



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS AQUOSOS DE SEMENTES E FOLHAS DE *MORINDA CITRIFOLIA* L. (NONI)

Felipe Antunes do Nascimento e Silva¹
Arlete Beatriz Becker Ritt²

Resumo

Morinda citrifolia Linn, planta asiática, muito utilizada na medicina popular. Conhecida como Noni, é uma espécie resistente, pois raramente é atacada por doenças ou insetos. Outros autores já encontraram mais de 200 componentes bioativos dessa planta, como antraquinonas, triterpenos, flavonóides e polissacarídeos, que podem estar relacionados aos efeitos curativos do vegetal. Na literatura, geralmente, só se encontram pesquisas que relacionam as sementes a ácidos graxos ou linoleicos. Nada consta sobre a ação dos extratos proteicos sobre bactérias de importância clínica e agrônômica. Para a quantificação das proteínas presentes no extrato utilizamos o método de Bradford (1976) com medidas de absorvância de comprimento de onda de 595 nm em um Leitor de Placas, tipo Spectramax M3 (Molecular Devices®), utilizando-se uma curva padrão com Albumina Bovina Sérica (BSA). Foram encontradas as quantidades de 1,36 µg/µL de proteínas no extrato de folhas e 1,40 µg/µL para o extrativo das sementes. Nossos resultados mostraram diferenças entre as bactérias testadas: *Staphylococcus aureus* é inibida com alta concentração do extrato das folhas. A bactéria *Escherichia coli* é inibida com ambos os extratos: folhas e sementes. Em *Bacillus cereus* a inibição ocorre quando usamos mais baixas quantidades de proteínas de folhas. Esse efeito modifica quando a bactéria analisada é *Pseudomonas aeruginosa*. Neste caso, a inibição ocorre com elevada concentração de proteínas de folhas. Nossos resultados mostram que as proteínas de folhas ou sementes de *Morinda citrifolia* podem ser usados como protótipos de biopesticidas ou agentes terapêuticos.

Palavras chave: bactérias; proteína; biopesticidas.

INTRODUÇÃO

Morinda citrifolia Linn, pertence a família Rubiaceae. É originária de áreas tropicais e subtropicais do Sudeste Asiático, pode atingir até 10 metros de altura (WANG *et al.*, 2002). O Noni como é conhecido, é muito usado na medicina popular há mais de dois mil anos, dificilmente atacada por pragas, assim sugerindo ser uma matéria-prima potencial de novas drogas contra agentes parasitários de alimentos e causadores de doenças em animais, que é o caso das bactérias (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006).

Suas sementes apresentam uma câmara de ar, facilitando assim sua flutuação pelas águas, alcançando novos territórios. Já sua abrangência continental deve-se ao fato dos frutos maduros servirem como alimento por muitas espécies de morcegos e devido a migração de pessoas (DEGENER, 1929).

1 Aluno do curso de Agronomia – Bolsista PROBITI/FAPERGS – felipeans@gmail.com

2 Professora do PPGBiosauáde – arlete.ritt@ulbra.edu.br

Já foram descritos mais de 200 componentes bioativos que podem estar relacionados com os efeitos curativos do vegetal (PAWLUS *et al.*, 2005). Nosso grupo descreveu a presença, em extratos aquosos obtidos a partir de sementes e folhas, de alta atividade ureolítica, hemoaglutinante, potenciais fatores capazes de inibir atividade de tripsina bovina, o desenvolvimento do caruncho *Callosobruchus maculatus* e das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis*, provavelmente de origem proteica (CRUZ, 2014; BRÉFERE, 2015).

Nada consta na literatura sobre a ação de extratos proteicos desta planta, sobre bactérias de importância clínica e agrônômica (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*). Assim tornam-se necessários estudos, tanto para essa finalidade como para uso humano, veterinário e como para agentes terapêuticos e novas drogas e biopesticidas.

Causando perdas em diversos setores desde a agricultura e pecuária até o mercado final da indústria de alimentos, as bactérias precisam ser combatidas, e para isso é essencial a realização de pesquisas, para encontrar novos métodos ou substâncias capazes de freá-las e assim diminuir essas perdas.

Além de todos os componentes químicos que existem em uma planta, as proteínas merecem uma atenção especial, pois são fundamentais para diversas funções no organismo, estão ligadas à sinalização contra alterações no ambiente, à ação catalítica de enzimas, além de atuarem na defesa vegetal.

Objetivasse analisar a ação, de extratos foliares e de sementes de noni, sobre as bactérias em estudo: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

METODOLOGIA

EXTRATOS PROTEICOS FOLIARES

Proteínas foliares solúveis foram extraídas em 50 mL de tampão fosfato de sódio (NaPB) 10 mM, pH 7,5 contendo 1 mM de β -mercaptoetanol. Para a quantificação das proteínas presentes no extrato utilizamos o método de Bradford (1976), utilizando-se uma curva padrão com Albumina Bovina Sérica (BSA).

EXTRATOS PROTEICO DAS SEMENTES

Proteínas solúveis foram extraídas em 50 mL de tampão fosfato de sódio (NaPB) 10 mM, pH 7,5 contendo 1 mM de β -mercaptoetanol. Foi utilizado o método de Bradford (1976) para quantificação das proteínas utilizando-se uma curva padrão com Albumina Bovina Sérica (BSA).

ENSAIOS PARA A AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA

As bactérias: *Bacillus cereus* ATCC 14579 gentilmente doadas pelo professor Adriano Brandelli, do ICTA, UFRGS e as cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 gentilmente cedidas pela farmacêutica Elaine Staatlander, do Hospital Presidente Vargas. A inoculação foi feita em ágar LB (Luria Bertani) à 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica. A concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos proteicos do noni foi determinada pelo método descrito POMPILIO *et al.* 2011, (com modificações). Diluições seriadas dos extratos foram preparadas em meio LB, correspondendo a uma concentração final de cerca de 10^8 UFC/mL, cada poço foi inoculado de acordo com esquema da TABELA 1, padronizado com 0,5 na escala McFarland. Em espectrofotômetro, foram realizadas leituras das absorbâncias em 620 nm para monitorar o desenvolvimento bacteriano. Após incubação a 37 °C por 24 horas, o MIC (concentração inibitória mínima) foi determinado. De cada poço foram retirados 20 μ L para

serem diluídos seriadamente em solução salina (até diluição 10^6), plaqueadas em ágar LB (método *drop plate*) e incubadas em temperatura ambiente por 24 horas para então determinar as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para cada dosagem. Utilizou-se água oxigenada (H_2O_2) como controle positivo, tampão fosfato de sódio (NaPB) como controle negativo e quatro diferentes cepas bacterianas,

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados do ensaio antimicrobiano foram submetidos a uma análise estatística por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção e quantificação dos extratos

Foram encontradas as quantidades de $1,36 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas no extrato de folhas e $1,40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o extrativo das sementes.

Para a execução da primeira etapa, os extratos vegetais foram antecipadamente quantificados, segundo Bradford (1976), utilizando-se uma curva padrão de BSA e assim aferindo a quantidade de $1,36 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas no extrato das folhas e para o extrato das sementes foi encontrado $1,40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Seguindo-se todas as normas de biossegurança para evitar contaminação, nesta primeira etapa, foram realizados dois ensaios em quadruplicata, para cada bactéria, realizando leitura em absorbância de 620 nm em espectrofotômetro EZ Read 400 – Microplate Reader da marca Biochrom®, imediatamente após o término de cada ensaio, a leitura de hora zero e outra leitura depois que a placa complete 24 horas de incubação em estufa bacteriológica com temperatura constante de 37°C .

Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias - UFCs

Imediatamente após realizar as leituras de absorbâncias 620 nm as placas foram levadas para a câmara de fluxo laminar, foram retirados $20 \mu\text{L}$ da amostra de cada poço e, os mesmos transferidos para nova placa estéril contendo $180 \mu\text{L}$ de solução salina, a fim de obter as diluições seriadas de 10^1 até a diluição 10^6 . Antecipadamente foram identificadas e preparadas placas de Petri estéreis contendo meio de cultura LB com ágar sólido, com o propósito de realizar a semeadura de $20 \mu\text{L}$ das diluições de 10^3 a 10^6 . E depois da incubação “*overnight*” totalizando 24 horas em temperatura ambiente, foi feita a contagem das colônias visíveis e a partir das quantidades encontradas, foram elaborados novos gráficos para uma melhor visualização dos resultados.

DISCUSSÃO

Pode-se dizer que no extrato foliar do Noni a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* multiplicou-se mais em baixa concentração de proteínas, mas quando houve o aumento da concentração dessas proteínas foliares, apresentou um declínio dessa multiplicação. Enquanto que no extrativo das sementes, apresentou inibição nas menores concentrações proteicas, onde houve maior significância, deduzindo que estas possuem ação diferente daquelas presentes no extrato das folhas. Já para a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* ambos os extratos apresentaram diferenças significativas no seu desenvolvimento. Utilizando-se o extrato das sementes, percebe-se que existem inibições nas menores concentrações proteicas, efeito esse que desaparece a medida que se aumenta a concentração de proteínas. Isso pode ocorrer pela presença de metabólitos com ação diferente,

ou porque quanto maior concentração de proteínas maior a concentração dessas moléculas, podendo também existir algum composto/fator inibidor dessas proteínas.

Para as bactérias *Bacillus cereus* percebe-se uma inibição do desenvolvimento bacteriano em concentrações menores do extrato foliar. Esse efeito modifica quando a bactéria analisada é *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse caso o efeito inibidor acontece com o aumento das concentrações proteicas foliares.

Tabela 1: Esquema de concentrações de proteína ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos vegetais suspensão bacteriana, Tampão NaPB, H_2O_2 , e Meio de cultura LB para o experimento

Concentração de Proteína por Amostra ($\mu\text{L/mL}$)	Quantidades de Suspensão, Extratos Vegetais, Tampão, Controle e Meio de Cultura por poço.
2,5	100 μL de suspensão bacteriana + 0,5 μL^* de extrato das folhas + 99,5 μL NaPB
7,5	100 μL de suspensão bacteriana + 1,1 μL de extrato das folhas + 99 μL NaPB
22,5	100 μL de suspensão bacteriana + 3,3 μL de extrato das folhas + 97 μL NaPB
67,5	100 μL de suspensão bacteriana + 9,9 μL de extrato das folhas + 90,0 μL NaPB
2,5	100 μL de suspensão bacteriana + 0,5 μL^* de extrato das sementes + 99,5 μL NaPB
7,5	100 μL de suspensão bacteriana + 1,1 μL de extrato das sementes + 99,0 μL NaPB
22,5	100 μL de suspensão bacteriana + 3,2 μL de extrato das sementes + 97,0 μL NaPB
67,5	100 μL de suspensão bacteriana + 9,6 μL de extrato das sementes + 90,4 μL NaPB
Tampão - NaPB	100 μL de suspensão bacteriana + 100 μL NaPB
Controle positivo – H_2O_2	100 μL de suspensão bacteriana + 100 μL H_2O_2
Controle – Meio de Cultura	100 μL de suspensão bacteriana + 100 μL Meio de cultura (Caldo LB)

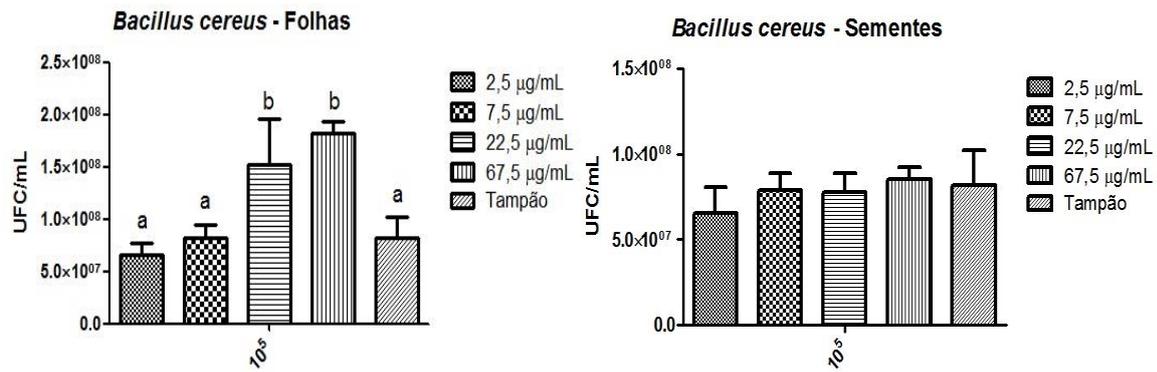


Gráfico 1: Os valores de UFCs/mL correspondem as médias e desvio padrão de quadruplicatas. Quantidades de extrato de folhas e sementes de *noni* (2,5 µL/mL, 7,5 µL/mL, 22,5 µL/mL, 67,5 µL/mL), controle Tampão NaPB, bactéria *Bacillus cereus* na diluição 10⁵. Letras diferentes indicam diferença estatística. (p=0,05)

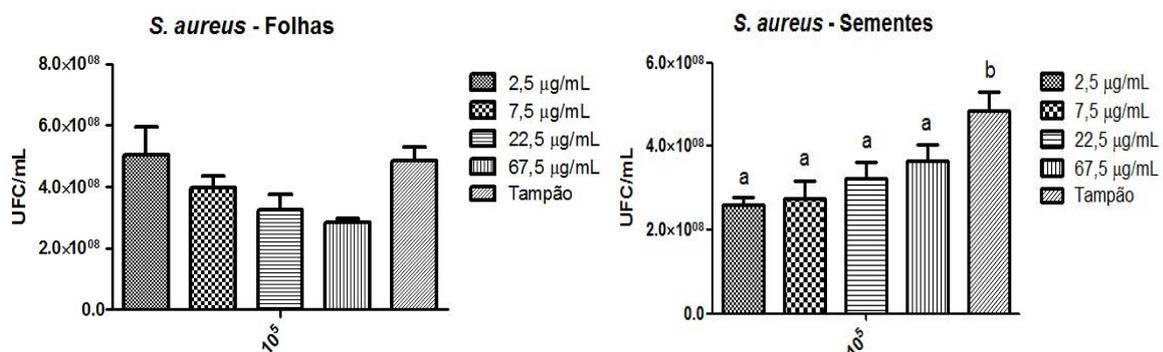


Gráfico 2: Os valores de UFCs/mL correspondem às médias e desvio padrão de quadruplicatas. Quantidades de extrato das folhas e sementes de *noni* (2,5 µL/mL, 7,5 µL/mL, 22,5 µL/mL, 67,5 µL/mL), controle Tampão NaPB, bactéria *Staphylococcus aureus* na diluição 10⁵. Letras diferentes indicam diferença estatística. (p=0,05)

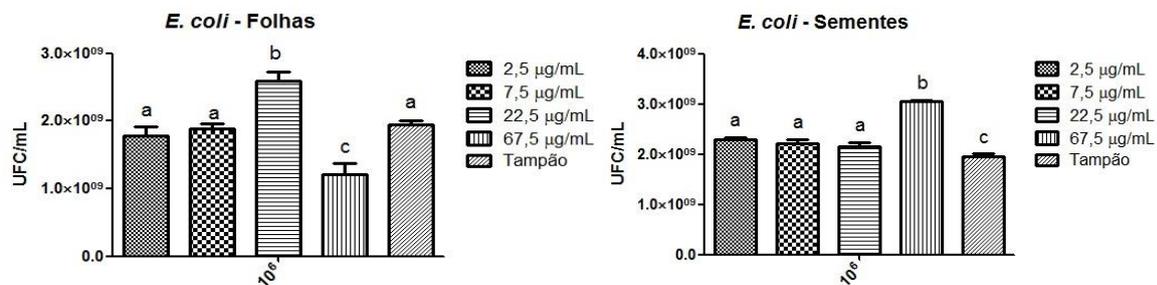


Gráfico 3: Os valores de UFCs/mL correspondem as médias e desvio padrão de quadruplicatas. Quantidades de extrato de folhas e sementes de *noni* (2,5 µL/mL, 7,5 µL/mL, 22,5 µL/mL, 67,5 µL/mL), bem como do controle Tampão NaPB, frente à bactéria *Escherichia coli* na diluição 10⁶. Letras diferentes indicam diferença estatística. (p=0,05)

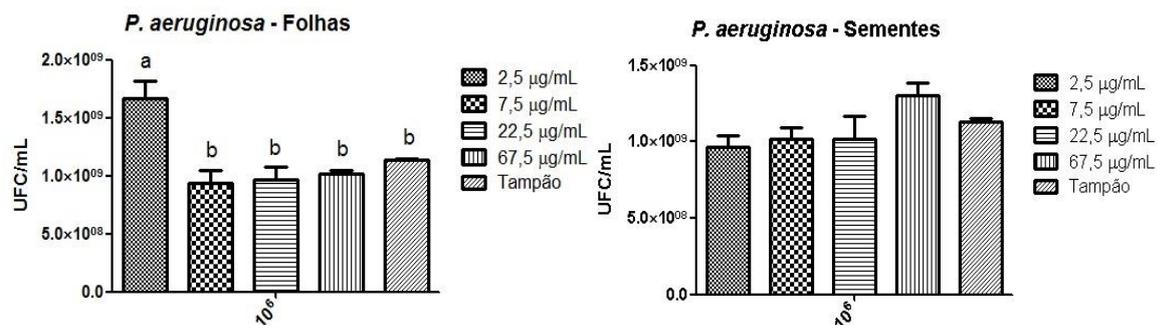


Gráfico 4: Os valores de UFCs/mL correspondem às médias e desvio padrão de quadruplicatas. Quantidades de extrato das folhas e sementes de noni. (2,5 µL/mL, 7,5 µL/mL, 22,5 µL/mL, 67,5 µL/mL), bem como do controle Tampão NaPB, frente à bactéria *Pseudomonas aeruginosa* na diluição 10⁶. Letras diferentes indicam diferença estatística. (p=0,05)

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M.; **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248, 1976.

BRÉFERE, Danielle Alves de Moura: **Avaliação da possível ação inseticida e fungicida dos extratos da folha e da semente de *Morinda citrifolia* L.** Canoas, 2015. 53 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada – MP, Universidade Luterana do Brasil, 2015.

CRUZ, Elkejer Ribeiro da. **Determinação de proteínas tóxicas presentes nas sementes e folhas de noni (*Morinda citrifolia*).** Canoas, 2014. 56 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada – MP, Universidade Luterana do Brasil, 2014.

DEGENER, O. **Ferns and Flowering Plants of Hawaii National Park.** Honolulu Star-Bulletin Ltd., Honolulu, Hawaii, p. 282–283, 1929.

PAWLUS, A.D., SU, B.N., KELLER, W.J., KINGHORN, A.D. An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1720–1722, 2005.

POMPILIO, A.; SCOCCHI, M.; POMPONIO, S.; GUIDA, F.; DI PRIMIO, A.; FISCARELLI, E.; GENNARO, R.; DI BONAVENTURA, G. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients. **Peptides**, p. 1807-1814. 2011.

WANG, M.Y., WEST, B.J., JENSEN, C.J., NOWICKI, D., CHEN, S., PALU, A. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacol. Sin.** v.23, p. 1127–1141, 2002.