

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.

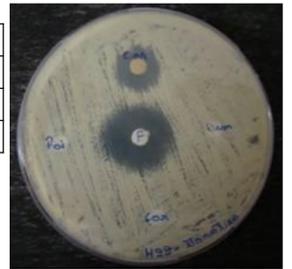


Figura 1. Teste de difusão em disco de diferentes extratos etanólicos de semente contra *Cryptococcus neoformans* H99. Fluconazol no centro, CB-7 (positivo), CB-3, CB-11 e CB-15 (sentido horário).

### 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
INPA 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.

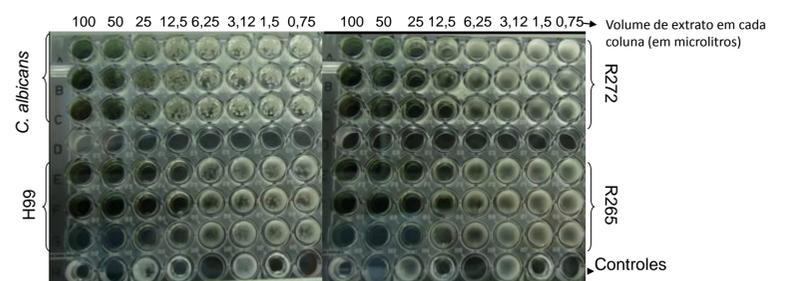


Figura 2. Teste de microdiluição em caldo do extrato aquoso da semente (CB-1) contra fungos patogênicos. H99: *Cryptococcus neoformans*; R265 e R272: *C. gatti*.

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.