

1 **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA A PARTIR DO ÓLEO**
2 **DA *COPAIFERA LANGSDORFII* DESF.**

3 **Mattheus Chagas Ferreira^{1*}, Elinando Ferreira da Silva¹, & CYNTHIA GISELE DE**
4 **OLIVEIRA COIMBRA^{2, 3,4,5}.**

5 Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico, Av. Portugal, 584, 55016-400, Bairro
6 Universitário, Caruaru, PE, Brasil.

- 7 1- Bacharelado do curso de Farmácia da faculdade ASCES.
8 2- Graduada em Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco (2003),
9 3- Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos pela Universidade Federal de Pernambuco
10 (2006) e
11 4- Doutora em Biotecnologia pela RENORBIO (2015).
12 5- Docente da Faculdade ASCES.

13

14 *Contato: Mattheus Chagas Ferreira, Rua João Otávio Paulino n. 121 Malaquias Cardos - Santa Cruz do Capibaribe-PE
15 CEP – 55190-344.

16 E-mail: mattheusonline@hotmail.com

17 **RESUMO:** O uso irracional de antimicrobianos gera consequências como o crescente surgimento
18 de microrganismos resistentes, desta forma amplia-se a procura por novos fármacos com ação
19 antimicrobiana, por conseguinte surgiu o interesse desse estudo que foi avaliar a atividade
20 antimicrobiana do óleo da copaíba *langsdorfii desf.* Frente a microrganismos patogênicos gram-
21 positivos e gram-negativos. Sendo um estudo laboratorial experimental – observacional, através da
22 Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio da técnica de poços; Poder Inibitório(PI) e do
23 Potencial Antibiótico utilizando-se como antibiótico padrão (amoxicilina). O extrato apresentou
24 halo de inibição para as espécies bacterianas *S. epidermidis*, *Lactobacillus* e *S. aureus*.. Para a
25 determinação da toxicidade observou-se um baixo número de mortes em todas as concentrações
26 testadas da amostra obtendo-se uma CL₅₀ de 1.069,1933505487 µg/mL. Concluiu-se que o extrato
27 apresenta uma potencial atividade antimicrobiana bem como que o mesmo possui uma baixa
28 toxicidade conferindo-lhe assim características satisfatórias para torna-se um possível novo fármaco.

29 **Palavras-chave:** Óleo de copaíba, atividade antimicrobiana, *artemia salina*, toxicidade.

30 **ABSTRACT**

31 The irrational use of antimicrobial ones produces consequences like the growing appearance of
32 resistant microorganisms, in this way the search is enlarged by new fármacos with antimicrobial
33 action, consequently it appeared the interest for this study that make valued the antimicrobial
34 activity of the oil of the copaiba tree *langsdorfii desf.* In front of microorganisms patogênicos gram-
35 positives and gram-negatives. Being a study laboratorial experimentally – observacion, through the
36 Least Inhibitory Concentration (CIM) through the wells technique; Inhibitory Power (PI) and of the
37 Antibiotic Potential being used like antibiotic standard (amoxicilina). The extract presented halo of
38 inhibition for the bacterial sorts *S. epidermidis*, *Lactobacillus* and *S. aureus*. For the determination
39 of the toxicity a low number of deaths was observed in all the tested concentrations of the sample
40 when a CL50 of 1.069,1933505487 is obtained µg/mL. it was ended that the extract presents a
41 potential antimicrobial activity as well as that the same thing has a low toxicity checking him so
42 carateristics satisfactory for it becomes a possible new fármaco.

43 **keywords:** Copaiba tree oil, antimicrobial activity, *artemia salt bed*, toxicity.

44 **INTRODUÇÃO**

45 O uso indiscriminado de antibióticos vem causando sérios transtornos no que diz respeito a
46 resistência microbiana e infecções oportunistas, impulsionando a busca por novos agentes
47 antimicrobianos (ARAÚJO et al. 2004).

48 Os microrganismos estão amplamente distribuídos no solo, na água, no ar, nos alimentos e
49 compondo a microbiota dos seres vivos, cerca de 3% destes microrganismos são patogênicos e 10%
50 são oportunistas; entre os principais agentes etiológicos de doenças infecciosas no homem estão as
51 espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Candida* entre outros; os
52 processos infecciosos causados por agentes microbianos oportunistas são muito frequentes no
53 Brasil, visto que, fungos e bactérias são os principais causadores de doenças em regiões tropicais e
54 em pacientes imunocomprometidos e imunodeficientes (ARAÚJO et al. 2004; ALVES et. al. 2000).

55 A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é
56 uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JR et al. 2005). A
57 atividade biológica de plantas medicinais tem sido objeto de intensa investigação científica, pois
58 estas produzem uma grande variedade de compostos, produto do metabolismo secundário, que
59 conferem propriedades antimicrobianas (ALVES et al., 2000; ADAM et. al. 1998; DUARTE,
60 2005).

61 Os metabólitos secundários são substâncias produzidas naturalmente por plantas, fungos,
62 bactérias, protozoários e animais em resposta a estímulos externos, tais como alterações
63 nutricionais, infecção e competição (STROHL, 2000). Estes compostos são quimicamente
64 variados, sendo de particular interesse os terpenoides, alcalóides e compostos fenólicos, por
65 apresentarem ação antimicrobiana; muitos extratos e óleos essenciais isolados a partir de plantas
66 têm se mostrado eficaz no controle de microrganismos patógenos (GRETHER e MARTINEZ,
67 1996; HAIDA et al. 2007).

68 Existe evidência científica de que as plantas possuem um vasto e complexo arsenal de
69 princípios ativos, com capacidade de restaurar, curar e proteger; Os medicamentos à base de plantas
70 (MBP), orais e tópicos, tornaram-se algumas das terapias alternativas mais utilizadas. Grande parte
71 inclui substâncias vegetais usadas há vários séculos, na medicina popular (PINTO, 2013).

72 O Brasil possui um grande potencial para a biodiversidade e tem uma riqueza de
73 conhecimento tradicional acumulado pela população que possui acesso direto a natureza e aos
74 produtos da biodiversidade (ALBAGLI, 2001). Medicamentos derivados de produtos naturais são
75 capazes de tratar 87% das enfermidades humanas categorizadas, incluindo as indicadas como
76 antibacterianas, anticoagulantes, antiparasitárias, imunossupressoras e anticancerígenas.
77 (NEWMAN, 2003).

78 **OBJETIVO**

79 Diante do exposto exacerbou-se a necessidade do estudo, sobre o potencial antimicrobiano e
80 determinação da toxicidade do óleo essencial de copaíba *langsdorfii* Desf.

81 **MATERIAL E MÉTODOS**

82 **Material Vegetal**

83 O óleo resina foi obtido mediante compra em Adval Farmácia de Manipulação LTDA,
84 acompanhado de laudo técnico, com o número da nota n:32321. O presente estudo foi realizado nos
85 laboratórios da Faculdade ASCES onde foi avaliada a atividade antimicrobiana do óleo da
86 *Copaifera langsdorfii* Desf.

87 **AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA**

88 A avaliação da ação antimicrobiana foi realizada *in vitro* sendo utilizadas como indicadoras
89 cinco cepas de microrganismos padrão de bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *P.*
90 *aeruginosa*, das Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 3613, *Lactobacillus*, *S. epidermidis*,.
91 As cepas utilizadas pertenciam ao banco de cepas de microrganismos, do laboratório de
92 microbiologia da ascés.

93 *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

94 A Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo foi realizada a partir da
95 técnica de poços, e foram preparados inócuos dos respectivos patógenos em solução salina, a partir
96 de semeio por esgotamento feito anteriormente, para controlar a concentração bacteriana será
97 utilizada a escala 0,5 de *Marc- Farland*. Com o auxílio do swab, serão semeadas com o inóculo
98 toda a extensão das placas de Petri contendo *Ágar Mueller-Hinton* (para bactérias).

99 Em cada placa semeada foram confeccionados quatro poços de 6 mm de diâmetro, para a
100 inserção de 50µL do óleo em diferentes concentrações, a partir de diluições em 50%, 25%,12,50% e
101 6,25% com relação à amostra inicial de cada extrato bruto seco das plantas, o procedimento será
102 realizado em duplicata.

103 Após essa etapa, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, para posterior mensuração
104 dos halos em milímetros (mm) e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo
105 esta estendida como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento bacteriano.

106 O Poder Inibitório foi realizado pela técnica de difusão em poços onde foi observada a
107 formação ou não de halos inibitórios ao redor dos poços que serão preenchidos com o óleo da
108 *Copaifera langsdorfii Desf.* no meio *Ágar Muller-Hinton* contendo a bactéria semeada.
109 Posteriormente, foi verificado o diâmetro dos halos que se formaram ao redor dos poços contendo
110 os extratos e avaliado se as concentrações presentes nos mesmos caracteriza a bactéria como
111 sensível, intermediária ou resistente para determinadas concentrações.

112 *Determinação da concentração inibitória mínima de aderência (CIMA)*

113 A avaliação da menor concentração do óleo, em meio de sacarose, necessária para inibir a
114 aderência dos microrganismos ao tubo do vidro, é denominada como Concentração Inibitória
115 Mínima de Aderência (CIMA). A Concentração Inibitória Mínima de Aderência foi determinada na
116 presença de 5% de sacarose, usando-se concentrações crescentes e sucessivas das soluções diluídas
117 do óleo, onde as linhagens foram sub-cultivadas a 37 °C em caldo Müller-Hinton (DIFCO), em
118 microaerofilia, por um período de 24 horas, para obtenção de um inóculo de 10⁶ UFC/mL, onde

119 foram incubados nos tubos com os meios acrescentando uma alíquota de 10µL de suspensão
120 bacteriana, sendo os tubos inclinados a 37°C (KONEMAN, 2008).

121 *Poder Inibitório (PI)*

122 O Potencial Inibitório indicará se o óleo utilizado apresenta ou não ação antibiótica frente às
123 bactérias testadas no ensaio. O processo consiste em observar a formação de halos ao redor dos
124 discos que contém o óleo dos espécimes, os quais serão impregnados no meio do *Ágar Muller-*
125 *Hinton* contendo a bactéria semeada (KONEMAM, 2008).

126 Replicou-se a bactéria suspensas em 7 mL de soro fisiológico dentro de tubos de ensaio e em
127 seguida embebedou o swab com essa solução. A bactéria foi repicada para a placa de Petri que já
128 estava com o meio *Agar Mueller-Hinton*, previamente esterilizado e realizou-se o semeio em forma
129 de tapete. Dando seguimento ao teste, foi feito os poços na placa, os quais foram preenchidos com
130 50µL da diluição do óleo representando as concentrações de 50%, 25%, 12,5% e 6,25% em relação
131 à amostra inicial (0,5 g de óleo). Para controle foi utilizado o antibiótico Amoxicilina.
132 Posteriormente, foram colocados na estufa a 37°C por no mínimo 18 horas. A avaliação foi feita
133 verificando-se, com o auxílio de uma régua, o diâmetro do halo formado ao redor do disco contendo
134 o óleo.

135 O Poder Inibitório foi realizado pela técnica de difusão em poços onde foi observada a formação ou
136 não de halos inibitórios ao redor dos poços que foram preenchidos com o óleo da *Copaifera*
137 *langsdorfii* Desf. no meio *Ágar Muller-Hinton* contendo a bactéria semeada. Posteriormente, foi
138 verificado o diâmetro dos halos que se formaram ao redor dos poços contendo os extratos e avaliado
139 se as concentrações presentes nos mesmos caracteriza a bactéria como sensível, intermediária ou
140 resistente para determinadas concentrações.

141 *Avaliação Toxicológica (CL₅₀)*

142 Os ovos de *Artemia salina* foram encubados durante um período de 48 h para que houvesse
143 a eclosão das larvas (Metanáuplios) estas foram separados em 7 grupos contendo 12 metanauplios
144 em cada grupo. O primeiro grupo recebeu a solução controle (água marinha) e as 6 seguintes
145 receberam diferentes concentrações (1000µg/mL, 750µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 100µg/mL, e
146 50µg/mL) do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), as *Artemias* foram colocadas por um
147 período de 24h sob iluminação artificial. As observações foram feitas após este período, quando se
148 contabilizou o valor numérico de larvas vivas e mortas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

149 RESULTADOS E DISCUSSÃO

150 Preparou-se as soluções do óleo-resina de copaíba, observando a sua homogeneidade das
151 mesmas logo após a obtenção e após o repouso dos frascos. As soluções mantiveram
152 homogeneas, ou seja, não apresentou partículas oleosas imiscíveis, indicando que as soluções
153 estavam adequadas para o teste. O óleo de Copaíba *langsdorfii* Desf apresentou ação inibitória nas
154 concentrações de 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, apresentando halos de Concentração Mínima
155 Inibitória (CMI) e de Concentração Mínima Bactericida (CBM) de nas bactérias de 14mm *S.*
156 *epidermidis*, de 12mm *Lactobacillus* e de 11mm *Staphylococcus aureus*, entretanto não apresentou
157 halos de inibição nas concentrações e condições testadas para as seguintes bactérias: *Escherichia*
158 *coli* sp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 7546, *KLebsiella pneumoniae* sp, conforme a Tabela 1 e
159 Tabela 2.

160 Em um ensaio realizado por Mendonça, et al (2009) utilizando o óleo de *Copaifera multijuga*
161 Hayne, demonstrou que entre as cepas bacteriana utilizadas a mais sensível foi *S. aureus* com (PI)
162 de 3,12 mm.

163 Com base nos valores obtidos da Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) o óleo
164 foi ativo apenas frente as cepas *S. epidermidis*, *Lactobacillus e Staphylococcus aureus*, que são
165 Gram+ sendo assim o óleo de copaiba *langsdorfii* Desf só teve ação frente bactérias Gram
166 positivas, já no estudo de “Mendonça et al. 2009” a *E. Coli* e *P. Aeruginosa* que são Gram
167 negativas obtiveram uma boa sensibilidade.

168 Na avaliação da Determinação do Potencial Antibiótico a relação entre a comparação do
169 antibiótico padrão (amoxicilina) com o Copaíba *Langsdorfii* Desf observou-se que o óleo
170 apresentou uma atividade bastante satisfatória, pois foi capaz de inibir as bactérias *S. epidermidis*,
171 *Lactobacillus e S. aureus*. Os halos de inibição obtidos pelo óleo para *S. epidermidis* foram de
172 14mm na concentração de 50%, de 13mm em 25%, de 9mm em 12,5% e de 6mm em 6,25%, para

173 *Staphylococcus aureus* os halos foram de 11mm na concentração de 50%, 10mm em 25%, de 9mm
174 em 12,5% e de 9mm em 6,25% e para o *Lactobacillus* de 12mm na concentração de 50%, 10mm
175 em 25%, 9mm em 12,5% e 6mm em 6,25%. Os halos de inibição apresentados pela amoxicilina para
176 *S. epidermidis* foram de 15mm na concentração de 50%, de 12mm em 25%, de 11mm em 12,5% e
177 de 7mm em 6,25%, para *Lactobacillus* os halos foram de 16mm na concentração de 50%, 14mm em
178 25%, de 12mm em 12,5% e de 7mm em 6,25% para *Staphylococcus aureus* os halos foram de
179 20mm na concentração de 50%, 17mm em 25%, de 16mm em 12,5% e de 15mm em 6,25%.

180 GRÁFICO 1. Determinação do Potencial inibitório do óleo em comparação com a
181 amoxicilina(PAA) frente a *S. Aureus*.

182 No estudo feito por “Pribul et al. 2011” demonstrou uma ação da amoxicilina de baixa
183 resistência ao antibiótico tendo ele uma alta sensibilidade, sendo ótimo para um estudo comparativo
184 que apresentou uma atividade já que os mesmo possuem um potencial de ação parecidos

185 No bioensaio de toxicidade, após 24 horas de exposição da *Artemia salina* Leach, observou-se
186 que houve baixo número de óbitos em todas as concentrações testadas da amostra de óleo de
187 copaíba. Desta forma, através de todos os fatos observados foi comprovado experimentalmente que
188 a amostra apresentou um CL_{50} de 1.069,1933505487 $\mu\text{g/mL}$, que representa que o óleo analisado
189 não apresenta toxicidade para a *Artemia salina* nas concentrações e condições testadas.
190 Considerando que o potencial tóxico é numericamente superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao teste
191 com *Artemia salina* Leach (CL_{50}), visto que só são consideradas com baixa toxicidade substâncias
192 que tenham $TAS > 1000 \mu\text{g/mL}$ ($1 \mu\text{g/mL} = 1\text{ppm}$). O número de mortos foi proporcional ao
193 aumento das concentrações testadas, durante a leitura a espécie *Artemia salina* apresentou
194 movimento parecido com a do controle segundo a equação de reta que deu um resultado de CL_{50} de
195 1.069,1933505487 $\mu\text{g/mL}$.

196 Um estudo feito “PIERI, 2012” comprovou que as outras espécies de copaíba *langsdorffii* Desf.
197 não houve sobre a atividade citotóxica sobre as larvas de *A. salina*. As amostras foram
198 consideradas inativas, pois apresentaram DL₅₀ superior a 1000 µg/m.

199 **CONCLUSÃO**

200 De acordo com os resultados obtidos foi possível concluir que o óleo-resina da *Copaifera*
201 *Langsdorffii* Desf., apresentou uma boa atividade antimicrobiana bem como que o mesmo possui
202 uma baixa toxicidade conferindo-lhe assim características satisfatórias para torna-se um possível
203 novo fármaco.

204 **AGRADECIMENTOS**

205 Primeiramente a Deus por nos permitir a realizar este trabalho. Aos meus pais por
206 proporcionarem sempre o melhor para minha formação acadêmica.

207 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

208 ADAM, Konstantia et al. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*,
209 *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. **J.**
210 **Agric. Food Chem.** Tessalônica, v. 46 n.5 Abril, 1998.

211 ALVES, Tânia Maria de Almeida, et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem.**
212 **Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95 n. 3 May/Jun. 2000.

213 ARAÚJO, José Carlos L.V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos
214 potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Rev. de Patol. Tropi.** v. 33 n.1, Jan/Jun,
215 2004.

216 B.R. Pribull¹, I.A. Pereira¹, L.C. Soares¹, S.M.O. Coelho², I.L. Barberis³, L. Pascual³, M.M.S.
217 Souza², Resistência bacteriana e ação das bacteriocinas de *Lactobacillus* spp em *Staphylococcus*
218 *aureus* isolados de mastite bovina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.3, p.744-748, 2011.

219 DUARTE, Marta Cristina Teixeira et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants.
220 **J.Ethnopharmacol.** v. 97 n. 2, Fev. 2005.

221 GREATHER, Rosalva; MARTINEZ-BERNAL, Angelica. *Mimosa tejupilcana*, a new species of
222 series *Plurijugae* (Leguminosae) from the State of Mexico, Mexico. **Systematic Botany.** v. 21, n. 4,
223 1996.

224 HAIDA, Kimiyo Shimomura et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies
225 de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 3, Set./Dez. 2007.

226 Davidy Eduardo Mendonça, Sideney Becker Onofre. Atividade antimicrobiana do óleo-resina
227 produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae), Universidade Paranaense,
228 UNIPAR, Campus de Francisco Beltrão, PR, Av Julio Assis Cavalheiro 2000.

229 NEWMAN, David J., CRAGG, Gordon M, e SNADER, Kenneth M. Natural Products as Sources
230 of New Drugs over the Period 1981–2002 **Journal of Natural Products.** v. 66 n. 7, 2003.

- 231 PINTO, M. da R. Utilização de Materiais de Origem Vegetal em Produtos Farmacêuticos e
232 Cosméticos de Aplicação Cutânea. Dissertação apresentada na Universidade Lusófona de
233 Humanidades e Tecnologias para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas,
234 Lisboa, 2013.
- 235 STROHL W. The role of natural products in a modern drug discovery program. DDT 5:39–41,
236 2000.
- 237 VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais:
238 cura segura? **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, June 2005.
- 239 PIERI, F.A. atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (*copaifera langsdorffii*) e seus constituintes, e
240 avaliação do bioproduto obtido na inibição de bactérias da placa dental de cães. UFV, VIÇOSA ,2012.