene H. Vainstein

Centro de Biotecnologia, UFRGS

INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas são responsáveis por elevadas taxas de mortalidade. Estima-se que ocorram cerca de 50.000 óbitos por dia relacionados a este tipo de doença¹. Atualmente, a situação ainda torna-se mais complicada devido ao uso indiscriminado de antibióticos, o que contribui para o aumento do número de microrganismos patogênicos resistentes aos fármacos antimicrobianos disponíveis no mercado¹. Portanto, o descobrimento de novos princípios ativos capazes de propiciar a adoção de procedimentos terapêuticos mais seguros é importante para a diminuição das taxas de mortalidade. Nesse sentido, os produtos naturais oriundos de fontes vegetais parecem ser bastante promissores, uma vez que plantas produzem uma ampla variedade de compostos com propriedades terapêuticas².

OBJETIVO

Detectar e caracterizar atividade antimicrobiana presente em extratos de sementes de diferentes plantas nativas de diversos estados brasileiros, e de extratos de folhas de uma planta da Amazônia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de Sementes e folhas

Estão sendo utilizadas trinta e seis espécies de sementes provenientes de diferentes locais do Brasil. Vinte sementes foram coletadas de diferentes estados amazônicos pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), quinze sementes foram coletadas no Rio Grande do Sul e uma na Bahia. Neste trabalho foi testado extrato de folhas de uma planta da Amazônia também coletada pelo INPA.

Maceração de Sementes

As sementes foram pesadas, contadas e moídas em um moinho de facas por aproximadamente 10 minutos. O pó resultante foi peneirado, pesado e armazenado a -20 °C.

Extrato de Sementes

Foram preparados dois tipos de extratos: extrato aquoso e hidroalcoólico (50%). Para o extrato aquoso, a cada 1g de pó foram adicionados 20mL de água Milli Q (10mL+ 10mL) mantido em agitação por 4 horas. Para o extrato etanólico, a cada 0,5g de pó foram adicionados 10mL solução hidroalcoólica 50% (5mL + 5mL) mantido em agitação por 4 horas. As soluções resultantes foram centrifugadas, alíquotadas e estocadas a -20 °C.

Extrato de Folhas

Foram preparados dois tipos de extratos: extrato aquoso e hidroalcoólico (70%). Para o extrato aquoso, 115g de folhas foram moídas no moinho de facas com 400mL de água destilada por 15 minutos. Para o extrato hidroalcoólico (70%) 115g de folhas foram postas em infusão em 400mL de solução (200mL + 200mL) por quatro semanas. As soluções resultantes foram filtradas, centrifugadas e alíquotadas.

Quantificação de Proteínas Totais:

Foi utilizado o método de BCA, com albumina sérica bovina como padrão.

Teste de Difusão em Disco

Os testes foram realizados seguindo as normas presentes no manual do NCCLS M2-A8 com algumas modificações³. Foram testados os seguintes microrganismos: *Candida albicans* ATCC 22019 e os isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* H99, *C. gatti* R265 e *C. gatti* R272. As leveduras foram cultivadas em meio Sabouraud (16h, 37 °C). Suas concentrações foram ajustadas para 0,5 da escala de McFarland e plaqueadas por espalhamento em meio Sabouraud. Discos de papel filtro preparados com 20µl de extrato das plantas ou 20µl de fluconazol a 25µg/ml (controle) foram dispostos em diferentes pontos sobre o meio inoculado. As placas foram incubadas a 37 °C e examinadas após 24 horas.

REFERÊNCIAS

- 1- Ahmad e Beg (2001) Journal of Ethnopharmacology 74: 113-123
- 2- A.L.Gonçalves et al (2005) Arq.Inst.Biol., São Paulo, v.72, n.3: 353-358
- 3- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 USA, 2003.
- 4- ANVISA - NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada - Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS Estados Unidos, 2002.

Teste de Microdiluição em Caldo

Os testes foram realizados seguindo as normas presentes no manual do NCCLS M27-A2 com algumas modificações⁴. As leveduras foram cultivadas por aproximadamente 24 horas a 37 °C em meio líquido Sabouraud. Suas concentrações foram ajustadas para 0,5 da escala de McFarland e diluídas 1:50 e 1:20 consecutivamente. Os microrganismos foram testados com os extratos das plantas em diferentes concentrações (volumes), variando entre 0,75µL e 100µL. As placas foram incubadas a 37 °C e examinadas após 48 e 72 horas.

RESULTADOS

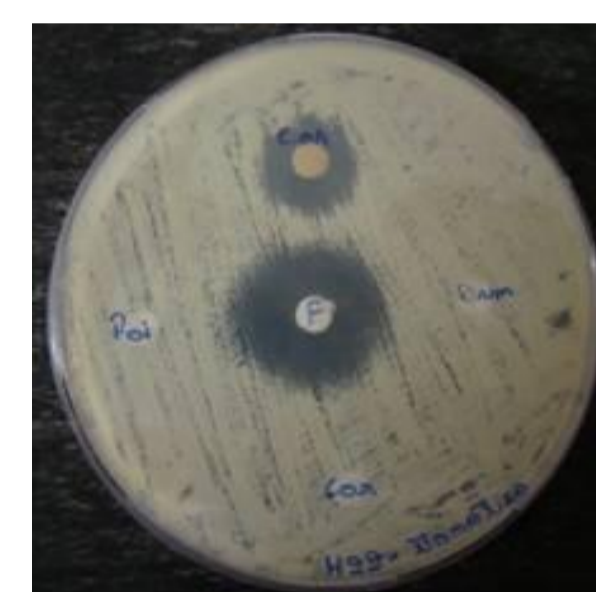


Figura 1- Teste de difusão em disco de diferentes extratos etanólicos de folhas (INPA-Cas) e de sementes (CB-Pai, CB-Car e CB-Orm) contra *Cryptococcus neoformans* H99.

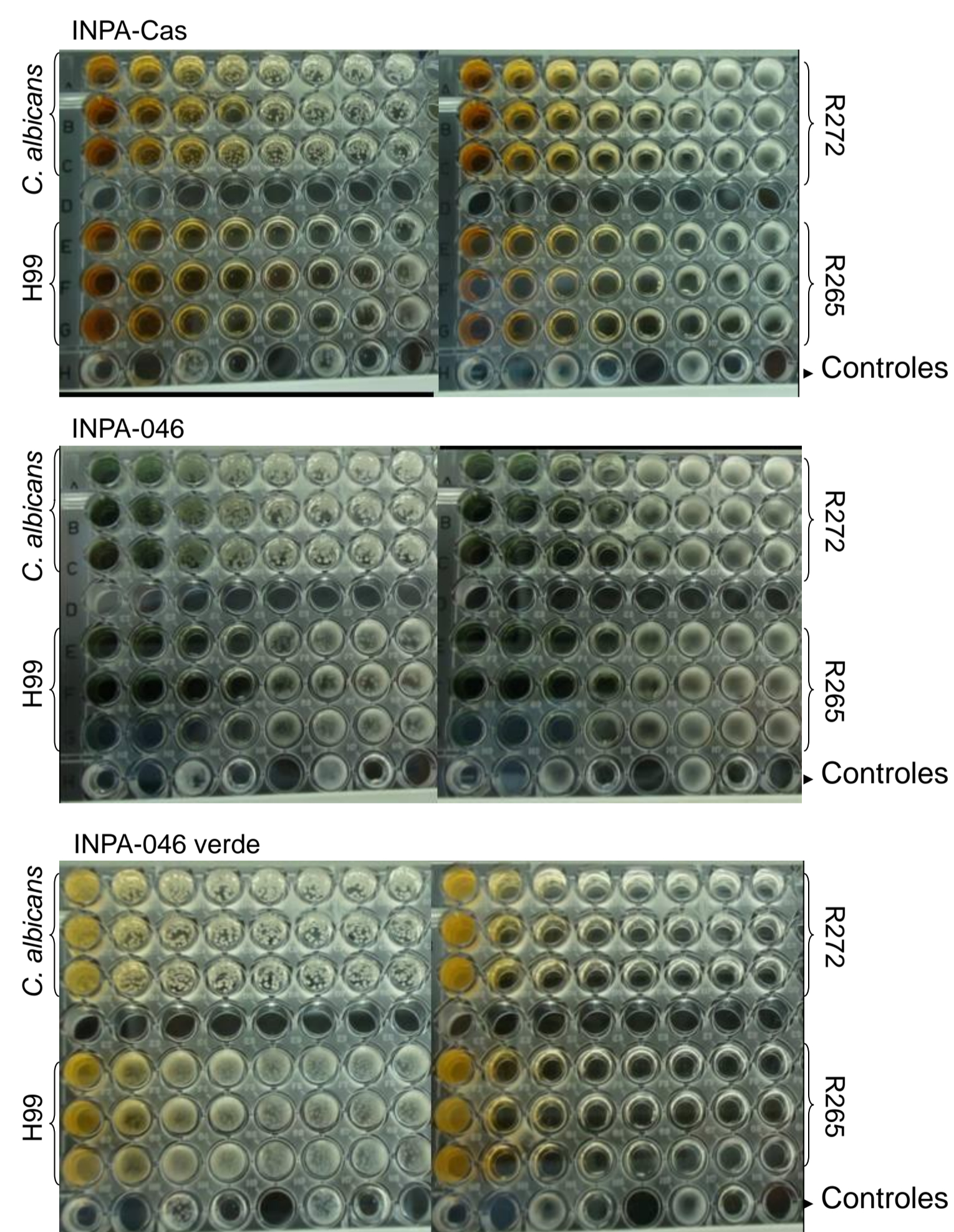


Figura 2- Microdiluição em caldo de diferentes extratos aquosos de folhas (INPA-Cas) e de sementes (INPA-046 e INPA-046 verde) contra diferentes microrganismos: H99 - *Cryptococcus neoformans* H99; R265 - *C. gatti* R265; R272 - *C. gatti* R272 e *C. albicans* - *Candida albicans*;

CONCLUSÕES

Com o teste de difusão em disco, foi identificada atividade antimicrobiana contra *Cryptococcus gatti* e *C. neoformans*, utilizando extratos de sementes e folhas de plantas.

Até o momento, todos os extratos testados no teste de microdiluição em caldo vem confirmando os resultados obtidos no teste de difusão em disco.

Para realizar a seleção inicial das atividades antifúngicas dos diferentes extratos o teste de microdiluição em caldo foi mais efetivo, apresentando resultados com pouca variação.

PERSPECTIVAS

Testar novamente todos os extratos utilizando a metodologia de microdiluição em caldo e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada extrato selecionado.

Realizar o teste de microdiluição em caldo com outros microrganismos.