

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE MORINGA CONTRA BACTÉRIAS ISOLADAS EM FONTES DE ÁGUAS CONTAMINADAS

Vanuze Costa de Oliveira¹, Shirleyde Alves dos Santos², Thúlio Antunes de Arruda³, Luciana dos Santos Almeida⁴

¹Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Departamento de Ciência do Solo, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil, vanuze.costa@gmail.com. ²Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) - Departamento de Agroecologia e Agropecuária, 58117-000, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil, shirleyde.santos@gmail.com. ³Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) - Departamento de Farmácia, 58100-000, Campina Grande, Paraíba, Brasil, thulioantunes@gmail.com. ⁴Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) - Departamento de Agroecologia e Agropecuária, 58117-000, Lagoa Seca, Paraíba, Brasil, annalmeida.s@gmail.com.

A água é essencial à vida na Terra, no entanto, problemas relacionados à sua poluição estão sendo cada dia mais comuns. Alternativas ao combate à poluição hídrica tem despertado o interesse de pesquisadores; dentre as alternativas está o uso de plantas para a purificação da água, como o uso de sementes de moringa, que é uma planta que vem sendo utilizada como agente clarificante da água. Objetivou-se verificar a atividade antimicrobiana de extratos de sementes de moringa contra bactérias isoladas de amostras de água de fontes contaminadas em uma comunidade rural no município de Lagoa Seca - PB. Foram utilizados como solventes para a semente moída o álcool etílico absoluto P.A. e o álcool etílico hidratado - 50% de água. As amostras de água de fontes potencialmente contaminadas foram analisadas e amostras de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* foram isoladas. Todas as amostras testadas se mostraram resistentes aos extratos de *Moringa oleifera*.

Palavras-chave: água para consumo humano, saúde pública, tratamento de água, *Moringa oleifera*.

Antimicrobial activity of seeds moringa extracts against bacteria isolated in contaminated waters sources. The water is essential to the life in the Earth, however, problems related their pollutions are more commons. Alternatives to combat of pollution of water has aroused the interest of researchers. Among such alternatives is the use of plants for water purification, as the use of moringa seeds, which is a plant that has been used as clarifying agent of water. If aimed to evaluate the antimicrobial activity of moringa seed extracts against bacteria isolated sampled of sources of water contaminated in a rural community in the municipality of Lagoa Seca -PB. Was used the ethyl alcohol hydrated solvent - 50 % water. The water samples of sources potentially contaminated were analyzed and samples of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* were isolated. All samples tested were resistant to the extracts of *Moringa oleifera*.

Key words: drinking water, public health, water treatment, *Moringa oleifera*.

Introdução

A água é essencial para a existência e bem-estar do ser humano, devendo ser disponível em quantidade suficiente e de boa qualidade como garantia da manutenção da vida. Apesar de ser de conhecimento da maior parte da população mundial que a água é fundamental para a existência da vida na Terra, existe ainda um problema grave que tem comprometido a qualidade desse bem natural, que é a sua poluição.

As causas da poluição das águas são cada vez mais evidentes devido ao alto grau de urbanização aliada à falta de ações de saneamento básico, desenvolvimento da indústria e o aumento da produção agrícola (Nápoles et al., 2010).

Devido ao aumento da necessidade hídrica na zona rural, os moradores de muitas das referidas comunidades sentem-se “obrigados” a consumirem água que muitas vezes não está adequada para o consumo humano, o que os torna alvo de doenças ocasionadas por microrganismos, especialmente porque a água consumida na maior parte das vezes não recebe o tratamento adequado (Vieira et al., 2015).

As populações mais afetadas são as de países em desenvolvimento, principalmente pessoas que moram em áreas peri urbanas ou população rural. As doenças de veiculação hídrica apresentam um risco de ocorrência alto no meio rural, em função da possibilidade de contaminação bacteriana de águas (Amaral et al., 2006).

Neste sentido, pesquisas tem sido realizadas com o intuito de buscar alternativas que minimizem os problemas relacionados à poluição da água para consumo. Como exemplo destas alternativas, poder-se-ia citar o uso de extratos de partes de plantas para a purificação da água.

Dentre as espécies vegetais, a *Moringa oleifera* Lam é uma planta cujas sementes vêm sendo utilizadas como agente clarificante no tratamento de água em substituição aos sais de alumínio (Gallão et al., 2006). A clarificação de águas é justificada pela presença de aminoácidos com forte capacidade de aglutinação que atuam como floculantes, o que possibilita eliminar a turbidez, micropartículas, fungos, bactérias e vírus (Pozzobon & Kempka, 2015).

Assim sendo, estas sementes contêm proteínas com baixo peso molecular e, quando seu pó é dissolvido em água, se obtêm carga positivas que atraem as partículas

negativas das argilas e siltes, formando partículas densas que se sedimentam, removendo assim a turbidez da água (Amagloh & Benang, 2009).

Neste contexto, objetivou-se verificar a atividade antimicrobiana de extratos de sementes de *M. oleifera* Lam contra bactérias isoladas de amostras de água de fontes contaminadas em uma comunidade rural no município de Lagoa Seca - PB.

Material e Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos pertencente ao Centro de Ciências Agrárias e Ambientais da Universidade Estadual da Paraíba, localizado no zona rural do Município de Lagoa Seca - PB, cujas coordenadas geográficas são: latitude 07° 10' 15" S, longitude 35° 51' 13" W e altitude de 634 m, conforme Nóbrega e Suassuna (2004).

Foram utilizadas sementes de moringa, coletadas de plantas cultivadas em duas comunidades da zona rural do mesmo município. Para a obtenção do extrato, foram utilizados como solventes o álcool etílico absoluto P.A. e o álcool etílico hidratado - 50 % de água, devido a sua baixa toxicidade (não inibindo o bioensaio), bom desempenho no processo extrativo e boa viabilidade econômica. Os extratos etanólicos e hidroetanólicos foram obtidos segundo a Farmacopéia Brasileira (1959).

Para avaliação da eficiência do extrato de sementes de moringa, foram coletadas 8 amostras, de 100 mL cada, das fontes (filtros e torneiras) em frascos de 250 mL, de cor âmbar, com tampa rosqueável, previamente autoclavados a 121 °C/ 30 minutos), em duas Instituições de Educação Infantil (uma creche em que a faixa etária dos estudantes é de 3 a 5 anos de idade e uma escola do ensino fundamental I, em que a faixa etária é de 6 a 10 anos), localizadas na zona rural do município de Lagoa Seca-PB.

Foram adicionados aos frascos de coleta, antes da esterilização, 0,1 mL de uma solução de 1,8 % de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Este procedimento foi necessário nas amostras das água clorada, para neutralizar o cloro residual e impedir o seu efeito bactericida sobre a microbiota presente (Silva et al., 2006).

As amostras foram levadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências

Agrárias e Ambientais, da Universidade Estadual da Paraíba Campus II, e analisadas pela Técnica dos Tubos Múltiplos, utilizando os meios de fermentação da lactose, para detecção de Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *Escherichia coli*.

A técnica dos tubos múltiplos é um método de análise quantitativo que permite determinar o Número Mais Provável (NMP) dos microrganismos alvo na amostra. A combinação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra (Silva et al., 2006).

As amostras foram homogeneizadas por agitação, invertendo os frascos 25 vezes em ângulo de 45°, em seguida foram diluídas em água destilada estéril em diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Estas diluições são recomendadas para amostras com contagem estimada de coliformes na faixa de 3 a 1000 mL⁻¹.

Após a diluição, as amostras foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de Caldo Lactosado, em concentração dupla, e tubos de Durham. Foram utilizados cinco tubos para cada diluição. Os tubos foram incubados a 35±0,5 °C/24±2 h, onde foi observada a produção de gás. Em caso negativo, os tubos foram reincubados até completar 48±2 h, para repetir a leitura.

A não produção de gás após 48 h de incubação indica ausência de Coliformes (totais, termotolerantes ou *E. coli*) nos 100 mL da amostra. Para a confirmação de Coliformes Totais, foi transferida uma alçada da cultura para tubos contendo 10 mL de Caldo Verde Brilhante Bile e tubos de Durham. Os tubos foram incubados a 35±0,5 °C durante 24±2 h, onde foi observada a produção de gás. Em caso negativo, os tubos foram reincubados até completar 48±2 h, para repetir a leitura.

O número de tubos positivos foi anotado para determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais por 100 mL. A não produção de gás após 48 h de incubação indica ausência de coliformes totais nos 100 mL da amostra.

Para a confirmação de Coliformes Termotolerantes, a partir de cada tubo positivo de Caldo Lactosado, foi transferida uma alçada da cultura para tubos contendo 10 mL de Caldo *E. coli* (EC) e tubos de Durham. Os tubos foram incubados a 44,5±0,2°C pelo período de 24±2 h, onde foi observada a produção de gás. Em caso negativo, os tubos foram reincubados até completar 48±2 h, para repetir a leitura.

O número de tubos positivos foi anotado para determinar o Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes por 100 mL. A não produção de gás após 48 h de incubação indica ausência de coliformes termotolerantes nos 100 mL da amostra.

Confirmação de *E. coli* em placa: a partir de cada tubo positivo de Caldo EC, foi estriada uma alçada da cultura em placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB). As placas foram incubadas a 35±0,5 °C durante 24±2 h, onde foi observado o desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli* (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico).

Foram testadas *E. coli* isoladas das amostras de água coletadas, *E. coli* e *Enterococcus faecalis* obtidos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPB.

Para os ensaios foram utilizados os meios Caldo Nutriente e Agar Mueller-Hinton, preparados conforme as instruções do fabricante, seguindo a distribuição de 20 mL dos mesmos em placas de Petri de 90x15 mm de diâmetro.

Durante a realização do ensaio, as cepas bacterianas foram mantidas em meio Agar Mueller-Hinton, repicadas para caldo Nutriente e incubadas a 37 °C por 24 h. Após este período, foi realizado o semeio pela técnica de estrias (para obtenção de colônias isoladas) em placas de Agar Mueller-Hinton, que também foram incubadas a 37 °C pelo período de 24 h.

Para a obtenção do inóculo foram selecionadas de três a cinco colônias semelhantes as quais foram transferidas para 5,0 mL de água destilada autoclavada de modo a produzir uma leve turvação, de densidade visualmente equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, obtendo-se um inóculo de concentração aproximada de 106 UFC mL⁻¹.

Essa suspensão foi semeada no tempo máximo de 15 a 20 minutos após sua preparação, conforme metodologia proposta por Cleeland & Squires (1991) e NCCLS (2002).

Para a realização dos ensaios de atividade antimicrobiana - screening foi usado o método de difusão em meio sólido, processo cavidade-placa conforme os protocolos de Cleeland & Squires (1991) e NCCLS (2002).

Para realização do teste de difusão, foram utilizadas placas de Petri (90x15 mm) autoclavadas, contendo 20 mL do meio de cultura Agar Mueller-Hinton. As placas foram inoculadas pela técnica de espalhamento

em superfície (NCCLS, 2002), com auxílio de "swabs" estéreis mergulhados na suspensão contendo o inóculo, eliminando-se o excesso de líquido por pressão nas paredes do tubo. O inóculo foi semeado em toda a superfície do meio, de modo a se obter um crescimento uniforme e semi-confluyente.

As placas foram colocadas para secar, durante 3 a 5 minutos, antes de se fazer as cavidades de 6 mm cada, com o auxílio de perfuradores descartáveis estéreis. Em cada cavidade foi adicionado 50 µL dos extratos em suas concentrações iniciais, para verificar a presença ou não de atividade antimicrobiana de acordo com a metodologia proposta por Arruda (2007).

Todo o sistema do ensaio foi incubado a 37 °C por 24 h. Decorrido o tempo de incubação, foi feita a leitura e interpretação dos resultados. Cada ensaio foi realizado em triplicata, para cada cepa selecionada.

Resultados e Discussão

Das amostras da Creche, as amostras de 1 a 4 foram dos filtros de barro das salas de aula e a amostra 5 foi da torneira da cozinha. Das amostras da Escola, as amostras de 6 e 7 foram dos filtros de barro das salas de aula e a amostra 8 foi da cisterna, porque estava faltando água na torneira. De acordo com o teste de Presença/Ausência de Coliformes (Totais, Termotolerantes) e *E. coli*, apenas a amostra 2 teve resultado negativo, como pode ser visto na Tabela 1.

De acordo com a metodologia utilizada, a amostra que foi detectada a ausência de coliformes foi descartada e as outras 7 amostras foram transferidas para os Meios Verde Brilhante e EC, respectivamente, para nova incubação.

De acordo com a metodologia utilizada, a amostra que foi detectada a ausência de coliformes foi descartada e as outras 7 amostras foram transferidas para os Meios Verde Brilhante e EC, respectivamente, para nova incubação.

Como pode ser observado na Tabela 2, as 7 amostras

Tabela 1. Teste de presença/ausência de Coliforme (totais, termotolerantes e *E. coli*)

Instituição de ensino	Amostras							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Creche	+	-	+	+	+	0	0	0
Escola	0	0	0	0	0	+	+	+

Tabela 2. Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais em amostras de água da creche e na escola de ensino infantil, respectivamente

Amostras	Combinação de tubos positivos	NMP/100 mL	Intervalo de confiança (%)	
Creche				
1	5-5-0	240	100	940
3	5-5-0	240	100	940
4	5-0-0	23	9,0	86
5	5-5-0	240	100	940
Amostras coletadas na escola de ensino infantil				
6	5-5-0	240	100	940
7	5-5-0	240	100	940
8	5-5-5	>1600	-	-

apresentaram resultado positivo para Coliformes Totais. Destaca-se a amostra 8, apresentando uma alta contaminação.

O grupo de Coliformes totais inclui as bactérias Gram negativas, não esporogênicas, anaeróbias facultativas, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 h, a 35 °C. Sua enumeração na água e/ou alimentos é menos representativa como indicação de contaminação fecal, porque este grupo inclui também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas (Silva et al., 2006). Por isso, torna-se necessário analisar a presença de Coliformes Termotolerantes.

O grupo de Coliformes termotolerantes restringe-se às espécies capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 h, a 44,5-45,5 °C, característica dos Coliformes originários do trato gastrointestinal. Por isso, a sua presença em água e/ou alimentos é representativa de contaminação fecal (Silva et al., 2006).

Em torno de 95 % dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais são *E. coli* e, dentre as bactérias de habitat fecal, a *E. coli* é a mais conhecida e mais facilmente diferenciada (Silva et al, 2005).

Segundo a Legislação Brasileira, através da Portaria 518/04 do Ministério da Saúde, a água destinada ao consumo humano deve estar ausente de *E. coli* ou coliformes termotolerantes (Brasil, 2004).

Das 8 amostras analisadas, 5 estão impróprias para consumo humano e o mais preocupante é que, destas, 4 foram amostras coletadas dos filtros localizados nas salas de aula, como pode ser observado na Tabela 3.

Em todas as 5 amostras houve o desenvolvimento de colônias típicas de *E. coli* (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico), como pode ser observado na Figura 1.

Tabela 3. Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes em amostras de água da creche e na escola de ensino infantil, respectivamente

Amostras	Combinação de tubos positivos	NMP/100 mL	Intervalo de confiança (%)	
Creche				
1	5-5-0	240	100	940
3	5-5-0	240	100	940
4	0-0-0	<2	-	-
5	0-0-0	<2	-	-
Amostras coletadas na escola de ensino infantil				
6	5-5-0	240	100	940
7	5-5-0	240	100	940
8	5-5-5	>1600	-	-



Figura 1. Colônias nucleadas com centro preto sem brilho metálico em Meio EMB (características de *E.coli*) isoladas de uma amostra de água de filtro de uma Instituição de educação infantil da zona rural de Lagoa Seca - PB.

Ao utilizarem concentrações de sementes de moringa para o controle de microrganismos, Lo Monaco et al. (2010) não detectaram efeito positivo do extrato sobre microrganismos. O que pode indicar que, mesmo as sementes de moringa apresentando-se como alternativa no processo de decantação de substâncias, o efeito antimicrobiano provavelmente não seja eficiente.

Após serem submetidas aos tratamentos com extrato de moringa, observa-se na Figura 2 que os extratos não foram eficiente no combate destes microrganismos.

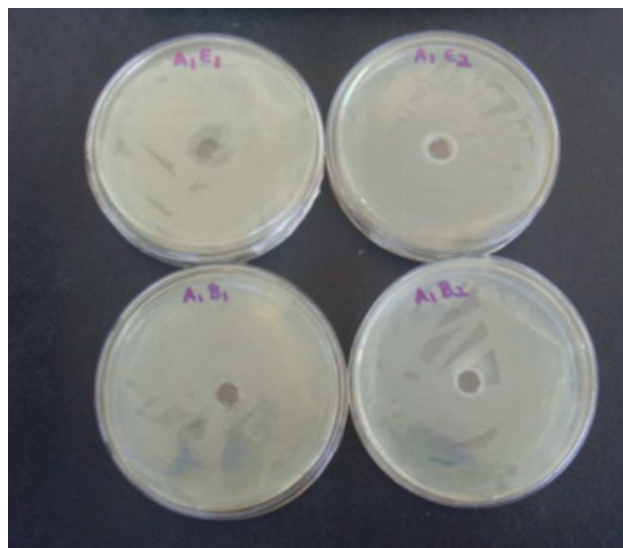


Figura 2. Amostra de *E. coli* resistente aos extratos de *Moringa oleifera*.

As doenças de veiculação hídrica, causadas principalmente por microrganismos patogênicos de origem entérica, animal ou humana e transmitidas basicamente pela rota fecal-oral apresentam um risco de ocorrência alto no meio rural, em função da possibilidade de contaminação bacteriana de águas que muitas vezes são captadas em poços velhos, inadequadamente vedados e próximos de fontes de contaminação, como fossas e áreas de pastagem ocupadas por animais (Amaral et al., 2003).

Deve-se lembrar ainda que mesmo que a água seja encanada e esteja em condições de consumo, a manipulação inadequada dos vasilhames e a falta de higiene pessoal podem significar fator de risco para a transmissão de doenças (Sá et al., 2005).

A *M. oleifera* Lam é que tem sido muito usada para clarear a água com o intuito de substituir os sais de alumínio (Gallão et al., 2006); o que pode estar relacionado à presença de proteínas com baixo peso molecular e alta área superficial específica quando trituradas, fazendo com que suas cargas positivas atraiam as partículas negativas das argilas e siltes, formando partículas densas que se sedimentam, promovendo a remoção da turbidez da água (Amagloh & Benang, 2009). Entretanto, apesar da clarificação, através da decantação das partículas, a água tratada com a moringa não pode ser considerada potável, devido à permanência dos microrganismos, conforme

comprovado neste trabalho e por outras pesquisas (Lo Monaco et al., 2010).

Sabendo que as populações rurais são, muitas vezes, expostas ao consumo de água não potável, destacamos a importância da realização de estudos como este, visando encontrar alternativas para a redução ou até mesmo a solução deste problema. Vale lembrar também da importância de ações de sensibilização das comunidades rurais visando à valorização das questões ambientais no uso dos recursos naturais, enfatizando práticas adequadas de manejo da água.

Conclusão

Não houve ação antibacteriana dos extratos *Moringa oleifera* Lam nas amostras testadas de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

Agradecimentos

À UEPB, ao CNPq, Capes pela concessão de bolsas e apoio financeiro.

Literatura Citada

- AMAGLOH, F. K.; BENANG, A. 2009. Effectiveness of *Moringa oleifera* seed as coagulant for water purification. *African Journal of Agricultura Research* 4(1):119-123.
- AMARAL, L. A. et al. 2006. Tratamento alternativo da água utilizando extrato de semente de *Moringa oleifera* e radiação solar. *Arquivos do Instituto Biológico (Brasil)* 73 (3):287-293.
- ARRUDA, T. A. 2007. Análise da atividade biológica do óleo essencial de *Mentha x villosa* Hudson, rotundifolona e análogos sobre microorganismos e plasmídios de resistência. Tese Doutorado. João Pessoa, PB, Universidade Federal da Paraíba, Laboratório de Tecnologia Farmacêutica. 138p.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. 1991. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3 ed. Baltimore, Willians & Wilkins. pp.739-788.
- FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 1959. 2 ed. São Paulo, SP, Indústria Gráfica Siqueira. 1265p.
- GALLÃO, M. I.; DAMASCENO, L. F.; BRITO, E. S. 2006. Avaliação química e estrutural da semente de moringa - Chemical and structural evaluation of moringa seeds. *Revista Ciência Agronômica (Brasil)* 37 (1):106-109.
- LO MONACO, P. A. V. 2010. Utilização de extrato de sementes de moringa como agente coagulante no tratamento de água para abastecimento e águas residuárias. *Ambi-Agua (Brasil)* 5(3):222-231.
- NÁPOLES, F. A. M. 2010. Levantamento dos recursos hídricos em uma instituição de ensino na zona rural do agreste paraibano. In: Congresso Cearense de Agroecologia, 2. Anais. Cariri, CE, UFC.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDART (NCCLS). 2002. Methods for diluition antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2 ed. Villa Nova, PA. (Tentative Standart. NCCLS Document M7-T2, V. B. n. B.)
- NÓBREGA, F. V. A.; SUASSUNA, N. D. 2004. Análise sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) armazenadas em algumas áreas do estado da Paraíba. *Revista de Biologia e Ciências da Terra (Brasil)* 4(2):1-13.
- POZZOBON, L.; KEMPKA, A. P. 2015. Sementes de *Moringa oleifera* na clarificação de efluente de indústria de ingredientes para alimentação animal: comparação com o coagulante convencional e estudo das condições operacionais. *Engvista (Brasil)* 17(2):196-206.
- SÁ, L. L. C. et al. 2005. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em duas áreas contempladas com intervenções de saneamento - Belém do Pará, Brasil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde (Brasil)* 14(3):171-180.
- SILVA, C. A. et al. 2006. Uso da *Moringa oleifera* para remoção de flúor em águas. *Revista Analytica (Brasil)* 21:71-75.
- VIEIRA, L. R.; VIEIRA, L. R.; VESTENA, S. 2015. A questão do saneamento no espaço rural: uma abordagem ambiental em três localidades rurais no município de Nova Palma, RS. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental (Brasil)* 19(1):38-50.

