

Charles Teilor Rodrigues, Markus Berger, 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 e estima-se que ocorram cerca de 50.000 óbitos por dia relacionados a este tipo de doença<sup>1</sup>. Atualmente, a situação torna-se ainda mais complicada devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, contribuindo para o aumento do número de microrganismos patogênicos resistentes aos fármacos disponíveis no mercado<sup>1</sup>. Portanto, o descobrimento de novos princípios ativos capazes de propiciar a adoção de procedimentos terapêuticos mais eficientes é importante para a diminuição das taxas de mortalidade. Nesse sentido, produtos oriundos de fontes vegetais são promissores, uma vez que plantas produzem uma ampla variedade de compostos com propriedades terapêuticas<sup>2</sup>. Substâncias com atividade antimicrobiana têm sido predominantemente obtidas a partir de extratos de folhas de diferentes plantas, entretanto, poucos estudos utilizando sementes têm sido realizados com este intuito.

## OBJETIVO

Detectar e identificar a atividade antimicrobiana presente em extratos de sementes de diferentes plantas nativas de diversos estados brasileiros.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta de Sementes

Estão sendo utilizadas quarenta espécies de sementes provenientes de diferentes locais do Brasil. Vinte e uma sementes foram coletadas de diferentes estados amazônicos pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), dezessete sementes foram coletadas no Rio Grande do Sul e duas na Bahia.

### Maceração de Sementes

As sementes foram pesadas, contadas e moídas em um moinho de facas por aproximadamente 10 minutos. O pó 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.

### Teste de Difusão em Disco

Os testes foram realizados seguindo as normas presentes no manual do NCCLS M2-A8 com algumas modificações<sup>3</sup>. 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 (overnight a 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.

### Teste de Microdiluição em Caldo

Os testes foram realizados seguindo as normas presentes no manual do NCCLS M27-A2 com algumas modificações<sup>4</sup>. As leveduras foram cultivadas em meio Sabouraud (overnight a 37 °C). 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 volumes, variando entre 0,75µL a 100µL. As placas foram incubadas a 37 °C e examinadas após 48 e 72 horas.

## REFERÊNCIAS

- Ahmad e Beg (2001) Journal of Ethnopharmacology 74: 113-123
- A.L.Gonçalves et al (2005) Arq.Inst.Biol., São Paulo, v.72, n.3: 353-358
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 USA, 2003.
- 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.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES, UFRGS

## RESULTADOS

### Difusão em Disco

Tabela 1. Teste de difusão em disco com extratos de sementes

| RS   | Extratos aquosos |          |          |          | Extratos hidroalcoólicos |          |          |          |
|------|------------------|----------|----------|----------|--------------------------|----------|----------|----------|
|      | Cand             | H99      | R265     | R272     | Cand                     | H99      | R265     | R272     |
| CB 1 | neg              | Positivo | Positivo | Positivo | neg                      | neg      | Positivo | Positivo |
| CB 7 | neg              | Positivo | neg      | neg      | neg                      | Positivo | Positivo | neg      |

Cand: *Candida albicans*; H99: *Cryptococcus neoformans*; R265 e R272: *C. gatti*; neg: negativo.

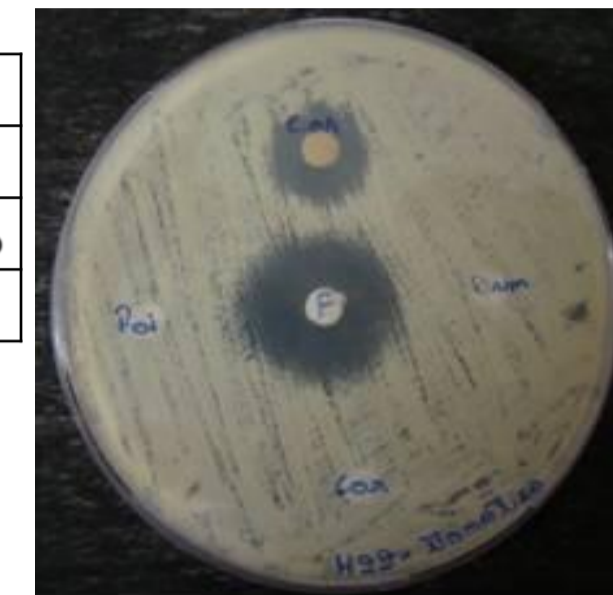


Figura 1. Teste de difusão em disco de diferentes extratos etanólicos de semente contra *Cryptococcus neoformans* H99. Fluconazol no centro, CB-7 (positivo), CB-3, CB-11 e CB-15 (sentido horário).

### Microdiluição em Caldo

Tabela 2. Teste de microdiluição em caldo de extratos de sementes contra fungos patogênicos.

| Amazônia | Extratos aquosos |          |          |          | RS    | Extratos aquosos |          |          |          |
|----------|------------------|----------|----------|----------|-------|------------------|----------|----------|----------|
|          | Cand             | H99      | R265     | R272     |       | Cand             | H99      | R265     | R272     |
| INPA 1   | Positivo         | Positivo | neg      | neg      | CB 1  | neg              | Positivo | Positivo | Positivo |
| INPA 2   | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 2  | neg              | Positivo | Positivo | Positivo |
| INPA 3   | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 3  | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 4   | Positivo         | Positivo | Positivo | Positivo | CB 4  | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 5   | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 5  | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 6   | neg              | neg      | Positivo | Positivo | CB 6  | Positivo         | Positivo | Positivo | Positivo |
| INPA 7   | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 7  | Positivo         | Positivo | Positivo | Positivo |
| INPA 8   | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 8  | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 9   | Positivo         | Positivo | Positivo | Positivo | CB 9  | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 10  | neg              | neg      | Positivo | Positivo | CB 10 | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 11  | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 11 | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INAP 12  | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 12 | Positivo         | Positivo | Positivo | Positivo |
| INPA 13  | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 13 | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 14  | Positivo         | Positivo | Positivo | Positivo | CB 14 | Positivo         | Positivo | Positivo | Positivo |
| INPA 15  | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 15 | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 16  | neg              | neg      | neg      | neg      | CB 16 | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 17  | Positivo         | Positivo | Positivo | Positivo | CB 17 | Positivo         | Positivo | neg      | neg      |
| INPA 18  | neg              | neg      | neg      | neg      |       |                  |          |          |          |
| INPA 19  | neg              | neg      | neg      | neg      | Bahia |                  |          |          |          |
| INPA 20  | neg              | neg      | neg      | neg      | B 1   | neg              | neg      | neg      | neg      |
| INPA 21  | Positivo         | neg      | neg      | neg      | B 2   | neg              | neg      | neg      | neg      |

Cand: *Candida albicans*; H99: *Cryptococcus neoformans*; R265 e R272: *C. gatti*; neg: negativo.

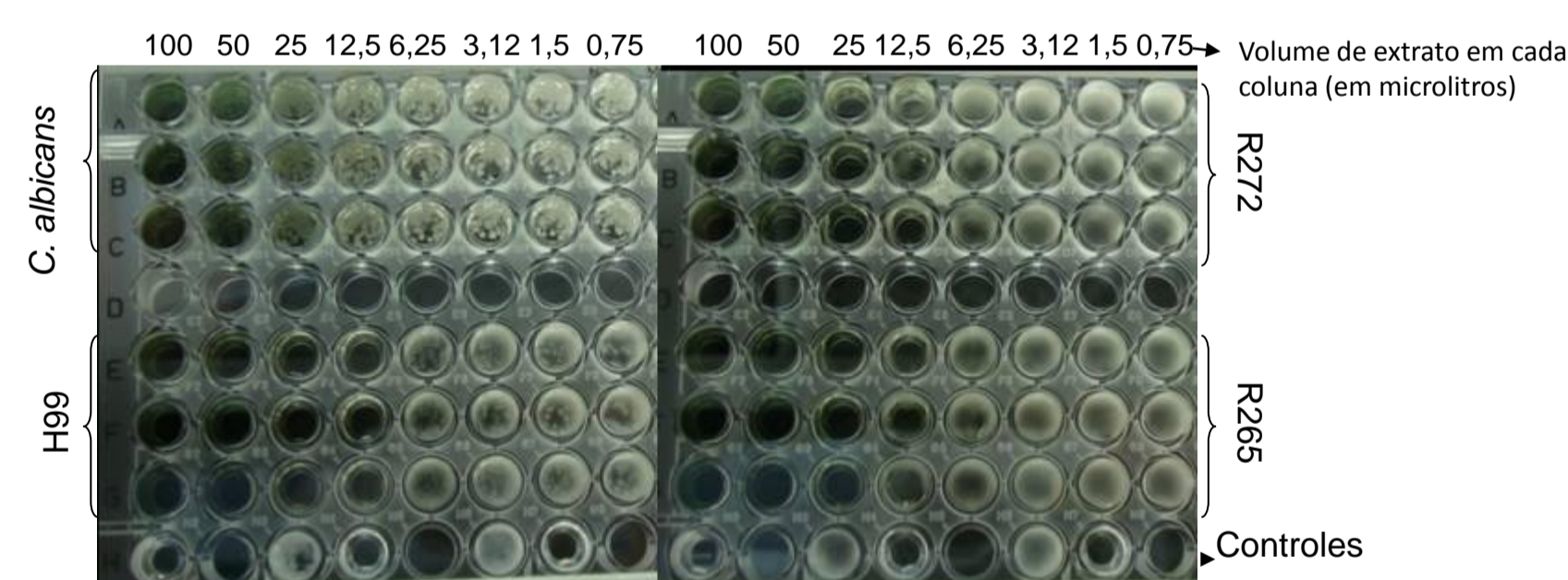


Figura 2. Teste de microdiluição em caldo do extrato aquoso da semente (CB-1) contra fungos patogênicos. H99: *Cryptococcus neoformans*; R265 e R272: *C. gatti*.

Tabela 3. (A) Concentração inibitória mínima (µg/mL) e (B) efeito de extratos aquosos de sementes contra fungos patogênicos.

| A | Amazônia | Extratos aquosos |      |      |      | RS   | Extratos aquosos |       |       |      |
|---|----------|------------------|------|------|------|------|------------------|-------|-------|------|
|   |          | Cand             | H99  | R265 | R272 |      | Cand             | H99   | R265  | R272 |
|   | INPA 1   | 27,3             | ND   | neg  | neg  | CB 1 | neg              | ND    | 18500 | ND   |
|   | INPA 4   | 9,2              | 18,5 | 74,2 | 37,1 | CB 7 | 2250             | 562,5 | 69,7  | 35,1 |
|   | INPA 21  | 17500            | neg  | neg  | neg  |      |                  |       |       |      |

| B | Amazônia | Extratos aquosos |              |              |              | RS   | Extratos aquosos |           |           |           |
|---|----------|------------------|--------------|--------------|--------------|------|------------------|-----------|-----------|-----------|
|   |          | Cand             | H99          | R265         | R272         |      | Cand             | H99       | R265      | R272      |
|   | INPA 1   | Fungistático     | ND           | neg          | neg          | CB 1 | neg              | ND        | Fungicida | ND        |
|   | INPA 4   | Fungistático     | Fungistático | Fungistático | Fungistático | CB 7 | Fungicida        | Fungicida | Fungicida | Fungicida |
|   | INPA 21  | Fungistático     | neg          | neg          | neg          |      |                  |           |           |           |

## CONCLUSÕES

- O teste de microdiluição em caldo se mostrou muito mais eficaz que o teste de difusão em disco
- Dos quarenta extratos aquosos testados, quinze apresentaram potencial atividade antifúngica. Até momento, cinco extratos tiveram a concentração inibitória mínima determinada e detectamos que três deles apresentam ação fungistática e dois apresentam ação fungicida.

## PERSPECTIVAS

- Determinar a concentração inibitória mínima de todos os extratos positivos para o teste de microdiluição em caldo
- Iniciar os testes de microdiluição em caldo com os extratos alcoólicos (50%)
- Realizar o isolamento e a caracterização das moléculas com atividade antimicrobiana de cada extrato.