

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE
BREU BRANCO

MANAUS - AM

2019

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR – ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

BIANCA NUNES MIRANDA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE BREU
BRANCO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do curso
Ciências Biológicas da Universidade
do Estado do Amazonas para
obtenção do título de licenciatura em

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosilene
Gomes da Silva Ferreira
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Larissa de
Souza Kirsch

Manaus – AM
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

M672a Miranda, Bianca Nunes
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO IN
VITRO DOS EXTRATOS DE BREU BRANCO / Bianca
Nunes Miranda. Manaus: [s.n], 2019.
31 f.: il.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador: Ferreira, Rosilene Gomes da Silva

Coorientador: Kirsch, Larissa de Souza

1. protium. 2. breu comercial. 3. antimicrobianos.
4. enzimas. I. Ferreira, Rosilene Gomes da Silva (Orient.).
II. Kirsch, Larissa de Souza (Coorient.). III. Universidade
do Estado do Amazonas. IV. AVALIAÇÃO DO
POTENCIAL BIOLÓGICO IN VITRO DOS EXTRATOS
DE BREU BRANCO

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

BIANCA NUNES MIRANDA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE BREU
BRANCO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do curso
Ciências Biológicas da Universidade
do Estado do Amazonas para
obtenção do título de licenciatura em
Ciências Biológicas

Data de aprovação: Manaus, 13 de novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a (Larissa de Souza Kirsch)
Universidade do estado do Amazonas- UEA



Prof. Msc. (Leandro Barreto Dutra)
Universidade do estado do Amazonas- UEA



MSc. (Carlos Eduardo de Castro Alves)
Universidade federal do Amazonas- UFAM

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força e fôlego de vida que Ele me concede todos os dias, além disso Ele me cerca de pessoas que me apoiam e que me ajudam a avançar dia após dia na minha caminhada acadêmica e na minha vida social.

Aos meus pais, que sempre lutaram para dar a melhor educação e sempre trabalharam muito para nunca não nos faltar nada. Aqui destaco o principalmente a insistência da minha mãe que acreditou e insistiu na minha entrada na universidade pública.

Ao meu marido, que sempre muito companheiro me apoiava e não me deixava desfalecer nas dificuldades.

Às minhas orientadoras, Rosilene Ferreira e Larissa Kirsch que me ensinaram e acreditaram no meu potencial.

Às minhas colegas de laboratório da ESA, Cleudiane e Aldiane, que me ajudaram durante as fases de experimento e que buscavam junto comigo o melhor desempenho dos testes realizados.

Às amigas que a faculdade me apresentou, Victoria Dandara e Kate Cascaes, que eram a minha alegria dentro e fora de sala de aula, além disso, elas nunca deixaram de acreditar que eu era capaz.

A todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui.

“Mas pela graça de Deus sou o que sou, e a graça que Ele me deu não ficou sem resultados...” 1 Coríntios 15:10

RESUMO

As espécies do gênero *Protium*, pertencente à família Burseraceae, são endêmicas no Brasil, principalmente na região amazônica. Elas são produtoras de uma resina oleosa, rica em óleos essenciais e triterpenos. Pesquisas científicas já comprovam atividades terapêuticas anti-inflamatória, antitumoral, antinociceptiva, imunoestimulante; sendo, portanto, um potencial para encontrar bioativos que possam agir contra microrganismos e enzimas digestivas através de extratos. O aumento de microrganismos resistentes, as hiperglicemias, dislipidemias e obesidade constituem atualmente graves problemas de saúde pública, elevando assim a necessidade de novos fármacos e novas classes de antibióticos para combater esse mal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biológico do breu comercial amazônico e investigar sua atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; seu potencial antifúngico contra *Candida albicans*; bem como verificar possíveis atividades inibitórias dos extratos sobre enzimas digestivas. A obtenção do extrato bruto ocorreu por maceração e sonicação, utilizando os solventes: hexano, acetato de etila e etanol. Adicionalmente, testes antimicrobianos frente a diversas cepas de bactérias e fungos, e testes de atividades inibitórias sobre as enzimas digestivas foram realizados. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que os extratos de breu não possuem princípios ativos com ação antimicrobiana na concentração de 500 ug/mL para esses microrganismos. Dentro das frações obtidas do Breu Branco tanto por maceração como por sonicação pode-se observar que não apresentaram atividade inibitória significativa para as enzimas digestivas: amilase e lipase, mas, no caso da enzima α -glicosidase (de fungo), observou-se que todas as frações mostram ação inibitória por mecanismo redutor. Portanto, sugere-se que outras concentrações possam ser testadas e, apesar de não obtermos resultados relevantes neste estudo, os extratos do breu são considerados como potenciais para outras doenças ou microrganismos ainda não testados.

Palavras-chave: *Protium*; breu comercial; antimicrobiano; enzimas.

ABSTRACT

The species of the genus *Protium*, belonging to the family Burseraceae, are endemic in Brazil, mainly in the Amazon region, producing an oily resin rich in essential oils and triterpenes. Scientific research has already demonstrated anti-inflammatory, antitumor, antinociceptive and immunostimulant therapeutic activities, being potential to find bioactive that can act through extracts against microorganisms and digestive enzymes. The rise of microorganisms resistant to hyperglycemia, dyslipidemia and obesity represents nowadays a serious public health problems, thus raising the need for new drugs and new classes of antibiotics to combat this disease. The main objective of this work was to evaluate the antimicrobial potential of extracts of the Amazonian commercial product against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*; antifungal against *Candida albicans*; as well as verify the possible inhibitory activities of extracts on digestive enzymes. The crude extract was It was obtained by maceration and probe using the solvents: hexane, ethyl acetate and ethanol. Additionally, they test antimicrobials against various bacterial and fungal strains, and test inhibitory activities on how digestive enzymes were performed. According to the results obtained, it can be stated that rosin extracts do not have active ingredients with antimicrobial action at a concentration of 500 µg / mL for these microorganisms. Within the fractions obtained from Breu Branco by both maceration and sonication it can be observed that they did not show significant inhibitory activity for the digestive enzymes: amylase and lipase, but in the case of the α -glycosidase enzyme it was observed that all fractions show inhibitory action. by reducing mechanism. Thus, it is suggested that other concentrations may be tested and although we do not obtain relevant results in this study, rosin extracts are still considered as potential for other diseases or microorganisms not yet tested.

Keywords: *Protium*; pitch Breu; antimicrobial; enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figuras

Figura 1 – Esquema da metodologia de difusão em Ágar	20
Figura 2 – Esquema da diluição das enzimas	22
Figura 3 – Atividade antifúngica após 48h	24

Tabelas

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de extratos de breu branco contra diferentes linhagens de *E. coli*, *Staphylococcus spp* e levedura *Candida albicans* 23

Tabela 3: Tabela de resultados de atividade inibitória das enzimas; Breu Branco Maceração Hexano (BBMH); Breu Branco Maceração Acetato (BBMA); Breu Branco Maceração Etanol (BBME); Breu Branco Sonicação Hexano (BBSH); Breu Branco Sonicação Acetato. (BBAS); Breu Branco Sonicação Etanol (BBSE) 25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Fármacos de origem vegetal	11
1.2 Metabólitos secundários	12
1.3 Breu branco	12
1.4 Antimicrobianos	12
1.5 Microrganismos resistentes	14
1.6 Enzimas digestivas e saúde pública	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. METODOLOGIA	18
3.1 Material Vegetal	18
3.2. Obtenção dos extratos de breu branco	18
3.2.1 Maceração	18
3.2.2 Sonicação	18
3.3 Determinação da atividade antimicrobiana	18
3.4 Determinação de atividades enzimáticas (<i>in vitro</i>)	20
3.4.1 atividade inibitória α-amilase	20
3.4.2 Atividade inibidora α-glucosidase	20
3.4.3 Atividade inibitória da lipase	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Atividade antimicrobiana	22
4.2 Atividade inibitória enzimática	25
5. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fármacos de origem vegetal

Registros históricos mostram a utilização de plantas de forma empírica para o tratamento de doenças e infecções (DUARTE, 2006). Há registros de que, desde a Antiguidade, os povos já faziam uso de produtos naturais tais como plantas e ervas, terra quente e óleos para tentar tratar feridas e infecções. Pesquisas mais atualizadas mostram que substâncias isoladas a partir de vegetais apresentam atividade biológica com potencial para produção de fármacos, fazendo assim que estudos se potencializem para a busca de bioativos de origem natural.

Através dos estudos de Serturmer, foram descobertas propriedades oriundas da seiva do ópio, extraído de *Papaver somniferum*, descobrindo-se a morfina, a qual há mais de 200 anos é um dos analgésicos mais utilizados na medicina (SENGER, 2017). Desde então, diversos outros produtos naturais com propriedades farmacológicas foram isolados de plantas, o que levou à descoberta de novos fármacos, têm-se como exemplos: aspirina®, derivada da salicina que é encontrada em diversas plantas do gênero *Salix* (BUTTLER, 2004; STROBEL, 2004); a quinina (antimalárica) foi isolada das cascas da quina *Cinchona* sp. (COSTA, 2009), bem como a atropina utilizada até hoje no tratamento de problemas cardíacos e isolada de *Atropa beladonna* (CALIXTO, 2008).

1.2 Metabólitos secundários

Dentre os diversos reinos, o vegetal recebe destaque por oferecer uma ampla variedade de metabólitos secundários, muitos deles com um grande valor agregado em suas aplicações nos mais diversos ramos da indústria, incluindo a de substâncias antimicrobianas (VIZZOTTO et al., 2010).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos vitais de um organismo, tais como seu crescimento, desenvolvimento e reprodução; ao contrário dos metabólitos primários, a ausência dos metabólitos secundários não acarreta a morte imediata. Essas moléculas possuem frequentemente um importante papel na defesa contra predação e em estratégias de competição.

A produção de metabólitos secundários em plantas está diretamente relacionada com fatores externos, os estímulos causados pelo ambiente em que a planta se encontra podem ocasionar a biossíntese de diferentes compostos (BEZERRA *et al.*, 2008). Podem ser ressaltados como exemplos desses estímulos interações planta/microrganismos, planta/insetos ou planta/planta. Não apenas fatores bióticos, mas também abióticos, como temperatura, nutrição, luminosidade, época e horários de coleta, pluviosidade e, até mesmo, as técnicas empregadas na coleta do material vegetal. Destaca-se, ainda, a correlação entre os fatores citados anteriormente, podendo em conjunto exercer uma influência no metabolismo secundário (MORAIS, 2009).

1.3 Breu branco

A família Burseraceae representa um dos grandes táxons botânicos presentes na floresta amazônica e é notável por suas espécies, as quais possuem uma resina oleosa, rica em óleos essenciais e triterpenos. Ela compreende dezoito gêneros com aproximadamente setecentas espécies, e o principal gênero representante da família é o *Protium*, com 150 espécies difundidas em todo o Brasil, sobretudo na região amazônica. As árvores do gênero *Protium* são popularmente chamadas de breu branco por sua resina característica e utilizadas pela medicina popular como anti-inflamatório, analgésico, expectorante e cicatrizante (MARQUES, 2010).

No Brasil essa resina é extraída principalmente dos troncos das árvores das espécies *P. heptaphyllum*, *P. kleinii* e *P. icicariba*, as quais são encontradas em abundância no Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Amazônia. O breu possui um grande valor econômico, pois representa uma fonte para produção de óleos essenciais, cosméticos fixadores para tintas, vernizes e são utilizados também pela população tradicionais como repelentes e no tratamento de enfermidades, apresenta atividades terapêuticas anti-inflamatória, antitumoral, antinociceptiva, imunestimulante já comprovadas cientificamente (DALY, 2012; RÜDIGER, 2008).

1.4 Antimicrobianos

Substâncias antimicrobianas constituem uma classe de fármacos indiscutivelmente indispensável aos seres humanos, já que a ausência deles acarretaria perdas na expectativa de vida que, ao longo das últimas décadas,

conquistamos. Podem ser classificadas como antimicrobianas substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos, inibindo o seu crescimento ou causando sua destruição (SÁEZ-LLORENS, 2000).

Primordialmente, os antibióticos foram definidos como substâncias químicas sintetizadas por várias espécies de microrganismos, vegetais e animais, que dificultam o crescimento de outros (TAVARES, 1990). Em 1910, o primeiro fármaco sintético foi desenvolvido por Herlich para tratar a sífilis e, nos vinte anos seguintes, poucos progressos foram feitos. No final do século XIX, os pesquisadores estavam altamente empenhados em desenvolver um tratamento mais eficiente, até que, em 1928, Alexander Fleming descobriu a penicilina acidentalmente. Após um evento de contaminação em seu laboratório, postulou que o fungo do gênero *Penicillium* seria de alguma forma capaz de inibir o crescimento bacteriano (PEREIRA *et al.*, 2005).

Em 1934, houve a introdução da proflavina, um antisséptico de uso tópico, muito utilizada na Segunda Guerra Mundial, entretanto sua alta toxicidade inviabilizava o tratamento de infecções sistêmicas, evidenciando a necessidade de agentes mais eficientes (CROTY, 2012).

No ano de 1935, o médico polonês evidenciou um marco nos fármacos sintéticos através da descoberta de que o corante vermelho prontossil apresentava atividade *in vivo* contra infecções causadas por espécies de *Streptococcus*. A partir de então, o prontossil originou uma nova classe de antibióticos sintéticos, as sulfas ou sulfonamidas, que compôs a primeira classe de agentes efetivos contra infecções sistêmicas introduzida no início dos anos 1940.

Entre os anos de 1940 a 1960, foram descobertos vários antibióticos através de produtos naturais microbianos, a maioria eficaz para o tratamento de bactérias Gram-positivas, como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina e outros, sendo que apenas três derivados sintéticos foram desenvolvidos e introduzidos no mercado nesse período: isoniazida, trimetropim e metronidazol.

Entre 1960 e 1980, os antibióticos semissintéticos foram introduzidos no mercado para tratar patógenos Gram-positivos e Gram-negativos. Entre 1980 e 2000, com os avanços tecnológicos da época, as principais ferramentas usadas na busca de novos antibióticos foram a genômica em conjunto com as triagens de produtos naturais microbianos. Entretanto, houve uma drástica redução de identificação de

novas substâncias antimicrobianas e concomitantemente ocorreu o aumento na resistência bacteriana (CROTY, 2012).

Observa-se um aumento da incidência de infecções sistêmicas causadas por fungos oportunistas nessas últimas anos, e deve-se à resistência destes frente a frente às classes atuais de antifúngicos, o que está correlacionado com o uso indiscriminado dos mesmos (CORTEZ et al., 2015). Os antifúngicos mais consumidos possuem efeitos colaterais adversos aos pacientes, que incluem hipersensibilidade, reações alérgicas e imunossupressão (ZARDO, 2004).

Das espécies de fungos que requerem mais atenção, destaca-se o gênero *Candida* spp., que segundo Cortez (2015) é responsável por cerca de 80% das infecções fúngicas no ambiente hospitalar e constitui causa relevante de infecções de corrente sanguínea.

1.5 Microrganismos resistentes

Atualmente um dos maiores problemas de saúde pública são microrganismos patogênicos resistentes às drogas e terapias. A resistência a antibióticos e drogas antimicrobianas é, e provavelmente continuará sendo, alvo de atenção, pois é causada pela mutação espontânea e pela recombinação de genes, criando uma variabilidade genética. As drogas usadas atuam como agentes seletivos como consequência do uso indiscriminado (BAPTISTA, 2013).

Como consequência, medidas de controle na utilização de antibióticos vêm sendo adotadas por órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos. Do ponto epidemiológico, microrganismos resistentes são aqueles resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos. Na perspectiva de laboratório é o crescimento desse microrganismo em cultura *in vitro* na presença de concentrações de antimicrobianos ou resistindo a, pelo menos, duas classes de antibióticos que deveriam interferir no seu crescimento. Por volta de 1950, os primeiros surtos de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina foram registrados em ambiente hospitalar (OLIVEIRA et al., 2008).

Segundo Tortora (2012), quando a resistência é decorrente de mutações, ela é transmitida: verticalmente, por meio dos mecanismos de reprodução dessas bactérias, e dessa forma a progênie passa a carregar essa característica de seus micróbios

parentais, levando, dentro de um curto período de tempo, toda a população a ser resistente; e horizontalmente com transferência de material genético.

Não apenas bactérias representam um desafio frente à resistência a drogas, mas falhas no tratamento de infecções decorrentes de fungos também são um grave problema, devido aos seus mecanismos de resistência e disseminação que também levantam um alerta (COSTA et al., 2015).

De fato, o aumento de microrganismos resistentes, principalmente entre patógenos potencialmente perigosos, tem levado a um aumento na necessidade de novos fármacos e novas classes de antibióticos, tanto para infecções adquiridas em hospitais quanto na comunidade (CONRADO, 2014).

1.6 Enzimas digestivas e saúde pública

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADAs, 2015), as hiperglicemias, dislipidemias e obesidade constituem atualmente graves problemas de saúde pública. Para a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBS, 2007), os fatores que influenciam o aumento de indivíduos diabéticos são o envelhecimento populacional, a maior urbanização, a crescente prevalência de obesidade e o sedentarismo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. No Brasil, a obesidade cresce cada vez mais, como apontam alguns levantamentos do IBGE (2015), segundo os quais mais de 60% da população está acima do peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obesidade. Devido à grande prevalência da obesidade e à repercussão negativa de tratamentos passados, a comunidade médica anseia por tratamentos farmacológicos eficazes e seguros.

Uma nova abordagem para tratamentos de redução de peso é inibir a digestão e a absorção de triglicerídeos (inibindo a lipase pancreática). Fitoquímicos identificados a partir de plantas medicinais tradicionais representam excelente oportunidade para o desenvolvimento de terapêuticas antiobesidade (BIRARI; BHUTANI, 2007).

As lipases são enzimas capazes de atuar sobre substratos insolúveis em água; são secretadas pelo pâncreas e responsáveis pela digestão dos triglicerídeos – a maior parte das gorduras ingeridas é quebrada através dessas enzimas. A produção

de inibidores de lipase pancreática é estudada cada vez mais para a determinação da eficácia de produtos naturais como agente antiobesidade.

O principal produto de secreção do pâncreas e das glândulas salivares é a α -amilase, enzima da família das endoamilases que é encarregada de catalisar a hidrólise inicial de amido em oligossacarídeos menores, portanto, apresenta um papel importante na dieta humana, a α -amilase faz a digestão do amido (ZHANG et al., 2013)

Desta forma, o retardo da digestão do amido através da inibição de enzimas, como a amilase desempenha um papel chave no controle da diabetes. Inibidores da α -amilase pancreática leva ao atraso da digestão de carboidratos, conseqüentemente causa uma redução na taxa de absorção de glicose e, assim, baixam-se os níveis de glicose pós-prandial no sangue (ZORZIN, 2014).

Outra enzima é a α -glucosidase, sua principal função é produzir monossacarídeos a partir de oligo ou polissacarídeos, que são utilizados como fonte de carbono e energia. No entanto, as atividades de transglicosilação do tipo exo-glicosidases, por vezes, desempenham um papel fisiológico importante na regulação de genes envolvidos na utilização de carboidratos (MURY, 2010).

Acarbose, voglibose e miglitol são os inibidores padrão em uso clínico para tratamento de diabetes tipo 2, porém essas drogas possuem efeitos colaterais como distensão abdominal, flatulência, meteorismo e diarreia. Devido a isso, esforços têm sido dirigidos para encontrar inibidores naturais e seguros de α -amilase e α -glicosidase com o mínimo de efeitos secundários.

A busca por substâncias bioativas no Brasil é destaque, tendo em vista o seu alto potencial e por possuir a maior diversidade do planeta, muitas espécies de nossa flora são utilizadas por comunidades nativas na medicina para o tratamento de febres, diabetes, ferimentos, inflamações ou infecções (SILVA et al., 2014). A importância da pesquisa se dá por favorecer o conhecimento sobre o potencial biológico do breu branco, ressaltando seus efeitos terapêuticos, de forma que seus derivados sejam mais valorizados na elaboração de possíveis medicamentos que possam tratar infecções bacterianas e/ou fúngicas e doenças metabólicas que agem sobre enzimas digestivas.

1. 2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o potencial biológico do breu comercial amazônico.

2.2 Específicos

- Investigar a capacidade de extratos do Breu branco comercial na inibição do crescimento de microrganismos patogênicos;
- Verificar possíveis atividades inibitórias dos extratos sobre enzimas digestivas.

3 METODOLOGIA

3.1 Material Vegetal

O breu branco foi comprado no mercado de Coari (Amazonas, Brasil) em janeiro de 2014, limpo, triturado em um almofariz, peneirado, identificado e armazenado no refrigerador até o início do processo de extração.

3.2. Obtenção dos extratos de Breu branco

A obtenção dos extratos brutos foi realizada por meio de dois métodos diferentes (maceração e sonicação), utilizando os solventes acetato de etila, etanol e hexano, segundo protocolo utilizado por Ferreira (2017). Todos os extratos foram obtidos utilizando 3g e 10g de material da resina do breu comercial.

3.1.1 Maceração

Os extratos foram extraídos por maceração estática a temperatura ambiente durante uma semana em uma proporção de 1:10 (v/m) de material vegetal e solvente. Ao fim desse tempo, o material vegetal foi submetido à filtração simples em filtro de papel e posterior eliminação do solvente em evaporador rotatório sob a pressão reduzida.

3.2.2 Sonicação

Os extratos foram obtidos através da solubilização da resina com o auxílio de aparelho de ultrassom durante 20 minutos a 28°C em uma proporção de 1:10 (v/m) de material vegetal e solvente. Em seguida, foram filtrados e secos nas mesmas condições descritas na metodologia anterior e após secos foram pesados em balança analítica. Ambas as metodologias foram realizadas em triplicatas para garantir a reprodutibilidade do experimento.

3.3 Determinação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana pelo Método de Difusão em ágar (CLSI, 2009), esquematizada na figura 1, foram utilizados os seguintes microrganismos-teste: *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Para avaliação da atividade dos extratos contra a *C. albicans*, ela foi cultivada meio ágar Sabouraud, a 25 °C por 48 horas, enquanto as condições das bactérias cultivadas em ágar Müeller-Hinton foram a 37 °C por 24 horas. Nesses cultivos, prepararam-se suspensões celulares de concentração semelhante à Escala de 0,5 de MacFarland. De cada suspensão, 100 µL foram retirados para semear na superfície dos meios de cultura previamente citados, em placa de Petri (10 mm x 90 mm), formando uma camada uniforme. Nesses cultivos, foram feitos poços (diâmetro de 0,8cm) onde foram adicionados extratos do breu branco (500µg) solubilizados em DMSO 10%.

As placas permaneceram incubadas a 25 °C e 37 °C por 24 e 48 horas, para fungos e bactérias, respectivamente. Como controle positivo para a levedura, foi utilizado Fluconazol, e para as bactérias usou-se Tienam, ambas a 0,005 mg. A atividade antimicrobiana foi avaliada medindo-se a área de inibição (mm) contra o microrganismo-teste.

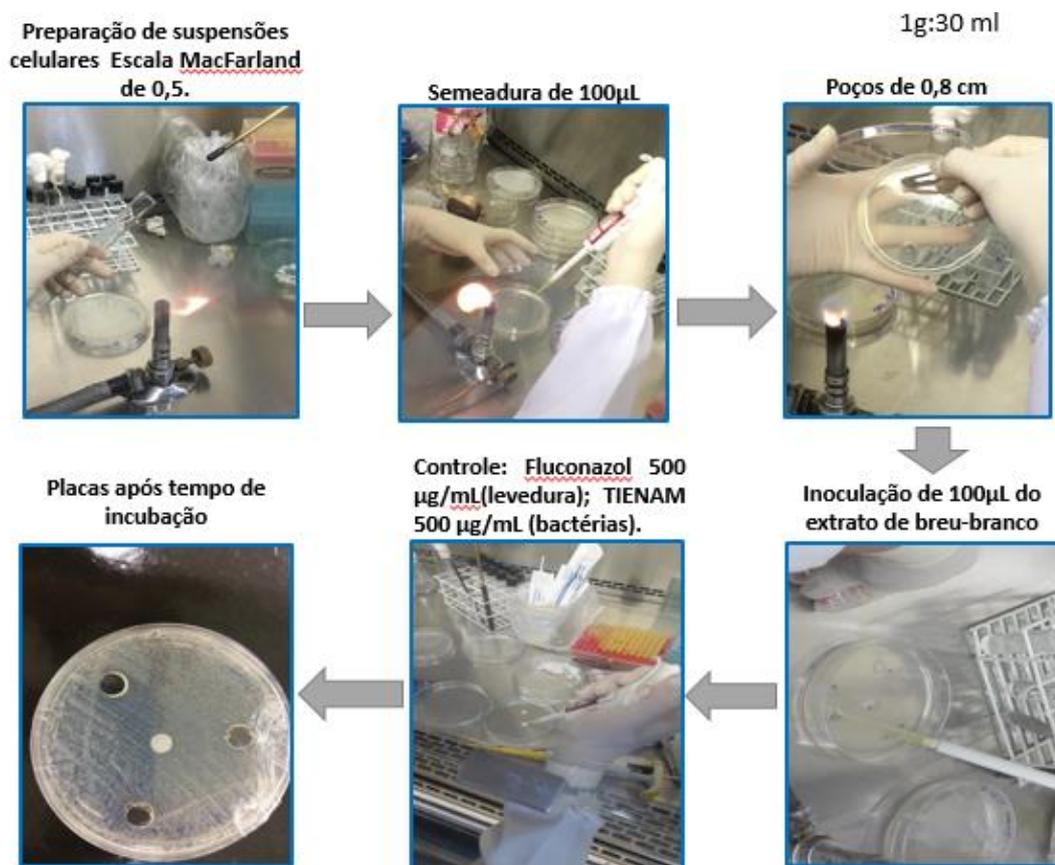


Figura 1: Esquema da metodologia de difusão em Ágar
 Fonte: Autoria própria

3.4 Determinação de atividades enzimáticas (*in vitro*)

3.4.1 Atividade inibitória α -amilase

Este procedimento foi realizado de acordo com Subramanian *et al.* (2008) com modificações. A atividade foi comparada com o padrão quercitina e com acarbose (medicamentos antidiabéticos usados para o tratamento de diabetes do tipo II).

A reação das substâncias diluída com a enzima foi feita em microplaca. Foram adicionadas 30 μ L do inibidor na concentração de 1mg, incubado por 5 min (37°C) e, em seguida, adicionados 170 μ L do substrato (Amilase CNPG Liquiform). Fez-se, então, a primeira leitura em absorvância de 405nm. Foi homogeneizado e incubado a 37 °C de 20-40 minutos, até que a absorvância do controle alcançasse 0,8-1,00 \pm 0,1. A segunda leitura foi feita após a incubação em leitor de ELISA em absorvância de 405 nm.

3.4.2 Atividade inibidora α -glucosidase

Esta atividade enzimática foi determinada de acordo com Andrade-Cetto *et al.* (2008), com ligeiras modificações, medindo a libertação de 4-nitrofenol a partir de 4-nitrofenil α -D-glucopiranosido (4-NPGP). Nesse experimento, foram utilizadas duas fontes da enzima: a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e de murinos.

Com as substâncias diluídas fez-se a reação em microplaca com a solução de enzima preparada. Em seguida, obtiveram-se os valores das absorvâncias a 405nm. Com a adição do reagente de cor, procederam-se leituras a cada 5 minutos, até o tempo de 30 minutos.

3.4.3 Atividade inibitória da lipase

A atividade inibitória contra a lipase pancreática foi medida de acordo com Slanc *et al.* (2009) com modificações usando diluente ou controle de drogas Orlistat®. A mistura de reação consiste em 50 μ L (0,1 mM de 4-MU), oleato, 20 μ L de tampão McIlvane (0,1 M de citrato-Na₂ HPO₄, pH 7,4) e 5 μ L de solução de amostra da substância. A lipase pancreática porcina (25 μ L) foi adicionada à mistura de reação e o volume final ajustado para 0,1 mL. Logo após a mistura, houve incubação a 37 °C durante 10 min.

O resultado foi medido utilizando um leitor de detecção multifluorescência a um comprimento de onda de excitação de 320 nm e um comprimento de onda de emissão de 450 nm. A substância foi diluída 5 vezes em sequência, com as seguintes concentrações (2,000 a 62,5 mg / mL), o que está esquematizado na Figura 2. As medições se efetuaram em triplicata, e o valor de IC50, a concentração da substância que resulta na inibição de 50% máxima foi determinada.



Figura 2: Esquema da diluição das enzimas

Fonte: Ferreira (2017)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade antimicrobiana

Foi realizado o teste com os extratos de breu comercial em linhagens bacterianas pertencentes à bacterioteca da Plataforma de Bioensaios Biotecnológicos (RPT11H), do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizado em Manaus - AM, Brasil.

Em princípio, o antimicrobiano se difunde através da superfície do meio de cultura contendo ágar, inibindo ou mesmo matando os microrganismos presentes na área. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (BARRY; THORNSBERRY, 1991). De acordo com a dimensão do halo, os microrganismos podem ser classificados. Neste teste, os resultados foram negativos, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de extratos de breu branco contra diferentes linhagens de *E. coli*, *Staphylococcus spp* e da levedura *Candida albicans*.

Bactérias Testadas	C+	EXET	EXACE	EXHEX
DAEC - <i>Escherichia coli</i> aderência	33± 057	-	-	-
ETEC- <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica LT	33± 057	-	-	-
ETEC- <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST	33± 057	-	-	-
EIEC- <i>Escherichia coli</i> -INV- enteroenvasora	33± 057	-	-	-
EPEC- <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica típica	33± 057	-	-	-
EAEC- <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	33± 057	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> não diarreiogênica	33± 057	-	-	-
EHEC- <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	33± 057	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	36± 057	-	-	-
<i>Staphylococcus sumulans</i>	38± 057	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> resistente a meticilina	37± 057	-	-	-
Levedura Testada	C+	EXET	EXACE	EXHEX
<i>Candida albicans</i>	33± 057	-	-	-

Fonte: Autoria própria

Nas últimas décadas, as substâncias antimicrobianas representam talvez o maior avanço da farmacoterapia, com progresso sem limites dentro da terapêutica medicamentosa (VALE, 2012). Pesquisas de tal natureza no Brasil são de grande importância pelo fato de o país ser considerado um dos maiores reservatórios de biodiversidade do mundo.

A busca por novos agentes antimicrobianos no controle da *Staphylococcus aureus* é importante, uma vez que este microrganismo se constitui como um importante patógeno devido à sua virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a várias doenças (ARDURA, 2009).

No trabalho de Galdino *et al.* (2013), o extrato de *Protium hebetatmu* a partir de folhas e galhos foram testados pelo método difusão em Ágar frente às mesmas bactérias e obtiveram-se resultados positivos com a concentração 4mg/mL.

Bastos (2016) testou extratos de *Protium klugii* a partir de galhos e cascas na concentração 5mg/mL e apresentou-se uma pequena atividade contra *S. choleraesuis* e *S. aureus*, com os halos de inibição de 15 mm. Nesse mesmo estudo, foi testado

também contra *Candida albicans*, porém não houve formação de halo de inibição frente a esses extratos.

Assim também foi realizado o teste com os extratos de breu comercial na levedura *Candida albicans* utilizando o mesmo método (difusão em Ágar). Da mesma maneira que as bactérias, os extratos na concentração 500µg mostram ser ineficientes para a inibição do crescimento do fungo como exposto na Tabela 1. Talvez a concentração dos extratos utilizados nos dois experimentos tenha sido insuficiente para formação de halos de inibição para os microrganismos como já citado nos trabalhos de Bastos e Galdino.

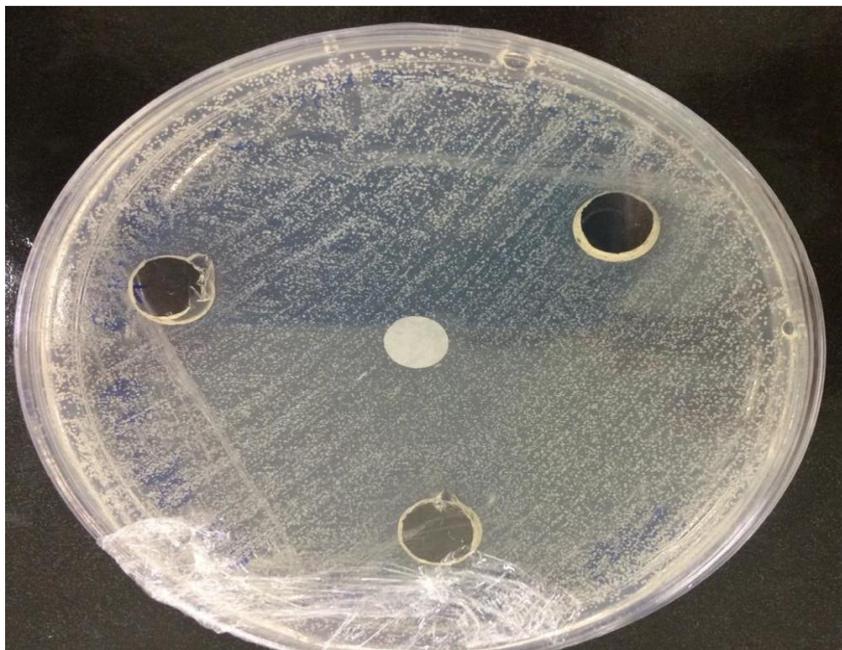


Figura 3: Atividade antifúngica após 48h

Fonte: Autoria própria

A busca por novas opções anti-*Candida* se deve ao de fato de estas leveduras estarem envolvidas em quadros clínicos graves e até fatais em humanos e animais, além da resistência aos antifúngicos disponíveis (BRITO et al., 2009).

A candidíase sistêmica tem sido apontada como um problema de saúde pública no Brasil e no mundo (CDC, 2013). A taxa de candidemia causada por *C. albicans* varia de 37% na América Latina a 70% nos países nórdicos.

No trabalho de Bandeira (2006), mostrou-se que o óleo essencial de *Protium heptaphyllum* foi efetivo contra o fungo *Cândida albicans* com CMI de 1,25 µg/mL e a bactéria *Staphylococcus aureus* com CMI de 2,5 µg/mL.

4.2 Atividade inibitória enzimática

Os testes realizados proporcionaram a determinação da atividade inibitória dos extratos frente a três enzimas que são importantes em processos metabólicos e patológicos. Foram determinados os ensaios inibitórios da lipase, α -amilase e α -glucosidase *in vitro*.

Dentro das frações obtidas do breu branco, tanto por maceração como por sonicação, podemos observar que não apresentaram atividade inibitória significativa para as enzimas digestivas amilase e lipase. Mas, no caso da enzima α -glucosidase, podemos observar que todas as frações mostram ação inibitória por mecanismo redutor e não por competição enzimática, já que a enzima α -glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* hidrolisa as terminações não reduzidas do substrato, sendo esse o motivo para o padrão usado para esta enzima ser o flavonoide quercetina e não o Acarbose.

Tabela 3: Tabela de resultados de atividade inibitória das enzimas; Breu Branco Maceração Hexano (BBMH); Breu Branco Maceração Acetato (BBMA); Breu Branco Maceração Etanol (BBME); Breu Branco Sonicação Hexano (BBSH); Breu Branco Sonicação Acetato. (BBAS); Breu Branco Sonicação Etanol (BBSE)

amostras	α -glucosidase <i>Saccharomyces cerevisiae</i>				α -glucosidase Murino		lipase		amilase	
	% inibição		IC ₅₀ µg/ml		% inibição		% inibição		% inibição	
	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP	Media	DP
BBMH	68,22	0,18	8,03	0,32	2,15	0,99	30,48	1,76	1	0,1
BBMA	61,46	1,5	5,53	0,006	0,02	0,86	1,44	0,11	0,71	0,32
BBME	70,49	0,68	10,37	0,45	6,9	0,69	0,11	0,07	0,49	0,64
BBSH	65,36	1,4	4,9	0,79	2,01	0,1	13,23	0,45	5,59	0,8
BBAS	79,23	2,09	7,68	0,51	0,46	0,93	0,64	0,47	0,75	0,2
BBSE	73,23	2,09	5,12	0,02	0,35	0,16	0,87	0,07	0,1	0,8
Quercetina	99,27	2,803	14,82	1,26						
Acarbose					69,27	1,74			50,3	0,22
Orlistate							93,24	1,15		

Fonte: Autoria própria

Neste estudo, o encaminhamento do uso dessas enzimas se baseou nas demonstrações de que tais proteínas são o foco terapêutico de medicamentos com efeito inibidor ou de novos fármacos que possam controlar o metabolismo digestivo de carboidratos e lipídios para serem futuramente utilizados para tratamentos de diabetes e obesidade.

No trabalho de Souza (2012), foram testados extratos metanoicos de 19 espécies de diferentes famílias de vegetais, entre elas Fabaceae, Rubiaceae, Boraginaceae e outras. Das 19 avaliadas, 8 inibiram atividade da lipase pancreática, mostrando assim que espécies vegetais frente ao solvente metanol podem revelar uma boa fonte de inibidores de lipase extraídos de produtos naturais.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que os extratos de breu não possuem princípios ativos com ação antimicrobiana na concentração de 500 ug/mL para esses microrganismos. Sugere-se que outras concentrações possam ser testadas, uma vez que o gênero é rico em terpenoides.

As frações obtidas do breu branco não apresentaram atividade inibitória significativa para as enzimas digestivas amilase e lípase; contudo, para α -glicosidase de origem de *Saccharomyces cerevisiae*, as frações mostram ação inibitória satisfatória, quando a mesma enzima de origem animal não se mostrou eficaz.

Assim, a pesquisa mostrou relevância ao possibilitar o conhecimento de prováveis efeitos biológicos dos extratos do breu e a necessidade da continuidade das pesquisas, visto que só foi possível nesse estudo testar uma concentração para os microrganismos testados. Sugere-se que outros estudos possam ser realizados em busca de potenciais bioativos oriundos do breu branco.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. 1998; v. 21 Suppl 1: S5
- ANDRADE-CETTO, A; BECERRA-JIMÉNEZ, J.; CÁRDENAS-VÁZQUEZ, R,. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 116, p. 27-32, 2008.
- BAPTISTA, M.A. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. Lisboa, 2013. 42p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.
- BARRY A.L; THORNSBERRY C. 1991. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, WJ.; HERMANN, KL.; ISENBERG, HD.; SHAMODY, HJ. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125, 1991.
- BASTOS, I. S. **Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e antimalárico de extratos, frações e composto obtidos de plantas da região amazônica**. Manaus, 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia). Universidade Federal do Amazonas, 2016.
- BIRARI, R.B.; BHUTANI, K.K. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. **Drug Discovery Today**, v.12, n.19/20, p.879-89, 2007.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States**, 2013. Atlanta (GA): CDC, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test**; Approved Standand-Tenth Edition. Wayne, CLSI document. M02-A10, 2009.
- CONRADO, G.G. **Estudo da atividade antimicrobiana de *Protium hebetatum* D.C. Daly por fracionamento fitoquímico biomonitorado**. Manaus, 87p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2014.
- CONRADO, G.G.; GUILHON SIMPLICIO, F.; Regina Carim da Costa, K; Barbosa Sampaio, P.T. Ação de extratos orgânicos de *Protium hebetatum* d. c. daly contra micro-organismos de interesse médico. CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 53, **Anais....** Rio de Janeiro, 2013.
- COSTA, C; TEIXEIRA, M.C. Multirresistência em infecções provocadas por leveduras do gênero *Candida*: o papel de proteínas que caracterizam o efluxo de fármacos. **Magazine da Sociedade Portuguesa de Microbiologia**, 2015.

CROTY, M.F.C. **indicações e contra-indicações e complicações no uso de clindamicinana prevenção de infecção sediada no sistema estomatognatico em pacientes alérgicos a penicilina: revisão de literatura.** São Paulo, 2012. Monografia (Especialização em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo facial). Faculdade de Odontologia de São Paulo, 2012.

DUARTE, M. C. T. atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multi ciência**, 2006.

FERREIRA, R. G. **Obtenção da mistura triterpenica de α - β -amirenonae avaliação de seus efeitos hipolipemiantes, hipoglicemiante e antiobesidade.** Manaus, 2017. 111p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2017.

MARQUES, D.D. **contribuição ao conhecimento químico da flora acreana: *Protium hebetatum* Daly, *Protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *Ulei* (swat) Daly e *protium heptaphyllum* (Aublet) Marchand subsp. *Heptaphyllum*.** Fortaleza, 2010. 222p. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

MORAIS, A. S. influências dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura brasileira**. v. 27, n. 2, 2009.

MURY, F. B. **Alfa-glucosidase e seu papel na formação de hemozoína em *Rhodnius prolixus*.** Rio de janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia). Universidade Estadual do Norte Fluminense. Rio de Janeiro, 2010.

OLIVEIRA, A.C; SILVA, S.S. Desafios do cuidar em saúde frente a resistência bacteriana: uma revisão. **Revista eletrônica de enfermagem** V.10, n.1, p. 189-197, 2008.

PEREIRA, A.L; PITA, J.R. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1928) ao prêmio Nobel (1945). **Revista da Faculdade de Letras**. v.6 p. 129-151, 2005.

SÁEZ-LLORENS, X. et al. Impact of an antibiotic restriction policy on hospital expenditures and bacterial susceptibilities: a lesson from a pediatric institution in a developing country. **Pediatr Infect Dis J**. v. 19, p. 200-206. 2000.

SILVA, F.C; DUARTE, L. P; VIEIRA FILHO, S.A. Celastráceas: fontes de triterpenos pentacíclicos com potencial atividade biológica. **Revista virtual de Química**, v.6, n.5, p. 1205-1220, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e acompanhamento da Diabeteis Millitus. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD).** Rio de Janeiro, 2007.

SUBRAMANIAM, R.; ASMAWI, M.Z.; SADIKUN, A. 2008. In vitro α -glucosidase and α -amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, 55,02, 391-398.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

VIZZOTTO, M; KROLOW A.C; WEBER, G.E.B. Metabólitos secundários encontrados em plantas. **Embrapa clima temperado**. n. 316, p. 16, 2010.

ZARDO V, MEZZARI A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsIav**, n. 63, p. 136-146, 2004.

ZHANG J, CUI J-H, Yin T, SUN L, Li G. Activated effect of lignin on α -amylase. **Food Chemistry**.n.141, v. 3, p.:2229-2237, 2013.

ZORZIN, F. M. **Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de *Eugenia dysenterica***. Brasília, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, 2014.