

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

SAMYRE HELLEN COSTA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Annona muricata* L.**

Juazeiro do Norte – CE

2018

SAMYRE HELLEN COSTA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Annona muricata L.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Biomedicina do Centro Universitário Leão
Sampaio, como requisito para obtenção de
grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Esp. Rakel Olinda Macedo
da Silva

Juazeiro do Norte– CE

2018

SAMYRE HELLEN COSTA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Annona muricata L.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Graduação em
Biomedicina do Centro Universitário Leão
Sampaio, como requisito para obtenção do
grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Esp. Rakel Olinda Macedo
da Silva

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Esp: Rakel Olinda Macedo da Silva
Orientador

Ma : Tássia Thaís Al Yafawi
Examinador 1

Examinador _____

Prof(a). Ma : Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro
Examinador 2

AGRADECIMENTO

Quero agradecer primeiramente a Deus!

A minha família que esteve sempre do meu lado me incentivando a persistir!

A minha orientadora que deu seu melhor para que chegasse até aqui!

As minhas amigas que a biomedicina trouxe para minha vida!

E ao meu noivo Wider Matheus que com toda sua paciência esteve sempre do meu lado me ajudando em tudo.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Annona muricata* L.

Samyre Hellen Costa Nascimento¹, Rakel Olinda Macedo².

RESUMO

O seguinte trabalho objetivou avaliar o potencial antibacteriano e modulador do óleo essencial de *Annona muricata* (graviola), frente a cepas bacterianas padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, este extraído pela metodologia de hidrodestilação. Trata-se de um estudo experimental de caráter quantitativo tendo como material de análises as folhas de *Annona muricata*. O potencial antibacteriano do óleo essencial como a modulação utilizando os antibióticos amicacina e gentamicina foram analisados através do método de Contato gasoso. Nos resultados não foi possível observar ação antibacteriana e moduladora frente às bactérias padrão e multirresistentes perante a metodologia utilizada. Portanto, é necessário que sejam realizados mais estudos com plantas com potenciais fitoterápicos como a *Annona muricata* a partir de novas metodologias frente a estas cepas bacterianas e outros tipos de antibióticos na tentativa de evidenciar seus efeitos.

Palavra chave: *Annona muricata*, Antibacteriana, Modulação.

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Annona muricata* L.

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antibacterial and modulatory potential of the essential oil of *Annona muricata* (graviola) against standard bacterial and multiresistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* of clinical importance. It is an experimental study of quantitative character having as an analysis material the leaves of *Annona muricata*. The antibacterial potential of the essential oil as the modulation using the antibiotics amicacin and gentamicin were analyzed by the gaseous Contact method. In the results it was not possible to observe antibacterial and modulating action against standard and multiresistant bacteria. It is therefore necessary to carry out further studies with plants with potential herbal remedies such as *Annona muricata* from new methodologies, using other bacteria and other types of antibiotics in order to potentiate their effects.

¹ Concludente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio; samyrenascimento@gmail.com

² Orientador – Professor do curso de Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio; rakelolinda@leaosampaio.edu.br

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais consistem em toda espécie a qual possui princípios ativos com capacidade de contribuir para o tratamento ou cura de determinada patologia (BRASIL, 2010). O uso das mesmas tem se destacado a cada dia no mundo, a partir de suas funções terapêuticas, sendo bastante notório no Brasil (PERON et al., 2008).

A utilização destas no tratamento de várias patologias tem despertado o interesse para a realização de estudos com intuito de isolar novos compostos com ação antibacteriana ou que possuem capacidade de reduzir os casos de resistência aos antibióticos (NCUBE; FINNIE; STADEN, 2012; SIMÕES, 2007).

A família Annonaceae se destaca por possuir uma diversidade de gêneros e espécies, destacando-se no Brasil um número de 30 gêneros e 260 espécies (SILVA; NETA, 2010), dentro destes se destaca o gênero *Annona* por possuir um alto valor farmacológico e econômico produzindo um cultivo e comércio de grande escala (LAGE, 2011).

Entre as diversas espécies de plantas medicinais, a graviola (*Annona muricata*), conhecida também como Araticum de comer, Jaca do Pará e Condessa, é frequentemente utilizada na forma de infusão contra dores de cabeça, insônia, cistite e a partir de estudos comprovados possui uma eficiente ação antioxidante e antiparasitária (BASKAR et al., 2007; HOLANDA et al., 2014; OLIVEIRA, 2012).

Os mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos podem vir a ocorrer de forma natural e adquirida, a primeira ocorrendo a partir da adaptação das bactérias a tais drogas, podendo promover um aumento na disseminação das mesmas devido ao uso indiscriminado desses fármacos, no entanto a forma adquirida ocorre através dos processos de mutação, transformação, transdução, conjugação e transposição alterando assim a estrutura genética destas, diante disto facilitando a resistências de espécies como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (SILVEIRA et al., 2006; SANTOS, 2004; VAZ, 2009).

Através da realização de estudos, observou-se uma eficiente ação desta planta contra vários processos patológicos a partir de uma variedade de constituintes secundários, presente na composição da mesma (CORIA- TÉLLES et al., 2016; LIMA, 2007) e uma grande importância em estudos sobre a atividade moduladora exercida por uma variedade de produtos naturais (GIBBONS, 2005). Diante disto objetivou-se avaliar a ação antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Annona muricata*.

2 METODOLOGIA

2.1 TIPO DE ESTUDO E COLETA DO MATERIAL VEGETAL

Este trabalho trata-se de um estudo experimental de caráter quantitativo, no qual, as folhas de *Annona muricata* foram coletadas no município de Milagres, Ceará, Brasil e uma exsiccata da espécie foi depositada no Herbário Dardano Andrade de Lima, na Universidade Regional do Cariri, Crato-Ceará.

2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Annona muricata*:

A extração do óleo essencial das folhas frescas de *Annona muricata* foi realizada pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho tipo *Clevenger*, onde as folhas foram trituradas e colocadas em um balão de vidro de 5,0 L juntamente com 2,5 L de água destilada, permanecendo em ebulição por 2 horas. Foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) ao óleo essencial obtido e este foi armazenado sob refrigeração ($-4\text{ }^\circ\text{C}$) para conservação da amostra até a realização das análises.

2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR CONTATO GASOSO

Para realização deste teste foram utilizadas as linhagens bacterianas padrão de *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz e as linhagens multirresistentes de isolados clínicos *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. Todas as linhagens foram mantidas em *Agar infusão de coração* (HIA). Para os testes disco-difusão em ágar, as linhagens foram suspensas em tubo de ensaio com solução salina para obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Os meios de cultura para realização dos testes foram adquiridos de HIMEDIA, Índia.

Em placas de *Petri* contendo o meio *Mueller Hinton* ágar, foi realizada a semeadura em tapete dos microrganismos. O óleo essencial de *Annona muricata* foi utilizado na concentração de 100%, e para avaliar interação dos mesmos foi feita uma solução na proporção de 1:1. Um disco de papel absorvente semelhante aos discos para os testes de antibiograma foi colocado por cima do semeio e na tampa de cada placa foi acrescentado

10µL do óleo. As placas foram incubadas em estufa por 24h a 37°C. Para determinação dos halos de inibição foi utilizada uma régua milimetrada. Todos os testes foram realizados em triplicata (SILVA; CARVALHO; MATIAS, 2016).

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA POR CONTATO GASOSO

O ensaio para avaliação da atividade moduladora ocorreu de acordo com o método do contato gasoso modificado por Inouye, Takizawa e Yamaguchi (2001). Em placas de *Petri* contendo *Mueller Hinton* ágar foi realizada a semeadura em tapete dos microrganismos. Na base das placas inoculadas com bactérias foram adicionados os discos de antibióticos amicacina 30µg e gentamicina 10µg, os quais, foram obtidos de LaborClin, Brasil . Na tampa de cada placa foi acrescentado 10µL do óleo essencial, de forma que através da volatilização, possa ocorrer interação com os discos de antibióticos. Outras placas contendo os discos de fármacos, mas sem o óleo, foram também preparadas e após essa etapa, todas as placas foram incubadas por 24h a 37°C. Com uma régua milimetrada foram medidos os halos de inibição dos antibióticos na presença e na ausência dos óleos testados, para determinação de sinergismo ou antagonismo. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS TESTES MICROBIOLÓGICOS

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) e teste de Bonferroni, utilizando o programa Microcal Origin 6,0 para Windows, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise estatística realizada com o óleo essencial de *Annona muricata*, evidenciou-se que através do método de contato gasoso não houve atividade antibacteriana ou moduladora com antibióticos utilizados, pois não houve formação de halos no teste antibacteriano e em relação à modulação não houve alteração no tamanho dos halos formados, na presença do produto.

Segundo Gurgel et al. (2014) o clima e solo apropriado para evolução desta espécie é um dos fatores mais importantes, como um clima tropical ou subtropical com solos profundos, drenagem e pH adequado entre 5,5-6,0, no entanto as extrações das folhas não foram realizados em região com tais características, sendo o solo da mesma de baixa fertilidade e clima chuvoso, tendo em vista que isso possa ter interferido no resultado.

Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Matias et al. (2018) utilizando a espécie *Cordia verbenacea*, não sendo observado efeito antibacteriano utilizando a metodologia de contato gasoso.

Estudos realizados por Pathak et al. (2010) na Índia, a partir do método de difusão em ágar, avaliaram o efeito antimicrobiano apresentado pelos extratos metanólicos e aquoso das folhas da graviola frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, mostrando uma sensibilidade frente a bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, e Gram-negativas como *Proteus vulgaris* e *Klebsiella pneumoniae*, diferentemente do presente estudo, em que não foi observada ação antibacteriana.

Avaliando o potencial bactericida de extratos etanólicos e aquoso da casca de *Annona muricata* (graviola) frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Salmonella enteritidis*, Vieira et al. (2010) mostrou através do método de difusão em disco de Kirby-Bauer modificado que a partir do extrato aquoso houve efeito bactericida para *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*, porém os extratos etanólicos não mostraram ação antibacteriana nas linhagens testadas, como foi observado com o óleo essencial no presente estudo.

Esses resultados demonstraram que o produto utilizado também pode causar uma divergência nos resultados, devido à presença de diferentes constituintes químicos que pode ou não contribuir para a atividade esperada. Segundo Martins et al. (2010) trabalhos realizados com a mesma planta apresentam resultados distintos diante da atividade antibacteriana. De modo que é importante analisar as formas utilizadas para os experimentos em questão, dentre elas: a temperatura, a técnica do teste escolhida para avaliação, tempo de incubação e microrganismos em questão.

Inácio (2017) mostrou através do seu estudo utilizando a metodologia de microdiluição, a partir do extrato metanólico de *Annona murica* L. em associação ao antibiótico amicacina um efeito sinérgico para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, dando ênfase no teste realizado com *Pseudomonas aeruginosa* que teve sinergismo mais significativo em relação às outras bactérias ($p < 0,001$). Costa et al. (2008)

mostra através de seu estudo que o óleo essencial de *Rollinia leptopetala* da família anonácea apresentaram efeito modulador diferentemente do presente estudo.

No entanto estes utilizaram diferentes metodologias, espécie de plantas e tipos de bactérias para a realização da pesquisa o que pode ter contribuído para a diferença nos resultados, mostrando que o método, espécies e outros fatores têm total influencia no efeito esperado.

Embora existam muitos estudos realizados a respeito da atividade antibacteriana do gênero *Annona*, ainda é considerado baixo o numero de artigos que relatam o efeito modulador desta espécie em associação com alguns tipos de antibióticos utilizados na clinica, sendo necessárias outras pesquisas relacionada a esta ação (SHAHVERDI et al., 2007; ROSATO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2007).

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial das folhas de *Annona muricata* não demonstrou efeito antimicrobiano nem modulador significativo frente às bactérias testadas perante a metodologia realizada, sendo assim relevantes para pesquisas futuras a partir de outras metodologias ou, por exemplo, com outras partes da planta.

REFERENCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº10 de 9 de março de 2010. **Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências.** Brasília, 2010.

BASKAR, R; RAJESWARI, V; KUMAR, T. S. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. **Indian Journal of Experimental Biology.** v. 45, n. 5, 2007.

CORIA-TELLEZ, A.N et al. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry.** 2016.

COSTA, V. C. O. et al. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira Farmacognos.** v. 8, n. 1, 2008.

GIBBONS, S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. **Phytochemistry Reviews.** v.4, n. 1, 2005.

GURGEL, C.E.M.R. **Secagem da polpa de graviola (*Annona muricata* L.) em camada de espuma-desempenho do processo e características do produto.** 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Centro de tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.

HOLANDA et al. Influence of *Annona muricata* (soursop) on biodistribution of radiopharmaceuticals in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 29, n. 3, 2014.

INÁCIO, V.V. Avaliação da atividade antibacteriana e modulatória dos extratos hexânico e metanólico das folhas de *Annona murica* L. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina), Centro universitário Leão Sampaio, 2017.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of antimicrobial chemotherapy.** v. 47, n. 5, 2001.

LAGE, G.A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.** 2011. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

LIMA, M.D. **Perfil cromatográfico dos extratos brutos das sementes de *Annona muricata* L. e *Annona squamosa* L. através da cromatografia líquida de alta eficiência.** 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia)- Instituto de química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2007.

MARTINS et al. Determinação in vitro da Atividade Antibacteriana dos Extratos Brutos da Casca e Polpa Farinácea de *Hymenaea courbaril* L. **Investigação,** v. 10, n. 2-3, 2010.

MATIAS, F. F. E et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. Associado às luzes de led. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia,** v. 5, n. 14, 2018.

NCUBE, B; FINNIE, J.F; VAN STADEN, J. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 139, n. 1, 2012.

OLIVEIRA, R.A.G et al. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-Candida activity of some clinically used antifungals. **Rev Bras Farmacogn.** v. 17, n. 1, 2007

OLIVEIRA, C.C.D. **Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L.** 2012. Tese (Pós- graduação em farmacologia). Faculdade de medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

PATHAK, P et al. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of the leaves of *Annona muricata*. **International Journal of pharmaceutical research and development.** n.1, v.1, 2010.

PERON, A. P et al. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis L.* e *Cassia angustifolia vahl* em sistema teste vegetal. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar.** v. 12, n. 1, 2008.

ROSATO, A et al. Antibacterial effect of some essential oil administered alone or in combination with norfl oxacin. **Phytomedicine.** v. 14, n. 11, 2007.

SILVA, M. K. N.; CARVALHO, V. R. A.; MATIAS, E. F. F. Chemical Profile of Essential oil of *Ocimum gratissimum L.* and Evaluation of Antibacterial and Drug Resistance-modifying Activity by Gaseous Contact Method. **Pharmacognosy Journal,** v. 8, n. 1, 2016

SILVA, C. A; NETA, A.M.D. Aspectos reprodutivos e visitantes florais de *Duguetia marcgraviana* Mart. (Annonaceae) na região sudoeste de Mato Grosso. **Biotemas.** v.23, n. 1, 2010.

SILVEIRA, G, P et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova.** v. 29, n. 4, 2006.

SANTOS, N.D.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm.** v, 12, n. 1, 2004.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis, 2007.

SHAHVERDI, A.R et al. A TLC bioautographic assay for the detection of nitrofurantoin resistance reversal compound. **Phytomedicine.** v.1, n. 2, 2007.

VIERA, Gustavo Hitzschky Fernandes et al. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 52, n. 3, 2010.

VAZ, E.K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 37, n. 1, 2009.