

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS,  
Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Blainvillea biaristata* DC. *Tagetes minuta* L. E *Gochnatia oligocephala* (GARDNER) CABRERA

**Lara Raisa Cheles Vieira<sup>1\*</sup>, Aristóteles Góes Neto<sup>2</sup>, Jacqueline Miranda Gonçalves<sup>2</sup>, Ana  
Paula Trovatti Uetanabaro<sup>1,2,3</sup>.**

Universidade Estadual de Feira de Santana, Bolsista PROBIC, Graduando em Enfermagem, Laboratório de Pesquisa em  
Microbiologia\* (1);

Orientador, Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia (PPGBIOTEC/UEFS) (2);

Universidade Estadual de Santa Cruz, Programa de Pós-graduação em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos  
(PPGBBM/UESC), Ilhéus, BA (3).

\*E-mail: Lara\_raisa@hotmail.com

**Palavras -Chave:** fitoterapia, ação antimicrobiana, asteraceae

### INTRODUÇÃO

O uso de extratos vegetais e fitoquímicos com finalidade medicinal é uma das mais antigas formas de aplicação medicinal da humanidade. A OMS estima que mais de 65% da população dos países desenvolvidos utilizem plantas medicinais para cuidados básicos com a saúde (ARAÚJO; LEON, 2001). As plantas dos biomas brasileiros têm sido utilizadas também como medicamentos naturais por populações locais no tratamento de diversas doenças tropicais, incluindo a esquistossomose, a leishmaniose, a malária e infecções fúngicas e bacterianas (SARTORATTO et al., 2004). A família Asteraceae ou Compositae é o grupo sistemático mais numeroso dentro das Angiospermas, possui cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São muito estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, pois apresentam poliacetilenos, lactonas sesquiterpênicas, óleos essenciais voláteis, terpenóides, monoterpenos voláteis, alcalóides, látex com triterpenos, saponinas triterpenóides pentacíclicas, antocianinas e flavonóides (MARKHAM, 1982). O presente trabalho objetivou avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos obtidos a partir de caules e folhas das espécies: *Blainvillea biaristata*, *Gochnatia oligocephala* e *Tagetes minuta*, todas pertencentes à Família Asteraceae, encontradas no semiárido do estado da Bahia, contra micro-organismos patogênicos ao homem, sensíveis e resistentes a antibióticos.

### MATERIAIS E MÉTODOS

As análises para os testes de difusão em poço foram realizadas de acordo com o recomendado pelo CLSI (2003), com pequenas modificações. Os extratos obtidos a partir de folhas e caules das espécies estudadas foram ressuspensos em metanol na concentração de 200 mg.mL<sup>-1</sup> e filtrados em membrana de 0,22 µm. As suspensões foram obtidas pela adição do inóculo microbiano em solução salina esterilizada a 0,45% e a concentração final foi ajustada para 5 X 10<sup>5</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> e 1,5 X 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> para a levedura e bactérias, respectivamente. Foram transferidos 6µL da suspensão de micro-organismos, com uma micropipeta, para os frascos contendo 120 mL de Ágar Müller Hinton derretido e vertido em placas de Petri (15 X 100 mm). Após solidificação, foram perfurados poços de 6 mm de diâmetro em pontos equidistantes da placa de Petri e foram inoculados em cada um deles 75 µL das amostras dos extratos brutos da folha e do caule filtrados. Os controles positivos foram feitos com o antibiótico Cloranfenicol e o antifúngico Nistatina, nas concentrações de 30 µg e 10 µg por poço, respectivamente. As placas foram incubadas a 28° C por 48h e 37° C por 24h para a levedura e bactérias, respectivamente. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados incluindo o diâmetro do poço (6 mm). Destes resultados foi feita a média aritmética dos valores e o cálculo do desvio padrão. A determinação da CIM foi realizada utilizando-se a metodologia, com modificações, descrita na CLSI (2002), para as leveduras, e na CLSI (2003a), bactérias, para os extratos brutos que apresentaram atividade biológica na triagem inicial (difusão em poço). Os testes foram realizados em caldo Müeller-Hinton (CMH). O extrato foi esterilizado por filtração através da membrana de acetato celulose (0,22 mm). Foram preparadas

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

diluições geométricas por poço de 100 mg/mL a 0,0488 mg/mL dos extratos em placas de microtitulação de 96 poços. Em seguida, cada poço recebeu 10 µL de cada suspensão de microrganismo-teste. As placas foram incubadas à 28°C por 48 horas (leveduras) e à 37°C por 24 horas (bactérias). Posteriormente, foram adicionados 50 µL de cloreto 2-3-5 trifenil tetrazólio e 30 µL do revelador Resazurina 0,01%, preparado de acordo com o fabricante, para análise qualitativa do crescimento das leveduras e bactérias, respectivamente, nos poços de ensaio e determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. As placas foram colocadas de volta à temperatura de incubação, por um período de 3 horas e fez-se, então, a leitura da CIM. Foram considerados, neste trabalho, resultados representativos para inibição do crescimento microbiano nas condições testadas de CIM valores iguais ou inferiores a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato testado, devido ao valor de CIM apresentado pelo DMSO. Cada teste foi realizado em triplicata. Diluições de antifúngicos e antibióticos foram utilizadas como controle positivo para fins de comparação de dados entre experimentos independentes e como indicadores para avaliação relativa do nível de inibição das amostras testadas. Foram realizados também controles de viabilidade dos microrganismos testados e do meio de cultura e em placa separada foi realizado o controle para o DMSO.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha do gênero a ser utilizado nesta pesquisa foi feita baseada nas informações etnofarmacológicas já publicadas em literatura científica (SCHUCH et al, 2008; CAETANO, 2002) que permitem a formulação de hipóteses quanto à(s) atividade(s) farmacológica(s) e à(s) substância(s) ativa(s) responsáveis pelas ações terapêuticas relacionadas. A Tabela 1 mostra a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos das espécies estudadas.

**Tabela 1.** Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos bruto das espécies de Asteraceae estudadas, através dos tamanhos dos halos de inibição (em mm), pela técnica da difusão em poço.

<i>Espécies</i>	<i>Partes da Planta</i>	<i>B.a.</i> 282*	<i>S.a.</i> 262*	<i>S.a.</i> 263*	<i>E.c.</i> 261*	<i>E.c.</i> 284*	<i>P.a.</i> 268*	<i>S.c.</i> 281*	<i>C.a.</i> 286*	<i>C.k.</i> 287*	<i>C.p.</i> 288*
<i>Blainvillea biaristata</i> DC.	Caule	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Folha	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Gochnatia oligocephala</i> (Gardner) Cabrera	Caule	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Folha	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tagetes minuta</i> L.	Caule	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Folha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* número de identificação dos microrganismos pela Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB); B. a.- *Bacillus cereus*, C. a. – *Candida albicans*, C. k. – *Candida kruzei*, C. p. – *Candida parapsilosis*, E. c. – *Escherichia coli*, P. a. – *Pseudomonas aeruginosa*, S. a. – *Staphylococcus aureus*, S. c. – *Salmonella choleraesuis*.

Observou-se que a folha de *B. biaristata* apresentou alta atividade contra o *Bacillus cereus* (20,5 +/- 0,7 mm), mas não contra os outros micro-organismos teste. Sendo esse o primeiro registro sobre atividade antimicrobiana para esta espécie. Observa-se também que o caule da *G. oligocephala* apresentou alta atividade contra o *Staphylococcus aureus* (33,33 +/- 0,38 mm), mas não contra os outros micro-organismos teste, já a folha da mesma espécie apresentou alta atividade contra o *Bacillus cereus* (25,3 +/- 0,39 mm) e contra o *Staphylococcus aureus* (21,33 +/- 1,8 mm). Já o extrato de *Tagetes minuta* surpreendentemente não apresentou nenhuma atividade. O óleo essencial e decocto dessa espécie tiveram sua atividade antimicrobiana demonstrada nos trabalhos de SOUZA, AVANCINI e WIEST (2000) e de RUFFINENGO et al (2007). Para a determinação dos resultados

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

pode-se usar a verificação visual por turbidez, mensurar a viabilidade e proliferação das células através de corantes indicadores de oxidação-redução como Resazurina e Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio ou utilizar aparelhos, como o espectrofotômetro (PFALLER; BARRY, 1994; BAKER; TENOVER, 1996; CLSI, 2003a; DUARTE et al., 2005). De acordo com Belotti et al (1999), as células vivas, através de enzimas, reduzem o corante TTC (Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio), incolor, originando o formazano, que fica acumulado no interior dos grânulos das células, resultando na alteração da coloração do meio para rósea como foi observado e segundo Stoppa et al. (2009) a Resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) de cor azul é oxidada na presença de células viáveis à resofurina, substância de coloração vermelha, facilitando a verificação da presença de crescimento microbiano como pode ser observado na Figura 5. Neste trabalho utilizamos a resazurina para bactérias e TTC para leveduras. A Tabela 2 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos das diferentes partes vegetais das espécies de Asteraceae frente às cepas Gram-positivas: *S. aureus* CCMB 262, *S. aureus* CCMB 263, *B. cereus* CCMB 282; Gram-negativas: *E. coli* CCMB 261, *E. coli* CCMB 284, *P. aeruginosa* CCMB 268, *Salmonella* sp. CCMB 281 e às leveduras: *C. albicans* CCMB 286, *C. krusei* CCMB 287 e *C. parapsilosis* CCMB 288.

**Tabela 2:** Resultados das concentrações inibitórias mínimas (mg.mL<sup>-1</sup>) dos extratos metanólicos brutos das espécies avaliadas.

<i>Espécies</i>	<i>Partes da Planta</i>	<i>B. c.</i> 282	<i>S. a.</i> 262	<i>S. a.</i> 263	<i>E. c.</i> 261	<i>E. c.</i> 284	<i>P. a.</i> 268	<i>S. sp.</i> 281	<i>C. a.</i> 286	<i>C. k.</i> 287	<i>C. p.</i> 288
<i>Blainvillea biaristata</i>	Caule	5,0	10	10	5,0	2,5	5,0	0,15	5,0	0,07	5,0
	Folha	2,5	1,25	1,25	5,0	5,0	0,07	2,5	5,0	0,07	5,0
<i>Gochnatia oligocephala</i>	Caule	5,0	5,0	10	5,0	2,5	5,0	0,15	5,0	0,07	5,0
	Folha	0,62	0,62	0,62	5,0	5,0	1,25	0,62	5,0	0,07	5,0
<i>Tagetes minuta</i>	Caule	5,0	5,0	5,0	5,0	2,5	5,0	5,0	5,0	0,07	5,0
	Folha	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	0,07	5,0
<i>Controle</i>	1	0,31	0,62	0,15	0,15	10	0,31	10	N/A	N/A	N/A
<i>Controle</i>	2	N/A	10	0,07	10						

\* número de identificação dos micro-organismos pela Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB); *B. c.*- *Bacillus cereus*, *C. a.* – *Candida albicans*, *C. k.* – *Candida Kruzei*, *C. p.* – *Candida parapsilosis*, *E. c.* – *Escherichia coli*, *P. a.* – *Pseudomonas aeruginosa*, *S. a.* – *Staphylococcus aureus* e *S. sp.*- *Salmonella choleraesuis*.1: Cloranfenicol; 2: Nistatina. N/A- Não se aplica.

Percebeu-se nesse trabalho que o solvente DMSO pode ter influenciado no crescimento microbiano seja atuando como potencializador da atividade antimicrobiana do(s) composto(s) do extrato ou agindo ele próprio como inibidor do crescimento microbiano (RIBEIRO et al., 2001; HERSCHLER, 1970). Estudos demonstraram a ação permeante do DMSO em membranas biológicas, bem como sua utilização como potencializador de drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias (RIBEIRO et al., 2001). Assim, neste estudo, foram considerados como resultados representativos de CIM valores iguais ou inferiores a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup> do extrato testado, ou seja, concentrações menores ou iguais as observadas para o DMSO, equivalente a 5,00 mg.mL<sup>-1</sup> na determinação da CIM. De acordo com o mostrado na tabela, o MIC confirmou a atividade da folha de *B. biaristata* contra o Gram-positivo *B. cereus* e revelou sua atividade contra as Gram-negativas *S. aureus* CCMB 262, *S. aureus* CCMB 263, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*, além da *C. krusei*. Revelou também a atividade do extrato do caule de *B. biaristata* contra *E. coli* CCMB 284, além da atividade do extrato do caule *T. minuta* contra *E. coli* CCMB 284 e *C. krusei* e do extrato da folha de *T. minuta* contra a *C. krusei*. O MIC revelou atividade de certos extratos cuja ação não foi evidenciada pela

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

difusão em disco, esta variação nos resultados pode ser justificada pela presença de diferentes substâncias nas amostras, pois moléculas mais polares ou de maior massa molecular podem ser mais solúveis e de mais fácil dispersão em meio líquido (VALGAS et al., 2007). A técnica de diluição para determinação de concentrações inibitórias mínimas (CIM) junto com outros sistemas de diluição de antibióticos é considerada, frequentemente, como a melhor metodologia para a avaliação de suscetibilidade ou de resistência das bactérias aos antimicrobianos (ALVES et al., 2008). O método da difusão é mais adequado, segundo Alves et al. (2008) para compostos polares de tamanho molecular pequeno e médio e para determinar o espectro antimicrobiano, pois neste teste podem ser utilizados vários compostos contra um micro-organismo.

## CONCLUSÃO

O presente estudo comprova que espécies vegetais disponíveis no ambiente podem apresentar atividade antimicrobiana, tendo grande potencial como base para novos fármacos. Os resultados relativos ao potencial antimicrobiano das espécies estudadas variaram de acordo com os órgãos da planta e o micro-organismo, demonstrando a variedade química presente nas diversas partes da planta, bem como a suscetibilidade do micro-organismo teste utilizado. Os 6 extratos testados apresentaram atividade contra 7 dos 10 micro-organismos utilizando-se o método da Concentração Inibitória Mínima, demonstrando a maior sensibilidade desta técnica, sendo que os resultados obtidos pela CIM comprovaram os achados da metodologia da difusão em poço. Pela técnica do CIM os extratos metanólicos brutos demonstraram atividade, com concentrações variando de 0,078 a 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo mais eficientes contra *B. cereus* CCMB 282, *S. aureus* CCMB 262, *S. aureus* CCMB 263, *S. choleraesuis* CCMB 281 e *C. krusei* CCMB 287. Entretanto mais estudos são necessários para o aprofundamento desse conhecimento, que pode servir de alicerce para o isolamento de compostos para utilização na indústria farmacêutica.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C.A.C.; LEON L.L. Biological activities of *Curcuma longa* L. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. V. 96, p.723-728, 2001.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I. e SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ed. Porto Alegre: UFRGS, p.301-303, 2000.
- RUFFINENGO et al. Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Zootecnia Trop.* v.25 n.1 Maracay jan. 2007
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 35, n.4, p. 275-280, 2004.
- SOUZA, A. S., AVANCINI, C. A. M., WIEST, J. M., Atividades antimicrobianas de *Tagetes minuta* L. - Compositae (Chinchilho) frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.37, n.6, 2000.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 USA. 2003a.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition M2A8 (ISBN 1562384856). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 190871898 USA, 2003b.