

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO DR. LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

COSME EDSON DANTAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO
EXTRATO METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A.**

Juazeiro do Norte - Ceará

2018

COSME EDSON DANTAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO
EXTRATO METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A.**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Biomedicina do Centro
Universitário Dr. Leão Sampaio, como requisito
parcial para a obtenção do grau de bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof^a. Esp. Lívia Maria Garcia Leandro

Juazeiro do Norte - Ceará

2018

COSME EDSON DANTAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO
EXTRATO METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A.**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do
Curso de Graduação em Biomedicina do Centro
Universitário Dr. Leão Sampaio, como requisito
parcial para a obtenção do grau de bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof^a. Esp. Livia Maria Garcia Leandro

DATA DA APROVAÇÃO: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Esp. Livia Maria Garcia Leandro

ORIENTADOR

Prof(a) Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro
EXAMINADORA1

Prof(a) Esp. Rakel Olinda Macedo da Silva

EXAMINADOR 2

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido forças e coragem pra chegar até aqui.

Logo, agradeço a minha Mãe (Auzenir), por ter movido céus e terras para que essa vitória pudesse se concretizar.

Aos meus irmãos (Claúdia, Kim e Karine), que junto comigo sonharam com esse momento, e que me ajudaram de todas as formas possíveis.

As minhas sobrinhas (Ninnive e Alice), que mesmo sem conhecimento, me motivaram cada dia mais a querer realizar esse sonho, quero servir de exemplo para vocês.

A minha família, por ajudarem minha mãe na hora que a dificuldade batia na porta.

Aos meus amigos do Pernambuco, Arthur, Tayane, Diogo e Mauricio, por depositarem confiança em mim durante esses 4 anos de graduação.

Aos mestres que tive o prazer de conhecer durante esse trajeto, por todo conhecimento adquirido.

Aos meus grandes amigos que pude adquirir na graduação, em especial: Myzzaella, Thiago e Mirele. Obrigado pela paciência e todo amor transmitido durante esse tempo, quero levar vocês pra vida inteira.

Por fim, agradeço a Prof Livia Maria, por ter aceitado o convite de ser a minha orientadora e por ter me mostrado durante esse tempo o mundo fantástico da microbiologia, além de ter me permitido conhecer esse ser iluminado que ela é.

Muito obrigado!

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EXTRATO METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A.

Cosme Edson Dantas¹, Livia Maria Garcia Leandro²

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana e moduladora do extrato metanólico obtido das folhas de *Azadirachta indica* A., frente às bactérias padrões e multirresistentes *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, para o grau de modulação foram usados antibióticos, como: amicacina e gentamicina. Realizando o estudo através da técnica de microdiluição. Os ensaios foram feitos em triplicata, e expressos como a média geométrica. A análise estatística foi aplicada à variância de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni utilizando o software *GraphPadPrism* 5.0. Na atividade antibacteriana realizada pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obteve resultados $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ para ambas as cepas. Nos testes de modulação não apresentou resultado clinicamente relevante quando associado à bactéria multirresistente *E. coli*, entretanto, quando testado frente a *S. aureus* obteve atividade sinérgica. Novas e aprofundadas pesquisas devem ser desenvolvidas em busca da ampliação e comprovação do conhecimento da espécie estudada. Os resultados obtidos são promissores e poderão estimular no desenvolvimento de outras novas pesquisas.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*, resistência bacteriana, extrato.

ABSTRACT

The present work had as objective to evaluate the bacterial and modulating resistance of the methanolic extract of the leaves of *Azadirachta indica* A., against standards of bacteria and multiresistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, as the degree of modulation were used antibiotics, as: amicacin and gentamycin. Performing the method through the microdilution technique. Osbons were made in triplicate, and expressed as a geometric mean. Statistical analysis was applied to the two-way variance conducted by the Bonferroni test using *GraphPadPrism* 5.0 software. In the antibacterial activity performed by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) the result is $\geq 1024\mu\text{g} / \text{mL}$ for both strains. Modulation testes were not gravitationally associated with *E. coli* multiresistant bacteria; however, when tested against *S. aureus* it became a synergistic activity. New and deep research must be found in search of the magnification and proof of knowledge of the species studied. The results obtained are promising and exhausting in the development of other new researches.

Keywords: *Azadirachta indica*, bacterial resistance, extract.

¹Discente do curso de Biomedicina, cosmeedt@gmail.com, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio.

²Docente do curso de Biomedicina, livialeandro@leaosampaio.edu.br, Centro Universitário Doutor Leão

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana tem se tornado um problema devido à utilização de fármacos de maneira inadequada ou até mesmo sem prescrições médicas (GRILLO et al., 2013). No caso da bactéria *Escherichia coli*, esta possui reservatórios que contém genes de resistência aos antimicrobianos (KORB et al., 2013). Já a bactéria *Staphylococcus aureus*, apresenta mecanismos de defesas que conseguem atuar contra alguns fármacos (LIMA et al., 2015).

Na tentativa de obter resultados frente à resistência bacteriana, as plantas medicinais vêm crescendo cada dia mais. O uso de fitoterápicos como ferramenta terapêutica começou de forma intuitiva e ao passar do tempo, começaram a distinguir os vegetais onde pudessem utilizá-los para fins benéficos à saúde e conhecerem se seriam tóxicos ao seu organismo (LEITE et al., 2009). Em muitas ocasiões a utilização de plantas medicinais representa a única forma de tratamento de enfermidades (MACIEL et al., 2002).

Azadirachta indica, conhecida popularmente como nim, vem sendo utilizada nos tempos atuais para controle de pragas, bem como no tratamento de inflamações, infecções virais, hipertensão e febre (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). Planta de porte arbóreo médio, que pode chegar de 15 a 30 metros (OWNA et al., 2009). É chamada atenção pela presença de limonóide na sua composição, denominado azadirachtina, composto capaz de atuar sob a ação de alguns insetos. Os efeitos de azadirachtina frente aos insetos incluem fatores de crescimento, metamorfose, repelência e anormalidades anatômicas (VIEIRA; PERES, 2017).

As bactérias são os principais microrganismos causadores de doenças, caracterizando-se pelo agravamento destas patologias, pelo fato da incapacidade de atuação de alguns antibióticos antimicrobianos. Assim, a pesquisa acerca da *Azadirachta indica* A. os seus compostos diante das bactérias resistentes é de suma importância, visto que através desse estudo poderá gerar novas drogas farmacêuticas para fins antibacterianos.

Dessa forma, o presente estudo obteve como finalidade avaliar a atividade antibacteriana e moduladora do extrato metanólico das folhas de *Azadirachta indica* A.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTOS DA PESQUISA E LOCAL DE ESTUDO

Trata-se de um estudo experimental, realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Leão Sampaio - Unileão, localizado na cidade de Juazeiro do Norte – CE.

2.2 MATERIAL VEGETAL

As folhas da *Azadirachta indica* A. foram coletadas no mês de agosto de 2018, no sítio Arajará localizado no município de Barbalha-Ceará, Brasil.

2.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO

Para preparação do extrato, foram coletadas as folhas que permaneceram submersas no solvente metanólico por 72h. Após esse período, o eluente foi filtrado em papel filtro para separação dos resíduos sólidos e concentrado em condensador rotativo a vácuo e banho-maria (model Q-214M2 – Quimis, Brazil) (BRASILEIRO et al., 2006), obtendo-se a massa de extrato bruto.

2.4 CEPAS MICROBIANAS

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos através do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas as linhagens padrão e multirresistente das bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* 358. Antes dos ensaios, as linhagens foram cultivadas a 35°C por 24 horas em *Brain Heart Infusionbroth*– BHI (DifcoLaboratoriesLtda).

Tabela 1. Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos

Bactéria	Origem	Resistência a antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA 358)	Feridacirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Ca, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Escherichia coli</i> (EC 27)	Feridacirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob

Ast-Azitromicina; Ax- Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicacina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefalexina; Cfc-cefclor; Cf- Cefalotina; Caz-Ceftazidima; Cip-Ciprofloxacino; Clo –Clorafenicol; Im-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametoxazol, Tet-Tetraciclina; Tob- Tobramicina; Oxa- Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para- Paramomicina; But- Butirosine; Sis-Sisomicina; Net- Netilmicina

2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA E MODULAÇÃO

Para os testes foram utilizadas soluções preparadas a partir do extrato, sob uma concentração de 10 mg/mL, dissolvidos em DMSO (dimetil sulfóxido), em seguida foi diluído com água destilada para uma concentração de 1024 µg/mL.

A CIM (concentração inibitória mínima) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo (NCCLS, 2003) utilizando-se um inóculo de 100 µL de cada linhagem, suspensas em caldo BHI que apresentara uma concentração de 10^5 UFC/mL em placas de microdiluição com 96 poços, com diluições em série $\frac{1}{2}$. Em cada poço foi adicionado 100µL de solução do extrato. As concentrações finais do extrato foram variadas entre 512 – 8 µg/mL.

As CIM foram registradas como as menores concentrações para a inibição do crescimento. Para evidenciá-las, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01% (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passarão por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança da coloração azul para rosa é devido à redução da resazurina, que indica o crescimento bacteriano (JAVADPOUR et al., 1998), auxiliando a visualização da CIM. Esta é definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada.

O extrato foi misturado em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias, obtidos e determinados após a realização de teste de avaliação da CIM, sendo que para o teste de modulação a concentração da solução de extrato foi reduzida 8 (oito) vezes (CIM/8). A preparação das soluções de antibióticos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (1024 µg/mL) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídos na proporção de 1:1 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100µL do meio de cultura conteve suspensões bacteriana diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os extratos foram utilizados durante a modulação (COUTINHO et al., 2009). As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso da resazurina como citado anteriormente no teste de determinação da CIM. Os ensaios foram feitos em triplicata, e expressos como a média geométrica.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi aplicada à análise de variância de duas vias seguida pelo teste de *Bonferroni* utilizando o *Software GraphPadPrism* 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise da atividade antibacteriana realizada pelo método de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato metanólico das folhas de *Azadirachta indica* A. frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi obtido resultado $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ (TABELA 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/mL) do extrato metanólico de *Azadirachta indica* A.

Extrato	EC 27	EC-ATCC 10536	SA 358	SA-ATCC 25922
EMAI	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024

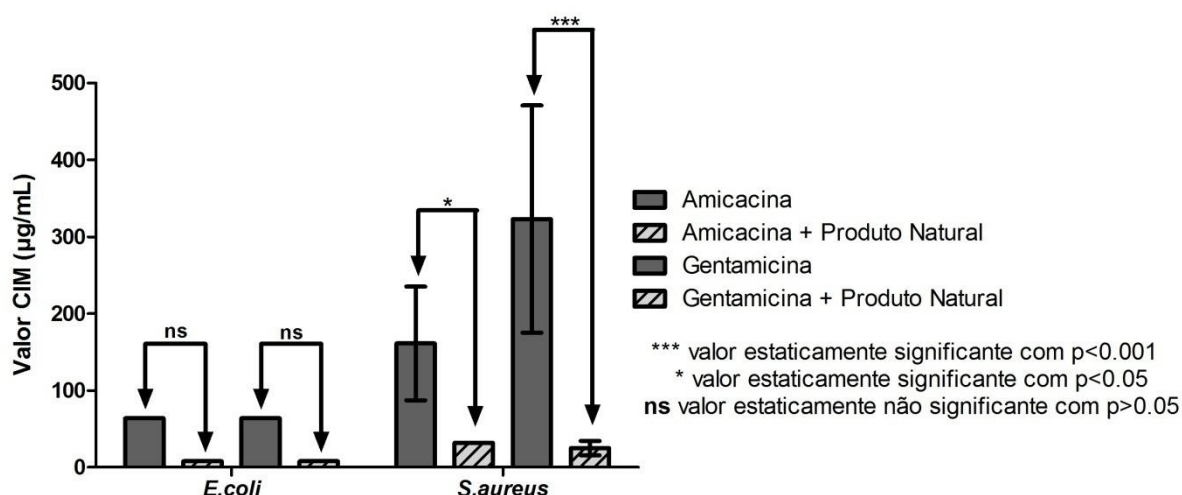
EMAI – Extrato Metanólico de *Azadirachta indica* A.; EC – *Escherichia coli*; SA – *Staphylococcus aureus*.

O extrato não apresentou efeito significativo frente às cepas analisadas possivelmente, devido a baixa concentração de alguns constituintes na sua composição, bem como a presença de bombas de efluxo na célula gram-positiva e negativa. As bombas de efluxo presentes na membrana plasmática de *E. coli* (COUTINHO et al. 2008), bem como a presença da membrana externa, formada por lipopolissacarídeos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), podem estar relacionadas com a baixa atividade antibacteriana apresentada pelo extrato utilizado neste estudo.

Através de outra metodologia, em estudo realizado por Chattopadhyay et al. (2009) evidenciou que os extratos etanólicos e aquosos das folhas de *A. indica* possui uma grande atividade inibitória contra as cepas de *S. aureus*. Assim como, pesquisa feita por Alves et al. (2009), mostrou que o extrato das folhas de *A. indica* apresenta efeito antibacteriano frente as cepas de *S. aureus* e *Escherichia coli*.

No entanto, em estudo semelhante, realizado por Beraldo et al. (2014), este mostrou que a atividade a base do extrato hexano e álcool etílico de *A. indica* não apresentaram êxito quanto ao efeito antifúngico, possuindo apenas uma ação discreta quando relacionada ao extrato a base de acetato de etila.

Figura1. Concentração inibitória mínima (CIM) ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e presença de EMAI e bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.



A utilização de produtos naturais de origem vegetal quando associado a antibióticos pode reverter ou modular a sua ação, o que pode alterar na resposta final (GIBBONS, 2004). A junção de aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina) com extratos pode ser uma solução

acessível, pois havendo sinergismo resultaria em uma diminuição da dose terapêutica, consequentemente minimizaria efeitos colaterais emitidas por essa classe de antibióticos (FIGUEREDO et al., 2013).

Na associação do extrato metanólico com os fármacos comerciais junto às bactérias *E. coli* e *S. aureus*, em concentração sub-inibitória, mostrou-se que não obteve a efeito modulador clinicamente relevante quando associado à bactéria multirresistente *E. coli*. Entretanto, quando colocados frente a *S. aureus*, obteve atividade sinérgica, tendo resultados diferentes referentes aos antibióticos.

Para a literatura, a utilização e produtos vegetais frente aos microrganismos apresentam atividade mais intensa em bactérias Gram-positiva, comparada com a Gram-negativa, como aconteceu no resultado da pesquisa (OLIVEIRA et al., 2007).

Segundo Madigan et al (2004) bactérias Gram-Positiva, como é o caso do *Staphylococcus aureus*, apresentam uma sensibilidade maior frente aos antibióticos, comparado com a *Escherichia coli*, pois, as Gram-negativa, em geral, possui maior resistência devido complexidade da sua membrana plasmática, o que pode dificultar a ação de produtos naturais e a atividade de alguns antibióticos (HOLLEY; PATEL, 2005). Tafur et al (2008) diz que bactérias desse gênero expressam enzimas capazes de causar alterações na composição do antibiótico, fazendo com que este não exerça a sua função.

4 CONCLUSÃO

O estudo mostrou que o extrato metanólico das folhas de *Azadirachta indica* A. não apresentaram atividade relevante frente às cepas das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. No entanto, a modulação feita com extrato da mesma, quando acompanhado de aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), apresentava resultados distinto, apontando que o extrato quando junto à amicacina e gentamicina não apresentava resultados relevantes ligado a *E. coli*, entretanto, quando relacionado a *S. aureus* destaca-se por apresentar resultados estatisticamente significantes.

Novas e aprofundadas pesquisas devem ser desenvolvidas em busca da ampliação e comprovação do conhecimento da espécie estudada. Os resultados obtidos são promissores e poderão estimular no desenvolvimento de outras novas pesquisas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, D. P. et al. Chromatographic evaluation and antimicrobial activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) leaves hydroalcoholic extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, 2009.
- AZZOPARDI, A. E. L.; FERGUSON, D.W. The enhanced permeability retention effect: a new paradigm for drug targeting in infection. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 68, n. 1, 2013.
- BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screen in some of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Rev.Bras.Ciê.Farm.** v. 42, n. 1, 2006.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G.; LIMA, E. O.; FALCÃO, S.V, S.; SIQUEIRA, J. J. P. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. **Chemotherapy**. v. 54, n. 1, 2008.
- CHATTOPADHYAY, R. R. et al. A avaliação comparativa do potencial antibacteriano de algumas plantas utilizadas na medicina tradicional indiana para o tratamento de infecções microbianas. **Braz. arco.biol.Tecnologia**, v. 52, n. 5, 2009.
- FIGUEREDO, F. G. et. al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMedResearch International**, v. 1, n. 1, 2011.
- GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. *Emerging Infectious Diseases*. v. 21, n. 1, 2004.
- HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food and Nutrition Sciences**, v. 22, n. 4, 2005.
- JAVADPOUR, M. M. et al. antimicrobial peptide with low mammalian cell toxicity. **J. of medicinal chemistry**, v. 39, n. 1, 1998.
- LEITE, A. M. et al. Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, 2009.
- MACIEL, M. A. et al. plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 1, n. 1, 2002.
- MADINGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, 2005.
- NUNES, J. D.; MACIEL, M. V. A importância da informação do profissional de enfermagem sobre o cuidado no uso das plantas medicinais: uma revisão de literatura. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 10, n. 1, 2017.

OLIVEIRA, G. F. et al. Antimicrobial activity of *Syzygiumcumini* (Myrtaceae) leaves extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, 2007.

OWNA, C. et al. A tree reference and selection guide. 2009. Fonte: Agroforestry Database: (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>).

TAFUR, J.D., TORRES, J.A., VILLEGAS, M.V. Mechanismsofantibioticresistance in Gram negative bactéria. **Infect**, v. 12, n. 13, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VIEIRA, M. R.; PERES, L. S. Uso de extrato foliar de nim, *Azadirachta indica* A. JUSS, para o controle do pulgão *Brevicoryne brassicae* (L.) em cultivos de brócolis. **Cultura agronômica**, v. 2, n. 4, 2017.