

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA COM EXTRATOS DE SEMENTES DE MAMONA (*Ricinus communis L.*)

Alcinéia Oliveira Damião¹
Aldinéia Oliveira Damião²
Tâmara São Paulo Vidal³
Juan C. Rossi-Alva⁴
Luzimar G. Fernandez⁵

Resumo: A mamona (*Ricinus communis L.*) é uma planta oleaginosa, destacando-se por sua relevante importância econômica e social com inúmeras aplicações industriais. Este trabalho teve como objetivo avaliar o poder antimicrobiano dos extratos de sementes de Mamona (*Ricinus communis*) nas cepas *S. aureus* (ATCC 6835), *M. luteus* (ATCC9341), *E. coli* (ATCC 10536), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *S. cholerae-suis* (ATCC 10708) e *K. pneumoniae*. Foram coletadas sementes e folhas de mamona de cultivares (Sipeal 28 R1 e BRS 188 Paraguaçu R1) do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas. Estas foram utilizadas para a preparação dos extratos hidro-alcóolico através do método de maceração com etanol 70%. Os testes foram realizados através do método de difusão em disco, onde foi feito em triplicata, utilizando três concentrações diferentes, 1, 2 e 3, utilizando 20, 30 e 60 mg dos extratos por discos, respectivamente. Os extratos hidro-alcóolicos das folhas e das sementes de mamona das duas cultivares não inibiu “in vitro” o crescimento bacteriano das cepas utilizadas.

Palavras-chave: Mamona; Extratos vegetais; Microrganismos

INTRODUÇÃO

As plantas têm sido uma fonte valiosa de produtos para manutenção da saúde humana, sendo mais difundida especialmente nos últimos anos, após numerosos estudos com produtos terapêuticos de plantas medicinais (SANTOS, et al., 2007).

A mamona (*Ricinus communis L.*) pertence à família Euphorbiaceae, é uma planta oleaginosa, destacando-se por sua relevante importância econômica e social com inúmeras aplicações industriais (CASTRO, et al 2006). A cultura da mamona é uma alternativa para produção de biocombustível, não tóxico, biodegradável. Seu uso promove redução da emissão de gases tóxicos no escapamento dos veículos além da redução de gases que contribuem para o efeito estufa, pode ser um potencial no resgate econômico e social das famílias rurais (RIZZO, 2005 *apud* CUCHIARA, 2006). Das sementes é extraído o óleo fixo que tem diversas utilidades nas indústrias de uma maneira geral (CASTRO et al., 2006).

O óleo de rícínio contém 90% de ácido graxo ricinoléico (SAVY, 2005), não muda as suas características em altas, baixas ou em variações bruscas de temperatura, é possuidor de

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas e estagiária do LEMA - UCSAL

² Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas e estagiária do LEMA - UCSAL

³ Licenciada em Ciências Biológicas - UCSAL – Pesquisadora Associada LEMA/UCSAL

⁴ Dr. em Bioquímica-UFRJ – Mestrado Profissional em Planejamento Ambiental e LEMA - UCSAL

⁵ Dr^a em Biologia Molecular Estrutural - UPC/Espanha (LEMA/UCSAL e ICS/UFBA)

estrutura química altamente reativa (Amaral, 2002), o principal emprego é na lubrificação de motores de alta rotação, como é o caso dos motores de aviões. É usado, também, como purgativo, na fabricação de tinta, verniz e plástico, enquanto a torta, subproduto da extração do óleo, é usada com adubo (SCAVONE & PANIZZA, 1980 *apud* OLIVEIRA, 2002). Este adubo orgânico é eficiente na recuperação de terras esgotadas (PLUMMER, 2000). A torta de mamona possui também efeito nematicida (SAVY, 2005).

Apesar da alta toxicidade das sementes de mamona, o óleo de rícínio não é tóxico, visto que a ricina, proteína tóxica da semente, não é solúvel em lipídios, ficando todo componente tóxico restrito a torta (GAILLARD & PEPIN, 1999 *apud* OLIVEIRA, 2002). A torta é obtida após a extração do óleo, possuindo alta taxa de proteína bruta e um elevado teor tóxico, sendo utilizada como fertilizante, fungicidas e biocontrolador de fitonematóides (Sasser, 1989).

O teor de ricina encontrado na semente é em torno de 0,2% (SCHVARTSMAN, 1979 *apud* FERNANDES *et al*, 2002), e sua ação se dá através da ligação de uma das cadeias polipeptídicas à membrana das células da mucosa intestinal, permitindo a entrada de outra cadeia, inibindo a síntese protéica nos ribossomos, causando a morte celular (LAMPE, 1986 *apud* FERNANDES *et al*, 2002).

As sementes desta planta são extremamente atrativas para crianças, levando-as a ingerir quantidades consideráveis destas sementes. Os sintomas da intoxicação aparecem depois de algumas horas, ou até mesmo dias após a ingestão. Neste intervalo de tempo, nota-se a perda do apetite, o aparecimento de náuseas, vômitos e diarreia. Subsequentemente, estes sintomas se agravam. Os vômitos tornam-se persistentes e a diarreia passa a ser sanguinolenta. Não existem antídotos para a intoxicação com ricina. O tratamento é sintomático, devendo sempre ser iniciado com lavagem gástrica e com a administração de carvão ativado ou de outros adsorventes (ELLENHORN & BARCELOUX, 1988 *apud* OLIVEIRA, 2002).

Este trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de folhas e sementes de mamona (*Ricinus communis*) através do método de difusão de disco, nas cepas *S. aureus* (ATCC 6835), *M. luteus* (ATCC 9341), *E. coli* (ATCC 10536), *P. aeruginosa* (ATCC 15442), *S. cholerae-suis* (ATCC 10708) e *K. pneumoniae*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Estudos em Meio Ambiente (LEMA) da Universidade Católica do Salvador (UCSal), que apresentou toda a infra-estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho. Os meios de culturas utilizados foram TSA (Tryptic Soy Agar) (Merck) para o crescimento e manutenção das bactérias, e meio Agar Muller Hinton para os testes de avaliação de sensibilidade pelo método de difusão em disco. Os solventes utilizados foram etanol a 70%, para preparo dos extratos vegetais, e dimetilsulfóxido (DMSO), para ressuspensão do extrato e realização do teste de atividade antimicrobiana. As suspensões bacterianas foram diluídas em solução salina estéril e padronizadas pela turbidez conforme a escala 0,5 de MacFarland. Por fim, foi utilizado disco de papel filtro (Whatman – tipo 3) para o teste de difusão e a unidade filtrante estéril (poro de 0,22 µm) para esterilizar os extratos, o DMSO e os antibióticos. (SANTOS, et al., 2007)

Material Vegetal

Foram coletadas sementes e folhas de mamona (*Ricinus communis L.*) no Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, em Cruz das Almas, situado na região fisiográfica do Recôncavo Baiano, apresentando as coordenadas geográficas de 12° 40' 19" latitude sul, 39° 06' 23" de longitude oeste de Greenwich e altitude média de 220m. A temperatura média anual é de 24,1°C e o balanço hídrico apresenta evapotranspiração potencial de 1.267mm anuais, havendo excedente hídrico apenas durante os meses de junho, julho e agosto. O solo foi classificado como Latossolo Amarelo Álico Coeso, de textura argilosa e relevo plano (RIBEIRO et al., 1995). Utilizou-se neste experimento as cultivares: Sipeal 28 R1 e BRS 188 Paraguaçu R1.

Microrganismo

Seis cepas bacterianas foram usadas nos ensaios de sensibilidade: *Staphylococcus aureus* ATCC 6835, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella cholerae-suis* ATCC 10708 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

As cepas ATCC foram semeadas na superfície do meio TSA contidas em placas de Petri e incubadas na estufa de crescimento bacteriano, a 37°C por 18h. Em seguida, foi pipetado 0,5 mL do meio TSB com glicerol a 15% (autoclavado) em tubos de criopreservação com tampa de rosca e adicionadas colônias das respectivas cepas, cinco tubos por cepa. Os tubos foram identificados, agitados, colocados em caixas apropriadas e armazenados no freezer -80°C.

Para a realização dos testes, as cepas ATCC foram reativadas, retirando-se um tubo de cada cepa e descongelando gradativamente através da seguinte seqüência: -80°C, -20°C e 4°C. Após essa etapa, uma alçada da amostra foi semeada em placas com o meio TSA e incubadas a 37°C por 18h (1ª repique). Os ensaios foram realizados com segundo repique, seguindo o mesmo procedimento citado acima. As placas do primeiro repique foram mantidas na geladeira a 4°C durante um mês.

Preparo dos extratos

O material vegetal coletado foi rapidamente lavado com água destilada e posteriormente secado a uma temperatura 30°C por cinco dias (SOUZA; BARBOSA; VIEIRA, 2004). Em seguida, as estruturas vegetais (folha e semente) das espécimes em estudo foram secas na estufa a 40°C, por uma semana. As folhas foram trituradas por três minutos em liquidificador (ARNO Plus - AutoClean) para atingir uma granulometria uniforme, com exceção das sementes, que foi adicionado nitrogênio líquido para facilitar a trituração (RODRIGUES et al., 2003, modificado).

Para preparação do extrato bruto, o material foi submetido à maceração com etanol a 70% (v/v), realizada por duas vezes, com um tempo de armazenamento de dois dias, à temperatura ambiente e mantida ao abrigo da luz. (MATOS, 1988; SOUZA; BARBOSA; VIEIRA, 2004 apud SANTOS, et al., 2007).

Ao final deste processo, os extratos foram filtrados em papel filtro qualitativo (Quanty – JP42) com o auxílio da Bomba de Vácuo (Marconi – MA 057/1) (Figura 01). O solvente foi evaporado primeiro utilizando o roto-evaporador e posteriormente por liofilização (Labconco – Freezone 4.5) (Figura 02) para eliminação total do solvente. Os extratos foram armazenados em frasco âmbar e conservados no dessecador até o preparo das soluções em diferentes concentrações (WILLIAMSON; OKPAKO; EVANS, 1996). Ao preparar as concentrações foram utilizados discos de papel filtro (Whatman – tipo 3) com 6,0 mm de diâmetro para a realização do teste de triagem. Os discos foram colocados em placas de Petri e autoclavados por

15 minutos a 121°C. Após a esterilização, as placas foram incubadas na estufa a 100°C por 20 minutos (SANTOS, et al., 2007).



Figura 01: Preparo do extrato. Filtração do extrato da semente de mamona *Ricinus communis* - BRS 188 Paraguaçu R1.

Os discos foram transferidos para outras placas de Petri estéreis identificadas quanto a cultivar, parte vegetal e as respectivas concentrações. Em seguida, os discos foram impregnados com alíquotas do extrato utilizando 20, 30 e 60 mg dos extratos para 10 mL de DMSO para as concentrações 1, 2 e 3 respectivamente. No teste foram pipetados 10µL do extrato nos discos, sendo que no controle negativo foi adicionado 10µL de DMSO, que tem ação permeante de membranas celulares e baixa toxicidade (RIBEIRO; CARVALHO FILHO; LISTONI, 2001), e no controle positivo foram utilizados os antibióticos Eritromicina (15 mcg/disco) para as cepas de *S. aureus*, *M. luteus* e *E. coli* e Ciprofloxacina (5 mcg/disco) para as cepas de *P. aeruginosa*, *S. cholerae-suis* e *K. pneumoniae* (SANTOS et al., 2007).



Figura 02: Processo de liofilização do extrato da semente de mamona *Ricinus communis*.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana, o ensaio antimicrobiano foi realizado em triplicata através do método de difusão em disco (BAUER et al., 1966). O inóculo foi preparado por suspensão direta em solução salina, de colônia isolada e selecionada numa placa de TSA de 18-24 horas de crescimento dos microrganismos. A suspensão foi ajustada através da escala 0,5 de McFarland. Em seguida, foi mergulhado um swab de algodão estéril na suspensão ajustada e inoculada esfregando o swab na superfície da placa de MHA, por três vezes, girando a placa aproximadamente 60° em cada semeadura, visando assegurar a distribuição uniforme do inóculo (SANTOS, et al., 2007).

Um conjunto predeterminado de discos de extrato vegetal foi colocado na superfície de uma placa de ágar semeada (após 15 minutos da semeadura) e levemente pressionado, de maneira a assegurar contato completo com a superfície do ágar. As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 35° C por 18h. Após o período de incubação, foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição total de crescimento bacteriano, incluindo o diâmetro do disco. O halo foi medido em milímetro com auxílio de um halómetro (NCCLS, 2003 apud SANTOS, et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Diante do procedimento realizado, foi observado que os extratos de semente e folha de mamona não apresentam atividade antimicrobiana *in vitro*, uma vez que estes não conseguiram inibir o crescimento das cepas bacterianas utilizadas (Figura 03).

Logo, foi possível mostrar que os princípios ativos presentes no extrato etanólico de sementes e de folhas da mamona não apresentaram potencial antimicrobiano, sendo plausível realizar outros testes antimicrobianos em fungos e leveduras, pois, segundo Ribeiro e colaboradores (1999), o extrato aquoso de mamona apresenta propriedades fungitóxicas, sendo eficiente em reduzir a produção de esporos do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*.

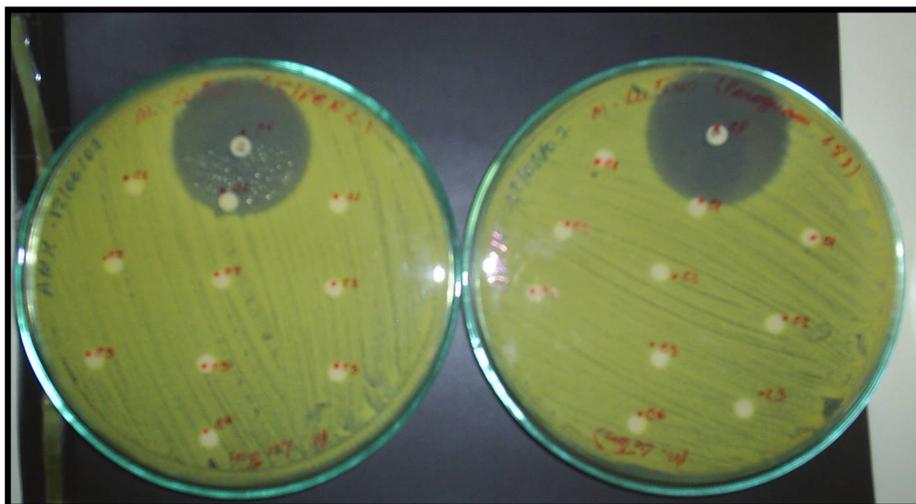


Figura 03. Placa de Ágar Muller Hinton semeadas com *M. luteus* (ATCC 9341), utilizando discos impregnados com extratos da semente de mamona - Sipeal 28 R1 e BRS 188 Paraguaçu R1.

REFERÊNCIAS

AMARAL, J. G. C. do; Mamona AL Guarany 2002. São Paulo. Acesso em:
http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/producao_agricola/mamona/2002.

CASTRO, R. A.; MENDES-COSTA, M. C.; CASTRO, A. H. F.; CASTRO, P. N.; FRAGA, A. C.; GUIMARÃES, I.; NEVES, N. G.. Atividade fungitóxica do óleo fixo e de extratos de mamona em *Colletotrichum lindemuthianum*. Rede Bahia de biocombustíveis. Artigos - 2º Congresso de Mamona- 15 a 18 de agosto de 2006 - Aracaju/SE. Acesso em: www.rbb.ba.gov.br/index.php?row=4&menu=biblioteca.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. de S.; KIRINUS, G. de P.; SILVA, S. D. dos A.; BOBROWSKI, V. L.. Atividade Alelopática De Mamona (*Ricinus communis* L.) Em Aquênios De Alfaca. XV Congresso de Iniciação Científica. VIII ENPOS (Encontro de Pós-Graduação), 2006 Acesso em: www.ufpel.tche.br.

FERNANDES, W.R.; BACCARIN, R. Y. A.; MICHIMA, L. E. S. Intoxicação em equino por *Ricinus communis*: relato de caso. Rev. Bas. Saúde Prod. An.3 (1): 26-31, 2002. Publicação Online da EMV – UFBA. Acesso em: www.rbspa.ufba.br/include/getdoc.

PLUMMER, A.L.; KRAK, S.J.; BOIARSKI, A.A. Tudo sobre a mamona- Produtos e co-produtos de mamona (Torta de mamona), Novembro/2000. Acesso em: www.biodieselbr.com/plantas/mamona

RIBEIRO, F. L.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* – Agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. Scientia Agrícola, v.56, n.4, p. 1267-1271, out./dez. 1999, Piracicaba.

SANTOS, S.C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L. G.. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de Abarema cochliocarpos (Gomes) Barneby & Grimes. Revista Brasileira de Farmacognosia, Abr. /Jun .2007.

SASSER, J.N. Plant parasitic nematodes: the Farmers' Hidden Enemy. Raleigh: University Graphics, 1989, 115p.

SAVY, A. F.; Cultura Da Mamoneira; Centro de Grãos e Fibras/Oleaginosas -Instituto Agrônômico – IAC, 2005.Acesso em : www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/Mamona.