



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE CENTRO DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS**

**KLEBER AFONSO DE CARVALHO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DA  
*MORINGA OLEÍFERA* SOBRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

**POMBAL  
2020**

**KLEBER AFONSO DE CARVALHO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO  
DA *MORINGA OLEÍFERA* SOBRE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Pombal-PB, como parte integrante dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Sistemas Agroindustriais.

**Área de Concentração:** Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

**Orientador:** Prof. D.Sc. Antônio Fernandes Filho

**POMBAL  
2020**

C331a Carvalho, Kleber Afonso de.

Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da *Moringa oleifera* sobre *Pseudomonas aeruginosa* / Kleber Afonso de Carvalho.

– Pombal, 2020.

50 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, 2020.

“Orientação: Prof. Dr. Antonio Fernandes Filho”.

Referências.

1. Planta medicinal. 2. Interação medicamentosa. 3. Anti-Infeciosos. I. Fernandes Filho, Antonio. II. Título.

CDU 633.88(043)

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO  
DA MORINGA OLEÍFERA SOBRE PSEUDOMONAS AERUGINOSA**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Campus de Pombal-PB, como parte integrante dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Sistemas Agroindustriais.

**Área de Concentração:** Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

**Orientador:** Prof. Dr.Sc. Antônio Fernandes Filho


Aprovado em 09/10/2020.

COMISSÃO EXAMINADORA



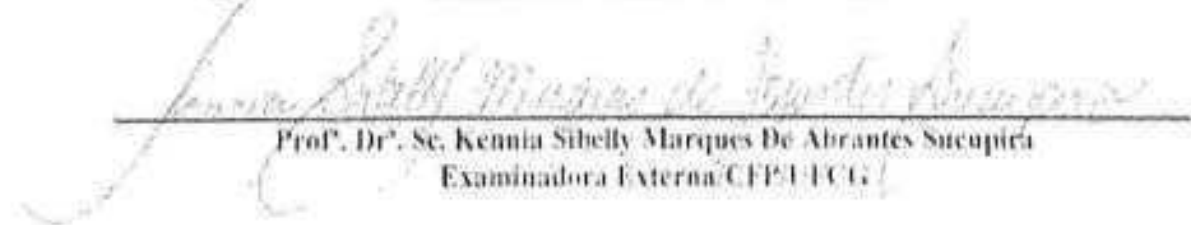
---

Prof. Dr. Sc. Antônio Fernandes Filho  
Orientador/PPGSA/UFCG



---

Prof. Dr. Sc. Amílcar Pereira De Castro  
Examinadora Interna/PPGSA/UFCG



---

Prof. Dr. Sc. Kennia Sibelly Marques De Abrantes Sucupira  
Examinadora Externa/CFP/UFCG

“O conhecimento emerge apenas através da invenção e da reinvenção, através da inquietante, impaciente, contínua e esperançosa investigação que os seres humanos buscam no mundo, com o mundo e uns com os outros.”

*(Paulo Freire)*

A minha inteira dedicação a Wilma Moreira Silva Carvalho minha esposa, apoiadora incondicional de todos os meus projetos, por depositar em mim toda esperança em dias melhores e a confiança que esse sonho se realizaria.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida, por toda força, ânimo e coragem que me ofereceu para superar todas as dificuldades.

Aos meus pais, Francisco Afonso de Carvalho (in memoriam) e Marilene Araújo de Carvalho que me criaram com todo cuidado, zelo e dedicação, são eles os responsáveis pelo meu caráter, pelos valores de respeito, honestidade e humildade a mim repassados.

Aos meus irmãos, por acreditarem em mim, que na minha ausência, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente.

Aos meus sobrinhos, sobrinhas, afilhados e agregados que ainda jovens e crianças por compreenderem as minhas ausências, e fazer parte de tudo àquilo que faz sentido para mim.

A meu orientador professor Dr. Sc. Antônio Fernandes Filho, pelos ensinamentos, pela paciência e disponibilidade em orientar-me.

A amiga Flaviana doutora em química pela Universidade Federal da Paraíba campus João Pessoa, pela disposição em ajudar durante todo o processo de secagem do extrato.

A amiga Laraina Moreira, por ouvir-me todas as vezes que procurei e por acreditar em mim, quando esse objetivo que concretizo hoje parecia tão distante.

Aos amigos Francarlos e Michel, pela disponibilidade e atenção a mim dispensada no laboratório de Microbiologia do campus da UFCG Cajazeiras e em outros momentos. Com certeza vocês são exemplos de resiliência e determinação. Admiro a disposição de vocês em ajudar e a persistência quando tudo parecia difícil.

Ao Normando secretário do mestrado no campus da UFCG Pombal, pela maneira de me tratar todas as vezes que o procurei.

Aos amigos e amigas do IFPB pelo carinho, apoio e orientações sempre que precisei.

Ao amigo José de Arimatéia Tavares, ao professor Sonildo e a Professora Wilma pelo apoio nos aportes finais.

Aos Colegas de carona, momentos de descontração e orientações Fraçalles e Leonardo.

Ao colega que partiu precocemente Dr. Júnior Bento, que será lembrado por sua amizade, honestidade, profissionalismo, discrição e humildade.

Ao Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande, por todo apoio na realização desta pesquisa.

Meu muito obrigado a todos!

CARVALHO, K.A. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da *Moringa oleífera* sobre *Pseudomonas aeruginosa*. 2020. 51f. Dissertação (**Mestrado em Sistemas Agroindustriais**) - Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, Universidade Federal de Campina Grande, Pombal, Paraíba, 2020.

## RESUMO

A *Moringa oleífera* Lam é uma leguminosa que pode apresentar ampla propriedade antimicrobiana, assim como valor econômico e medicinal, proporcionando a melhoria da saúde. Proveniente da Índia, é conhecida como Acácia-branca no Brasil, onde adaptou-se bem a região Nordeste. A *Moringa oleífera* e vários outros extratos de plantas medicinais têm apresentado efeitos antimicrobianos e, quando associadas aos fármacos, podem representar uma alternativa terapêutica no combate às doenças infecciosas como a *Pseudomonas aeruginosa* que é um bacilo não fermentador de elevada resistência aos antibióticos, capaz de infectar animais, insetos e seres humanos. São objetivos desta pesquisa: analisar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da *Moringa oleífera* (EMO) sobre a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do EMO e verificar a interação desse extrato associada aos antibióticos Benzilpenicilina, Ciprofloxacino e Oxacilina. Após diluição, o EMO foi colocado em placa de 96 poços para determinar a concentração inibitória mínima (CIM). A atividade moduladora da ação dos antibióticos foi avaliada pela concentração subinibitória do EMO e dos antibióticos em concentrações decrescentes, partindo de 1024µg/ml até 16µg/ml. Os resultados dos testes mostraram que o EMO não possui atividade antimicrobiana clinicamente relevante, para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Observamos a inibição do Ciprofloxacino quando associamos o EMO. Em associação com a Oxacilina o EMO demonstrou atividade antibacteriana em todos os poços, enquanto que com a Benzilpenicilina não sofreu alterações. Mediante o fato de o extrato não ter demonstrado ação antibacteriana sobre a cepa da *Pseudomonas aeruginosa*, não sendo possível relatar os motivos, sugere-se identificar os componentes químicos da semente da *Moringa oleífera*, pois podem apresentar variação em virtude da sazonalidade, período de coleta, origens geográficas diferentes, presença de contaminantes, entre outros. A principal descoberta desta pesquisa foi a interação medicamentosa da *Moringa oleífera* associada ao antibiótico Ciprofloxacino inibindo a ação deste sobre *Pseudomonas aeruginosa* sugerindo-se evitar o consumo desta planta concomitantemente com este fármaco até que sejam realizadas mais pesquisas no âmbito das interações medicamentosas para maiores detalhes.

**Palavras-chave:** *Moringa oleífera*. *Pseudomonas aeruginosa*. Interação Medicamentosa. Anti-Infecciosos.



## ABSTRACT

The *Moringa oleifera* lam is a legume that can present wide antimicrobial property, as well as economic and medicinal value, providing improved health. From India, it is known as White Acacia in Brazil, where it has adapted well to the Northeast region. Oleiferous *Moringa* and several other medicinal plant extracts have shown antimicrobial effects and, when associated with drugs, may represent a therapeutic alternative in the fight against infectious diseases such as *Pseudomonas aeruginosa* which is a non-fermenting bacillus with high resistance to antibiotics, capable of infecting animals, insects and humans. The objectives of this research are: to analyze the antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of oleiferous *Moringa* (EMO) on the *Pseudomonas aeruginosa* strain (ATCC27853), to determine the minimum inhibition concentration (MIC) of EMO and to verify the interaction of this extract associated with the antibiotics Benzylpenicillin, Ciprofloxacin and Oxacillin. After dilution, the EMO was placed in a 96-well plate to determine the minimum inhibition concentration (MIC). The activity modulating the action of antibiotics was evaluated by the subinhibitory concentration of EMO and antibiotics at decreasing concentrations, from 1024 $\mu$ g/ml up to 16 $\mu$ g/ml. The test results showed that EMO does not have clinically relevant antimicrobial activity for *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). We observed ciprofloxacin inhibition when associating EMO. In combination with Oxacillin, EMO demonstrated antibacterial activity in all wells, while with Benzylpenicillin it has not undergone changes. Due to the fact that the extract did not demonstrate antibacterial action on the *Pseudomonas aeruginosa* strain, and it is not possible to report the reasons, it is suggested to identify the chemical components of the oleiferous *Moringa* seed, as they may vary due to seasonality, collection period, different geographical origins, presence of contaminants, among others. The main discovery of this research was the drug interaction of oleiferous *Moringa* associated with the antibiotic Ciprofloxacin inhibiting its action on *Pseudomonas aeruginosa*, suggesting avoiding the consumption of this plant concomitantly with this drug until further research is carried out in the context of drug interactions for more details.

Keywords: *Moringa oleifera*. *Pseudomonas aeruginosa*. Drug Interaction. Anti-Infectives.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Determinação da Concentração Inibitória Mínima diante de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 39

**Tabela 2:** Modulação do extrato de *Moringa oleífera* com antibióticos diante de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 41

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Determinação da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato da semente de *Moringa* 35
- Quadro 2:** Esquema de distribuição dos antibióticos em modulação para *P. aeruginosa* (ATCC 27853) 42

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Arvore filogenética da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
<b>Figura 2:</b> Fatores de Virulência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
<b>Figura 3:</b> Venda de Ervas Mediciniais na Feira Livre de Cajazeiras-PB	23
<b>Figura 4:</b> <i>Moringa oleífera</i> Lam. UFCG Campus Cajazeiras	24
<b>Figura 5 -</b> Classificação Taxionômica da <i>Moringa oleífera</i> Lam	25
<b>Figura 6-</b> Distribuição geográfica da <i>Moringa oleífera oleífera</i> Lam	25
<b>Figura 7-</b> Catálogo de cores de Munsell (1976), maturação fisiológica	26
<b>Figura 8-</b> Composição nutricional das folhas secas em pó da <i>Moringa oleífera</i>	27
<b>Figura 9-</b> Mapa ilustrativo da região onde foi realizada a pesquisa	30
<b>Figura 10 A e B –</b> Latitude e longitude do local de coleta das sementes de <i>Moringa oleífera</i> - Amostra da vagem e sementes de <i>Moringa oleífera</i>	30
<b>Figura 11 -</b> Amostra da vagem e sementes de <i>Moringa oleífera</i>	31
<b>Figura 12-</b> Amostra das sementes de <i>Moringa oleífera</i> após retirado a casca	31
<b>Figura 13 A e B-</b> Maceração das sementes de <i>Moringa</i> e solução hidroalcoólica 1:1.	32
<b>Figura 14 A, B e C:</b> Solução hidroalcoólica 72h após, Filtragem e Estufa Digital à 40°C	32
<b>Figura 15-</b> Fluxograma da preparação do extrato da <i>Moringa oleífera</i>	33
<b>Figura 16- A, B e C:</b> Linhagem ATCC, Subcultivo da <i>Pseudomonas</i> e Estufa a 37°C	34
<b>Figura 17- A, B e C:</b> Antibióticos, Extrato da <i>Moringa oleífera</i> em Pó e Extrato diluído	34
<b>Figura 18-</b> Fluxograma da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
<b>Figura 19-</b> Fluxograma da atividade moduladora	37
<b>Figura 20-</b> Pó obtido do extrato hidroalcoólico da <i>Moringa oleífera</i>	37
<b>Figura 21-</b> Placas avaliadas na CIM, Antibióticos e EMO Extrato da <i>Moringa oleífera</i>	38
<b>Figura 22-</b> Placa avaliada no processo de modulação	42
<b>Figura 23-</b> Gráfico da modulação do extrato de <i>Moringa oleífera</i> com antibióticos diante de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	43

## LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI – Brain Heart Infusion

°C - Celsius

CBM - Concentração Bactericida Mínima

CE - Ceará

CFP – Centro de Formação de Professores

CIM – Concentração Inibitória Mínima

EMB – Ágar Eosina Azul de Metileno

EMO – Extrato da Moringa oleífera

ICS – Infecções da Corrente Sanguínea

IRAS – Infecções Relacionadas à assistência à Saúde

LAM - Lamarck

L/min – Litros por Minuto

LPS – Lipolissacarídeos

m<sup>3</sup>/min – Metros cúbicos por Minuto

µg/ml – Microgramas por mililitros

mL – Mililitros

ml/h – Milímetros Cúbicos por Hora

MMC – Concentração Mínima Microbicida

PB – Paraíba

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

UFCEG – Universidade Federal de Campina Grande

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	15
2.1 Gênero <i>pseudomonas</i>	15
2.2 Fatores de virulência e componentes estruturais de patogenicidade	16
2.3 Principais infecções causadas por <i>pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.4 Resistência de <i>pseudomonas aeruginosa</i> aos antimicrobianos e tratamento	19
<b>3. PLANTAS MEDICINAIS</b>	20
3.1 Interações entre plantas medicinais e medicamentos	23
<b>4. MORINGA OLEÍFERA LAM</b>	23
4.1 Taxionomia e posição sistemática da <i>Moringa oleífera Lam</i>	24
4.2 <i>Moringa oleífera Lam</i> e sua origem botânica	25
4.3 Maturação fisiológica das sementes de <i>Moringa oleífera Lam</i>	26
4.4 Valor nutricional da <i>Moringa oleífera Lam</i>	27
4.5 Atividade antimicrobiana da <i>Moringa oleífera Lam</i>	28
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
5.1 Tipo de pesquisa	29
5.2 Local da pesquisa	29
5.3 Obtenção do material botânico	30
5.4 Preparação do extrato	31
5.5 Determinação da atividade antibacteriana do extrato da <i>moringa oleífera</i>	33
5.5.1 Microrganismos	33
5.5.2 Preparo das soluções de extrato e antibióticos	34
5.5.3 Concentração Inibitória Mínima	35
5.5.4 Modulação	36
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	37
6.1 Rendimento do extrato da <i>moringa oleífera</i>	37
6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (cim) do extrato da <i>moringa oleífera</i> e dos antibióticos	38
6.3 Modulação	40
<b>7 CONCLUSÃO</b>	43
<b>REFERÊNCIAS</b>	44

## 1 INTRODUÇÃO

Pertencente à classe das gamaproteobactérias, a *Pseudomonas aeruginosa* pode metabolizar diversas fontes de carbono e nitrogênio, crescendo tanto aerobiamente como anaerobiamente. (KAIHAMI, 2018).

Mencionada na literatura por Schroeter pela primeira vez em 1892, a *Pseudomonas Aeruginosa* foi chamada de *Bacterium aeruginosium*. Pertencente à família *Pseudomonadaceae*, ela é um bacilo não fermentador, presente em vários ambientes da natureza, tais como a água e o solo, além de frutas e vegetais, capaz de infectar plantas, insetos, animais e atuar como patógeno oportunista em seres humanos (GOODERHAM; HANCOCK, 2009). Nestes, age como causador de infecções em diversos órgãos e tecidos, a exemplo da pele, pulmão, olhos, ouvidos, trato urinário, além de provocar feridas e queimaduras (WILLIAMS *et al.*, 2010, COOGAN; WOLFGANG, 2012).

As infecções hospitalares, atualmente conhecidas por Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) dizem respeito a uma temática que continua chamando atenção no cenário mundial, por ser um grave problema de saúde pública que demanda controle, prevenção e tratamento (ABREU, 2018). Essas infecções hospitalares para alguns autores, trata-se de um episódio, não somente biológico, mas histórico e social de impacto direto na segurança da assistência à saúde, de grandes desafios mundiais para a qualidade dos cuidados em saúde (SILVA, 2008, OLIVEIRA; SILVA; LACERDA, 2010).

No Brasil existe uma crescente busca por novas alternativas que se explicam devido a uma série de problemas relacionados à multirresistência, acarretada, na maioria dos casos pelo uso abusivo de antibióticos que têm causado prejuízos à saúde da população em geral, pois os microrganismos tornaram-se mais resistentes às drogas. Controlar o crescimento destes microrganismos através dos extratos, frações e compostos de plantas tem-se mostrado como eficaz tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (DUARTE, 2006).

Neste contexto, o crescente aumento da resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos tem restringido as alternativas de tratamento das infecções relacionadas à assistência à saúde nos hospitais brasileiros, fazendo com que medidas sejam tomadas para solucionar tais problemas. Outra proposta seria o desenvolvimento de pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência da *Pseudomonas aeruginosa*, além da continuidade dos estudos referentes ao desenvolvimento de novas drogas sintéticas e/ou naturais (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

O uso de plantas medicinais constitui-se um dos recursos tradicionais mais antigos da manifestação humana, tanto na alimentação, quanto no tratamento de suas enfermidades. Há registro de cultivo de plantas medicinais na China, que datam de 3.000 a.C.; hebreus, assírios e egípcios em 2.300 a.C. também as cultivavam, produzindo vermífugos, diuréticos, purgantes, soluções líquidas e goma para o embalsamento de múmias.

Para Organização Mundial da Saúde – OMS, as plantas medicinais são espécies vegetais das quais se podem obter produtos de interesse terapêutico e usados como medicamentos em humanos (DI STASI, 2007). Em todas as espécies vegetais existem componentes químicos que podem ser ativos como medicamentos, o que não torna necessariamente, a espécie uma planta medicinal. Na realidade, é defendido por vários autores que as plantas medicinais são de conhecimento popular como uma amostra de valor medicinal que tem alguma propriedade para prevenir ou combater determinadas doenças (NOLLA *et al.*, 2005; DI STASI, 2007).

Segundo Sousa *et al.*, (2014), dentre as plantas medicinais mais estudadas à *Moringa oleífera* destaca-se por apresentar uma ampla propriedade antimicrobiana de valor econômico e medicinal. Esta vasta utilização pode ser utilizada como antiespasmódico, diurético, expectorante, antifúngico, tônico cardíaco e antisséptico (MISHRA *et al.*, 2011). A *Moringa oleífera* tem suas propriedades biológicas atribuídas aos tocoferóis, compostos fenólicos,  $\beta$ -caroteno, Vitamina C e proteínas totais, Vitamina A, metionina, cisteína, ferro e cálcio de acordo com Ferreira *et al.*, (2016).

Considerando que a *Moringa oleífera* tem baixo custo, por ser de fácil acesso à população, não existindo contraindicações quanto ao seu uso terapêutico, podendo apresentar atividade antibacteriana sobre a *Pseudomonas Aeruginosa*, tal fato motivou-me à realização desta pesquisa, uma vez que a *Moringa oleífera* é pouco conhecida e divulgada entre os profissionais da área da saúde. Apesar da relevância apresentada, a *Moringa oleífera* in natura ou de forma industrializada ainda não se encontra acessível para muitos profissionais e, quando o serviço oferece, há necessidade de habilidades técnicas para fazer o seu uso de forma correta.

Nesse sentido, este estudo foi desenvolvido com os objetivos de analisar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da *Moringa oleífera*, sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, determinando a Concentração Inibitória Mínima - CIM do extrato da *Moringa oleífera* frente à cepa de *Pseudomonas Aeruginosa* e verificar a ação do Extrato da *Moringa oleífera* - EMO isolado e em associação com os antibióticos Benzilpenicilina, Ciprofloxacino e Oxacilina.

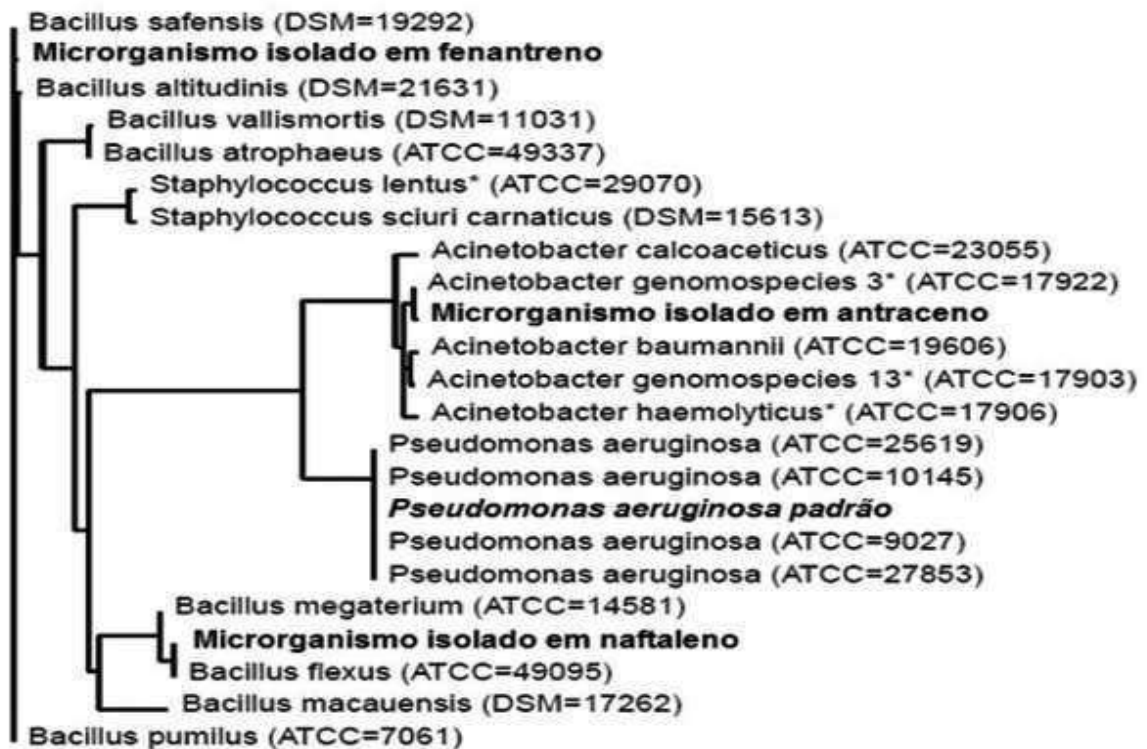


## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Gênero *Pseudomonas*

A *Pseudomonas aeruginosa* pertence à classe das gamaproteobactérias (Figura 1). É uma bactéria gram-negativa, capaz de metabolizar diversas fontes de nitrogênio e carbono, estando presente em diversos ambientes naturais, como no solo, na água, em frutas e vegetais. A *Pseudomonas Aeruginosa* pode apresentar resistência natural ou adquirida a antibióticos sendo constantemente relacionada a infecções em pacientes com imunossupressão. As infecções pulmonares são uma das maiores taxas de mortalidade relacionadas a esta bactéria (KAIHAMI, 2018; ABREU, 2018). Um dos problemas de saúde mais relevantes na atualidade é a resistência bacteriana aos antibióticos. Muitas bactérias deixaram de responder aos tratamentos com antibióticos, sendo tal fenômeno relacionado ao uso acelerado e inadequado destes fármacos, demonstrando uma relação evidente de consumo alto de antibióticos com níveis mais elevados de resistência microbiana (LOUREIRO *et al.*, 2016).

**Figura 1:** Árvore filogenética da *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: PINHATI *et al.*, (2014).

A *Pseudomonas aeruginosa* é facilmente encontrada em lagos e rios em altas concentrações, no entanto, em amostras analisadas em águas de consumo humano é reduzido à quase 2%, relação provável à sua capacidade de colonizar biofilmes presentes em sistemas de distribuição, proliferando-se graças aos compostos orgânicos como fontes de carbono e energia, capaz de causar várias patologias em pacientes imunossuprimidos (RIVAS *et al.*, 2015). Ainda de acordo com os autores, sendo de baixa necessidade nutricional, a *Pseudomonas aeruginosa*, limita-se unicamente para proliferar à presença de oxigênio. Foi demonstrado em pesquisas recentes que ela é um dos poluentes mais comuns encontrados nas fontes de água potável para consumo humano.

Sua identificação laboratorial se baseia no isolamento e identificação morfológica da colônia, pela produção de pigmentos e testes bioquímicos. A *Pseudomonas Aeruginosa* cresce sem dificuldade em meios de cultivo enriquecidos como ágar sangue e MacConkey ou seletivo diferencial como ágar eosina azul de metileno (EMB) e cetiltrimetil cloreto de amônio (cetrimide). Pode ser identificada pelo odor de uvas característico e produz pigmentos hidrossolúveis como pioverdina (pigmento fluorescente também produzido por outras espécies de *Pseudomonas* do Grupo Fluorescente a qual pertencem) e um pigmento azul característico, a piocianina. De acordo com alguns estudos estes dois pigmentos citados são responsáveis pela cor verde brilhante, característica própria de uma doença a patognomônica das colônias de *Pseudomonas Aeruginosa* (JÁCOME, 2011., ABREU, 2018., KONEMAN *et al.*, 2008).

Em seres humanos, tem comportamento como microrganismo oportunista, causador de infecções em vários órgãos e tecidos, como pele, pulmão, trato respiratório, ouvidos, olhos, além de queimaduras e feridas (WILLIAMS *et al.*, 2010).

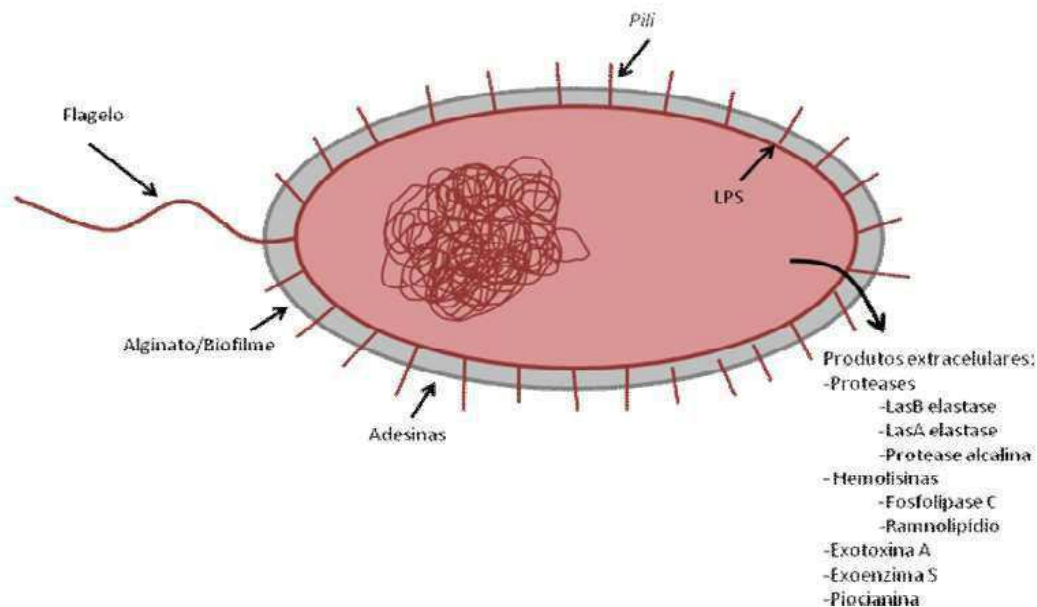
Segundo Freitas (2013), no ambiente hospitalar as infecções por *Pseudomonas aeruginosa* podem ter procedência endógena ou exógena. A disseminação desse microrganismo poderá ocorrer no trato respiratório, sob o risco de pacientes em ventilação mecânica, transplantados de pulmão, desenvolverem pneumonia. Para o autor, outro fator de risco importante para colonização das vias aéreas de pacientes que proporcionam um crescimento seletivo de *Pseudomonas Aeruginosa* é o uso de antimicrobianos.

## **2.2 Fatores de virulência e componentes estruturais de patogenicidade**

De acordo com Abreu (2018), são vários determinantes de virulência envolvidos na patogenia das infecções causadas pela *Pseudomonas Aeruginosa*. Dificilmente provoca

doenças em seres humanos saudáveis, por isso é considerada um patógeno oportunista, causando infecções respiratórias, urinárias, dermatites, septicemia e outros agravos em pacientes imunocomprometidos, principalmente os hospitalizados (JÁCOME, 2011; ABREU, 2018). Os fatores determinantes de virulência ligados à superfície bacteriana, como lipossacarídeos, pili, proteínas da membrana externa, flagelos e o alginato/biofilme, além de fatores secretados pelos microrganismos como as toxinas, elastases, proteases, fosfolipases, piocianina, fenazinas, ramnolipídeos, siderofóros, exotoxina A, exotoxina S, nitrito redutase entre outros são importantes para o processo de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 2).

**Figura 2:** Fatores de Virulência da *Pseudomonas Aeruginosa*.



**Fonte:** (VAN DELDEN, IGLEWSKI, 1998).

De acordo com Lau *et al* (2005), a adesão de formas livres de microorganismo, às formas planctônicas, às células do hospedeiro ou a superfícies inanimadas, como cateteres e próteses inicia-se a partir do modo de interação da bactéria com o hospedeiro. Segundo Freitas (2013), existe um componente que fica na superfície da bactéria, responsável por sua adesão ao epitélio respiratório chamado pílus. De acordo com o autor os flagelos foram identificados como adeninas para vários componentes do trato respiratório. O flagelo proporciona ao microorganismo motilidade e atividade cinética (SADIKOT *et al.*, 2005).

Um fator de virulência de grande importância citado por Winn *et al* (2008), são os lipolissacarídeos (LPS) da parede celular, subdividido em sorogrupos, com grande diversidade de imunotipos, podendo sua identificação ser um método de tipagem bacteriana. Responsáveis pelas propriedades endotóxicas do microorganismo, considerado causador da síndrome séptica.

Para Jácome (2011), um processo muito importante de adesão tecidual causado pela *Pseudomonas aeruginosa* é a formação de biofilme, que proporciona aos isolados desta espécie uma consistência mucoide. O biofilme, segundo a autora, consiste em polissacarídeo extracelular conhecido como alginato. A durabilidade do microorganismo por um longo período, impedindo o acesso de elementos da resposta imune do hospedeiro e de antimicrobianos é favorecido pela produção do alginato (WILLIAMS *et al.*, 2010). De acordo com Abreu (2018), os biofilmes são encontrados nos ecossistemas naturais e patogênicos e tem um papel importante em doenças infecciosas. O aspecto mucoide em alguns isolados está associado intimamente a um mau prognóstico da infecção, o microorganismo cresce com ajuda do muco formando o biofilme, servindo de nicho protetor da bactéria contra reconhecimento do sistema imune e ação dos antimicrobianos (CIOFU *et al.*, 2008).

A *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de escolher diferentes estratégias em resposta à sua interação com o ambiente e o hospedeiro. A *Pseudomonas aeruginosa*, é um importante patógeno respiratório em pacientes com fibrose cística, doença genética com manifestações clínicas principais à doença pulmonar obstrutiva crônica e a insuficiência pancreática exócrina (FERREIRA, 2005).

### **2.3 Principais infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa***

A *Pseudomonas aeruginosa* é responsável por causar uma série de infecções em seres humanos e é um dos agentes de infecção hospitalar mais prevalente no mundo. Segundo Murray (1995), as infecções causadas por este agente vão desde infecções superficiais de pele à sepsse fulminante. Conhecer e identificar essas bactérias propiciam medidas de controle destas infecções as quais podemos destacar as do trato respiratório inferior, respiratório superior, gastrointestinal, urinário, sistema nervoso central, infecções superficiais e tecidos moles, infecções ósseas e articulares (ABREU, 2018; BUCIOR *et al.*, 2012; FREITAS, 2013; TRABULSI; ALBERTUM, 2015). Segundo Ferreira (2005), a *Pseudomonas aeruginosa* adquirida em UTI tem uma característica marcante à

multirresistência; nestas unidades, os percentuais são mais elevados nas amostras isoladas e o uso de antimicrobianos é elevado neste ambiente, possibilitando entre os internos a transmissão de cepas multirresistentes.

#### **2.4 Resistência de *Pseudomonas aeruginosa* aos antimicrobianos e tratamento**

Tratar infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* é um desafio à terapia antimicrobiana devido a grande resistência bacteriana a estes fármacos. De acordo com Todar (2009) e Fuentefria *et al* (2008), geralmente os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam esse amplo espectro de resistência, tornando-se um desafio ao tratamento por antimicrobianos porque podem resistir a várias classes desses medicamentos, incluindo as cefalosporinas de terceira e quarta gerações e carbapenêmicos. Este fator é tão complicado quanto sua malignidade. Segundo Gooderham (2009) e Hancock (2009), Além destes mecanismos intrínsecos resistentes e dos adquiridos por mutação clássica, pode ocorrer resistência adaptativa por condições ambientais.

Segundo Abreu (2018), por muito tempo, a polimixina B e a colistina (polimixina E) eram os únicos antibióticos encontrados que apresentavam atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*, sendo a nefrotoxicidade um de seus agravantes. Logo após, surgiram a gentamicina e a carbenicilina que os substituíram por um período curto de tempo até nova resistência bacteriana (TRABULSI; ALTERTUM, 2015). Um dos mecanismos de resistência da *Pseudomonas aeruginosa* é a permeabilidade baixa da parede celular e da membrana lipopolissacarídica externa que forma uma barreira seletiva (JACOMÉ, 2011). Segundo Ciofu *et al* (2008), esta bactéria tem a tendência de formar biofilmes que protegem as colônias contra as concentrações curativas dos antibióticos.

Quanto ao uso de produtos naturais como antimicrobianos, Almeida *et al* (2011) afirmam que a *Moringa oleífera* tem um amplo espectro antimicrobiano, onde o extrato das folhas de *Moringa oleífera* utilizado em seu experimento mostrou-se eficiente contra *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *E. faecalis* e *A. Caviae*. O estudo mostrou um potencial promissor para extratos etanólicos e aquosos das folhas de *Moringa oleífera* como alternativa ao tratamento de infecções causadas pelas cepas testadas, com bom efeito antibacteriano em *S. aureus*, mas não em *Pseudomonas aeruginosa*. Já no estudo de Almeida (2018), várias partes da planta possuem atividade antimicrobiana contra bactéria e fungos, apresentando atividade *in vitro* contra bactérias, leveduras, dermatófitos e helmintos pelo método de difusão em disco. Segundo a autora, as folhas e o extrato aquoso

das sementes de *Moringa oleífera* inibem o crescimento de *Pseudomonas Aeruginosa* e *S. aureus*.

De acordo com Almeida (2018), os flavonóides extraídos das cascas da sementes de *Moringa oleífera* têm potencial para inibir a anexação celular, podendo provocar o rompimento de biofilmes pré-formados por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e pelo fungo *Candida albicans*.

### 3. PLANTAS MEDICINAIS

A história das plantas medicinais de acordo com Korczovei e Romagnolo (2013), tem início antes das mais antigas civilizações conhecidas. Segundo as autoras, recorrer às virtudes curativas de determinados vegetais fazia parte do esforço do homem para compreensão e utilização da natureza para curar ou diminuir os sofrimentos causados pelas enfermidades.

A utilização de plantas medicinais representa um dos recursos mais longevos utilizados pelo homem para tratamento de suas doenças. Ao longo da história, esse conhecimento foi passado de geração em geração pelo hábito de consulta aos mais idosos e a livros sobre plantas medicinais, que, utilizando-se de mitos e rituais, constituíram parte da cultura local. (KORCZOVEI, ROMAGNOLO, 2013, ALVES *et al*, 2016).

De acordo com Cunha (2008), esse conhecimento foi inicialmente transmitido oralmente por gerações, e depois, registrado e guardado como um tesouro após o aparecimento da escrita.

Para conhecer as contribuições dadas por diferentes civilizações é necessário retornar no tempo e verificar o desenvolvimento humano em relação às plantas medicinais. (KORCZOVEI, ROMAGNOLO, 2013).

Há registros de 3.000 a.C. de utilização e cultivo de plantas medicinais na China, como também cultivadas pelos egípcios, assírios e hebreus há 2.300 a.C. que produziam vermífugos, diuréticos, purgantes, produtos líquidos e gomas para embalsamentos de múmias. Descrições das plantas e seus atributos foram encontrados no *Livro dos Mortos* em forma de receita para embalsamar cadáveres e no *Livro dos Vivos* eram descritos as propriedades e o uso de plantas para tratamento de enfermidades. Já Hipócrates (460-377 a.C.), considerado o Pai da Medicina, deixou seus escritos sobre doenças e os remédios feitos com plantas para combatê-las (COAN e MATIAS, 2013).

De acordo com Almeida (2018), a *Moringa oleífera*, como planta medicinal, tem histórico datado desde 150 a.C.. Esses dados revelam que as folhas e os frutos de *Moringa oleífera* eram consumidos por antigos reis e rainhas na sua dieta para manter a mente alerta e a pele saudável. Os extratos das folhas de *Moringa oleífera* eram usados por guerreiros “Maurian”, na Índia, na frente de batalha, bebida esta que lhes davam energia suplementar e aliviava o stress e as dores a que estavam expostos durante a guerra, relata a autora.

De acordo com Alves *et al* (2016) apud Monteiro *et al* (2010), manter uma boa resiliência e manutenção do conhecimento sobre as plantas medicinais é imprescindível para reunir, concentrar, manter e difundir o saber empírico sobre a diversidade tanto da fauna como da flora, ressaltando a importância dos mercados tradicionais que comercializam as plantas medicinais.

Influenciada pelas culturas indígenas, africanas e europeias, a utilização de plantas medicinais surge no Brasil como opção terapêutica (ALVES *et al*, 2016). O primeiro registro do uso de plantas medicinais no Brasil data de 1587 no Tratado Descritivo do Brasil segundo Souza (1587), “... *uma árvore comprida e delgada, que faz uma copa em cima de pouca rama... tem o olho desta árvore grandes virtudes para com ele curarem feridas...*”. No capítulo LXI é relatado a qualidade de ervas encontradas na Bahia, parecida com a erva-santa encontrada em Portugal, que fazem curas estranhas matando com seu sumo os vermes que se criam em feridas e chagas, o autor descreve que a doença matou muita gente e que com esta erva houve muita cura. (SOUZA, 1587).

Os primeiros europeus, ao chegarem ao Brasil, encontraram uma imensidade de plantas medicinais em uso pelas tribos locais. Em contato com os pajés estes conhecimentos foram transmitidos e aprimorados por gerações. Os novos conhecimentos fundiram-se com os trazidos da Europa e com a contribuição dos escravos africanos e suas plantas trazidas da África (LORENZI e MATOS, 2008).

De acordo com Lorenzi e Matos (2008), o Brasil, até o século XX, era substancialmente rural, com grande utilização da flora medicinal que foi posta em segundo plano com início da industrialização e conseqüentemente da urbanização. Com o surgimento dos medicamentos sintéticos e poucos estudos sobre as propriedades farmacológicas das plantas medicinais, evidenciou-se a flora medicinal como sinônimo de atraso tecnológico e charlatanismo.

Para Oliveira *et al* (2011), o conhecimento sobre a utilização de plantas medicinais tende a desaparecer por falta de interesse das novas gerações, tornando necessária a

valorização desta cultura e a retomada do conhecimento adquirido pela população sobre o uso dos recursos naturais, para que não fique esquecido ao passar dos anos.

Corroborando com os autores acima, Korczovei e Romagnolo (2013) afirmam que ocorre uma diminuição considerável do hábito de cultivo e uso de plantas medicinais em regiões mais urbanizadas. Segundo os autores, mesmo em regiões menos desenvolvidas, os mais jovens se desvinculam dessas práticas, para sentirem-se mais inseridos na sociedade atual, deixando de lado a tradição e a cultura dos seus antepassados em detrimento da valorização dos remédios sintéticos hoje comercializados em farmácias.

Segundo Lorenzi e Matos (2008), em busca de bases mais consistentes para validação científica do uso de plantas medicinais, foram estabelecidas novas linhas de pesquisas em universidades brasileiras. Este despertar tem haver com as novas tendências globais de preocupação com a biodiversidade e desenvolvimento sustentável.

Por seu baixo custo e acessibilidade, as plantas medicinais representam uma importante alternativa para o tratamento das enfermidades e atualmente são muito procuradas pela população. Esta busca fez com que aumentasse o número de mercados fornecedores de plantas medicinais e fitoterápicos. Dados da OMS apontam que 80% da população mundial fazem uso de plantas medicinais e seus produtos, chegando a quase 92% entre os brasileiros (MARTINS e COSTA, 2016). Para Alves *et al* (2016), a comercialização de plantas medicinais é discutida no Brasil e no mundo. Trata-se de práticas tradicionais, culturais e econômicas disseminada por raizeiros comerciantes de feiras livres. De acordo com os autores, os raizeiros desempenham um papel socioeconômico importante nas cidades, retratando a diversidade enraizada na cultura Nordestina, cultivando uma grande variedade de plantas em suas residências, nos seus quintais, varandas e até em seus sítios, o que marca a tradicional medicina popular. Quem não tem o hábito de cultivar pode procurar nas feiras de frutas e legumes essas plantas tradicionais da medicina popular, o que não é diferente como podemos verificar na feira livre de Cajazeiras-PB (Figura 3).



**Figura 3** - Venda de Ervas Medicinais na Feira Livre de Cajazeiras-PB.



Fonte: da própria pesquisa, 2020.

### **3.1 Interações entre plantas medicinais e medicamentos**

De acordo com Carneiro e Comarella (2016), interações medicamentosas referem-se às respostas farmacológicas que alteram a ação de um ou mais medicamentos. O uso de plantas medicinais na forma de chás, in natura ou cápsulas, é cada vez mais habitual. Por ser de origem natural e muito difundida na mídia, causa na população principalmente entre os mais idosos uma falsa sensação de segurança. Para as autoras, a segurança da terapêutica é de grande importância, havendo a necessidade de estudos toxicológicos, farmacocinéticos e clínicos para evitar as possíveis reações adversas, bem como um controle na qualidade, eficácia e segurança do tratamento. O uso de forma inadequada de qualquer planta medicinal em forma de fitoterápico, mesmo de baixa toxicidade, pode levar a sérias consequências caso o paciente apresente fatores de risco, como contraindicações ou uso de outros medicamentos (MAIA *et al.*, 2011).

## **4. MORINGA OLEÍFERA LAM**

A *Moringa oleífera Lam* (Figura 4), tem sido utilizada como um produto terapêutico natural há muitos anos. Dentre as mais diversas espécies vegetais com propriedade antimicrobiana, destaca-se por apresentar valor econômico e medicinal de grande importância; é uma das espécies mais cultivadas da família Moringaceae. É altamente

valorizada desde tempos longínquos por causa de suas amplas propriedades. Apresentando atividades anti-inflamatórias, anticariogênicas, antissépticas, antioxidantes, bactericidas, bacteriostáticas e cicatrizantes suas ações farmacológicas e propriedades medicinais combatem a anemia, ansiedade, asma, cravos, impurezas no sangue, bronquite, catarro, congestão no peito, cólera, conjuntivite, tosse, diarreia, infecções oculares e auditivas, febre, hipertensão, dores articulares, escorbuto, deficiência de sêmen, dores de cabeça e tuberculose, a *Moringa oleífera* é de grande importância medicinal e nutricional (MISHRA *et al*, 2011; SOUSA *et al.*, 2014; ALMEIDA, 2018).

**Figura 4** - *Moringa oleífera* Lam. UFCG Campus Cajazeiras.



**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

De acordo com Mishra *et al* (2011), a avaliação de vários produtos vegetais leva à descoberta de medicamentos mais novos e recentes para o tratamento de várias doenças. A *Moringa oleífera* é uma dessas plantas de elevado valor medicinal. Pertencente à família *Moringaceae*, de crescimento rápido, propaga facilmente, sempre verde e que pode chegar a 12 m de altura (RANGEL *et al.*, 2010).

#### **4.1 Taxionomia e posição sistemática da *Moringa oleífera* Lam**

Segundo Bicudo (2004), a taxionomia é a ciência da identificação, necessária e imprescindível, no tocante a uma profunda análise, efetuando a síntese deste conhecimento

para chegar ao nome da espécie, do gênero ou do que for, apresentada nos estudos de Almeida (2018), representando a posição sistemática (figura 5).

**Figura 5** – Classificação Taxionômica da *Moringa oleífera* Lam.

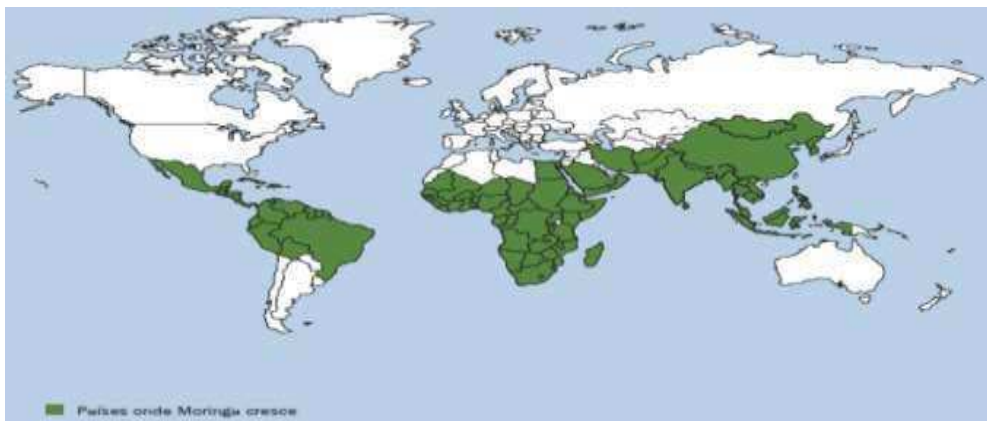
Reino: Plantae  
Sub-Reino: Tracheobionta  
Super Divisão: Spermatophyta  
Divisão: Magnoliophyta  
Classe: Eudicots (Magnoliopsida)  
Subclasse: Rosids (Dilleniidae)  
Ordem: Brassicales (Capparales)  
Família: Moringaceae  
Gênero: Moringa  
Espécie: *Moringa oleífera* Lam.

Fonte: ALMEIDA (2018).

#### 4.2 *Moringa oleífera* Lam e sua origem botânica

A *Moringa oleífera* é uma planta nativa originária do Nordeste e Norte da Índia, de porte arbóreo, introduzida no Brasil por volta de 1950, sendo atualmente encontrada em vários países (Figura 6). No Brasil, a espécie se adaptou especialmente à região Nordeste, em virtude de suas características, como pouca exigência hídrica e nutricional, sendo tolerante à seca, e devido suas propriedades medicinais é considerada um “milagre da natureza”, não resistentes a climas de temperaturas muito frias (ALMEIDA, 2018; CALDEIRA, 2012; MOREIRA, 2016).

**Figura 6** – Distribuição geográfica da *Moringa oleífera* Lam.



Fonte: ALMEIDA (2018).

Segundo Henriques *et al.* (2014), quando implantada no Brasil, a *Moringa oleífera* teve como destino a região Nordeste, especificamente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará. Plantada ornamentalmente ficou conhecida popularmente como “quiabo-de-quina” ou “lírio branco” ou simplesmente *Moringa oleífera*.

Há no Nordeste brasileiro vários trabalhos que divulgam os benefícios da *Moringa oleífera* para saúde, um deles é a “*Moringa oleífera*, a Semente da Vida” da Fundação Educacional Deusmar Queirós no Ceará (SILVA, 2013). De acordo com Nogueira *et al.* (2016) apud SILVA (2012), a *Moringa oleífera* atualmente é encontrada nos estados do Rio Grande do Norte, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná conforme trabalhos apresentados no Encontro Nacional de *Moringa oleífera* (ENAM). Esta ampla distribuição é confirmada pelo site da EMBRAPA Pantanal em sua biblioteca virtual.

#### 4.3 Maturação fisiológica das sementes de *Moringa oleífera* Lam

Em estudo realizado por Agustini *et al.* (2015), procurou-se analisar a maturidade fisiológica das sementes de *Moringa oleífera* para caracterizar a melhor época de colheita dos frutos. Usando como base o catálogo de cores de Munsell (1976), que classifica as vagens de *Moringa oleífera* visualmente de acordo com a coloração do epicarpo representativos dos estádios de maturação (figura 7), Agustini *et al.*, (2015) enfatizam que a coloração dos frutos determina a maturidade fisiológica das sementes e podem ser usadas como parâmetro. Segundo os autores, a maturidade fisiológica das sementes foi atingida no estágio 4 de maturação, com maior acúmulo de matéria seca (95,89g), baixo teor de água (42,74%) e alto índice de velocidade de germinação.

**Figura 7** – Catálogo de cores de Munsell (1976), maturação fisiológica das sementes da *Moringa oleífera*.

Estádio de maturação	Coloração do epicarpo	Caracterização visual	Munsell*
1		Verde (V)	5GY 5/4
2		Marrom claro com manchas verdes (MV)	7,5GY 5/4
3		Marrom claro (MC)	2,5Y 6/4
4		Marrom escuro (ME)	7,5YR 5/4

**Fonte:** AGUSTINI *et al.*, (2015)

#### 4.4 Valor nutricional da *Moringa oleífera* Lam

De acordo com Almeida (2018), em estudos etnobotânicos é apontado o consumo humano de *Moringa oleífera* como uma das principais razões desta planta ter se espalhado por vários países. Segundo a autora, a leguminosa tem sido consumida como alta fonte de proteína digeríveis ricas em cálcio, ferro e vitamina C em que, por conter elementos nutricionais essenciais vitais para seres humanos e animais, sua proteína possui qualidade que chega a ser superior do que é encontrado em leites e ovos, sendo assim, uma opção de fonte proteica vegetal conforme podemos observar na figura 8 (ANWAR *et al.*, 2007; KASOLO *et al.*, 2010; DALEI, 2016; DHAKAR, 2011).

**Figura 8** – Composição nutricional das folhas secas em pó da *Moringa oleífera*.

Valor nutricional por 100 g	Valores
<b>Nutrientes</b>	
Água (%)	7,5
Proteínas (g)	27,1
Lípidos (g)	2,3
Hidratos de Carbono (g)	38,2
Fibra (g)	19,2
Calorias (Kcal)	205
<b>Minerais</b>	
Cálcio (mg)	2003
Magnésio (mg)	368
Fósforo (mg)	204
Potássio (mg)	1324
Ferro (mg)	28,2
Sódio (mg)	870
<b>Vitaminas</b>	
Vitamina A - Beta caroteno (mg)	16,3
Vitamina B1 - tiamina (mg)	2,64
Vitamina B2 - riboflavina (mg)	20,5
Vitamina B3 - ácido nicotínico (mg)	8,2
Vitamina C - ácido ascórbico (mg)	17,3
Vitamina E - acetato de tocoferol (mg)	113
<b>Aminoácidos essenciais</b>	
Arginina (g/16gN)	1,33%
Histidina (g/16gN)	0,61%
Lisina (g/16gN)	1,32%
Triptofano (g/16gN)	0,43%
Fenilalanina (g/16gN)	1,39%
Metionina (g/16gN)	0,35%
Treonina (g/16gN)	1,19%
Leucina (g/16gN)	1,95%
Isoleucina (g/16gN)	0,83%
Valina (g/16gN)	1,06%

Fonte: ZAKU *et al.*, (2015).

Segundo o estudo de Almeida (2018), as folhas de *Moringa oleífera* tem alto valor nutritivo, bem como as sementes e os frutos são ricos em minerais e vitaminas. As folhas passadas pelo processo de fervura têm o triplo de ferro biodisponível do que as cruas e a qualidade proteica das folhas é comparada à do leite e dos ovos. Cada 100 gramas de folhas secas contêm no mínimo duas vezes mais proteína que o leite e metade da proteína do ovo; possui mais ferro que a carne de vaca e o valor do cálcio encontrado é quatro vezes maior que no leite. Possui quatro vezes mais vitamina A que a cenoura; as folhas chegam a possuir vitamina C em até sete vezes mais que a laranja, três vezes mais potássio que o encontrado em bananas (figura 7) (QURESHI E SOLANKI, 2015; ZAKU *et al.*, 2015).

Não muito diferente das folhas, as sementes de *Moringa oleífera*, objeto deste estudo, segundo Almeida (2018), podem ser cozinhadas para consumo. Conforme a autora, em cor amarelo-dourada, o óleo das sementes podem ser usado para cozinhar, temperar e fritar. Os ácidos gordos livres podem variar entre 0,5% a 3%, predominando em sua composição lipídica composta predominantemente, por triglicerídeos constituídos, 13% de ácidos gordos saturados e 82% de ácidos gordos insaturados, onde cerca de 70% é representado pelo ácido oleico.

#### **4.5 Atividade antimicrobiana da *Moringa oleífera* Lam**

Destacando a *Moringa oleífera* como uma espécie vegetal de propriedade antimicrobiana com alto valor econômico e medicinal, Sousa *et al* (2014), avaliaram em seu estudo a estabilidade da atividade antimicrobiana do extrato bruto aquoso da semente de *Moringa oleífera* em relação ao tempo/temperatura. O extrato foi depositado em placas de Petri contendo Agar Müeller Hinton, previamente semeadas com culturas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Considerando a sensibilidade das culturas para os halos de inibição maiores que 13 mm. De acordo com os autores a única bactéria susceptível foi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, não apresentando atividade para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Para os autores este estudo indica o potencial de aplicação do extrato da semente de *Moringa oleífera* como alternativa interessante para conservação de gêneros alimentícios, manipulados e comercializados em temperatura de refrigeração.

Peixoto *et al* (2011), realizaram um experimento utilizando as folhas da *Moringa oleífera* Lam. Com objetivo de avaliar o efeito antibacteriano de extratos aquosos e

etanólicos de folhas de *Moringa oleífera* sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e negativas. Os extratos foram testados contra *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Vibrio parahaemolyticus*, *Enterococcus faecalis* (ATCC29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Salmonella enteritidis* (IH) e *Aeromonas caviae*. De acordo com os autores, o método de difusão de disco modificado foi realizado para os testes de sensibilidade. Nos resultados obtidos para as linhagens *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. Enteritidis* (IH) foram resistentes a todos os tratamentos. O extrato mostrou-se eficiente contra *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *E. faecalis* e *A. Caviae*, o estudo mostrou um potencial promissor para extratos etanólicos e aquosos das folhas de *Moringa oleífera* como alternativa tratamento de infecções causadas pelas cepas testadas, com bom efeito antibacteriano em *S. aureus*, mas não em *Pseudomonas aeruginosa*.

## **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

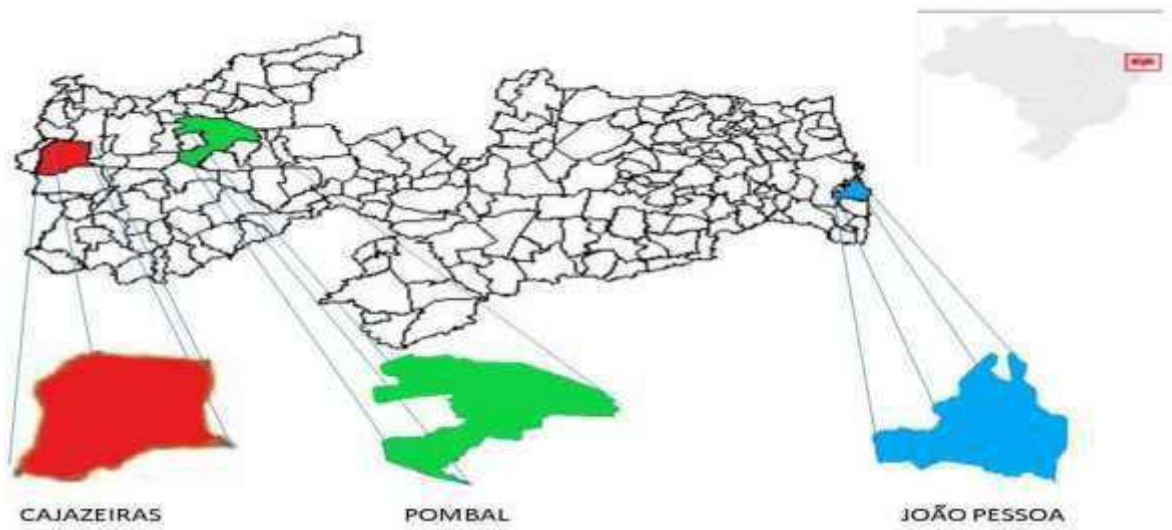
### **5.1 Tipo de pesquisa**

A pesquisa foi do tipo exploratória de procedimento técnico-experimental, com abordagem quantitativa. Para Prodanov (2013), este método constitui-se em submeter os objetos de estudo à influência de certas variáveis, em determinadas circunstâncias controladas e conhecidas pelo explorador, para analisar os resultados que a variável produz no objeto. Segundo o autor, nos três últimos séculos boa parte significativa dos conhecimentos obtidos se deve ao emprego do método experimental, e em ciências naturais este método pode ser considerado como excelência.

### **5.2 Local da pesquisa**

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Formação de Professores (CFP) da UFCG- *Campus* Cajazeiras-PB , *Campus* da UFCG de Pombal-PB e o Laboratório de Microbiologia do *Campus* João Pessoa da Universidade Federal da Paraíba – UFPB (figura 9), nestes campi foi possível o uso de uma ampla tecnologia para o desenvolvimento do estudo em seus laboratórios, com todo aparato de equipamentos, materiais e profissionais capacitados para auxiliarem na pesquisa.

**Figura 9** - Mapa ilustrativo da região onde foi realizada a pesquisa.

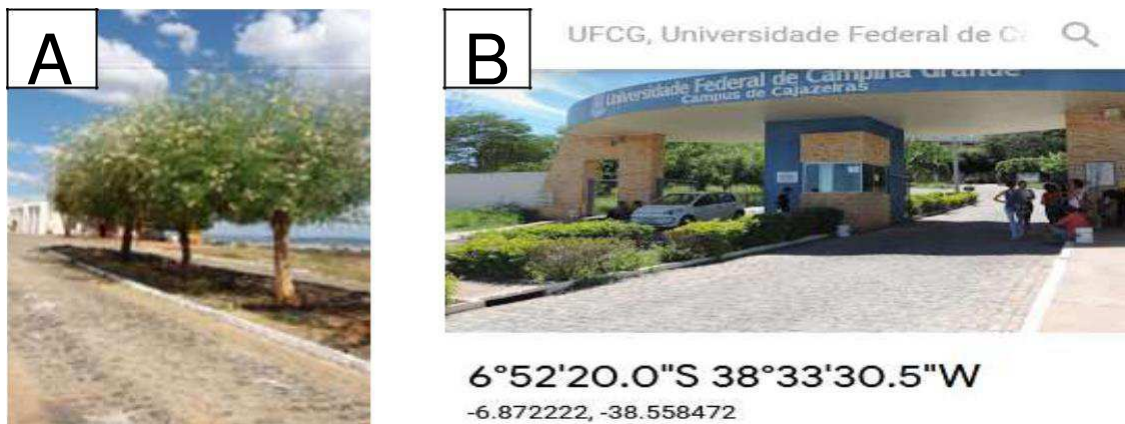


**Fonte:** Adaptado do Google (2018)

### 5.3 Obtenção do material botânico

A amostra das sementes de *Moringa oleífera* Lam foram obtidas em árvores próximo ao restaurante universitário (figura 10 A), no Centro de Formação de Professores (CFP) da UFCG- *Campus* Cajazeiras– PB, Região Nordeste do Brasil, latitude e longitude 6°52'20.0"S 38°33'30.5"W -6.872222, -38.558472 (figura 10 B).

**Figura 10 A e B** – Latitude e longitude do local de coleta das sementes de *Moringa oleífera*.



**Fonte:** Própria pesquisa e Google Maps, 2020.



A determinação da maturidade para colheita dos frutos de *Moringa oleifera* foi classificada visualmente de acordo com a coloração do epicarpo, representada pelos estádios de maturação do catálogo de cores de Munsell (1976), representado anteriormente na figura 7. Usamos como parâmetro o estadio 4 que determina a maturidade fisiológica das sementes segundo Agustini et al. (2015), (figura 11).

**Figura 11** - Amostra da vagem e sementes de *Moringa oleifera*.



Fonte: Da própria pesquisa, 2020.

#### 5.4 Preparação do extrato

O material botânico da semente da *Moringa oleifera* foi descascado (figura 13), em seguida pesada em balança de precisão (50g), colocada em embalagem estéril e em seguida encaminhada para o laboratório de microbiologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, Campus I em João Pessoa, Paraíba.

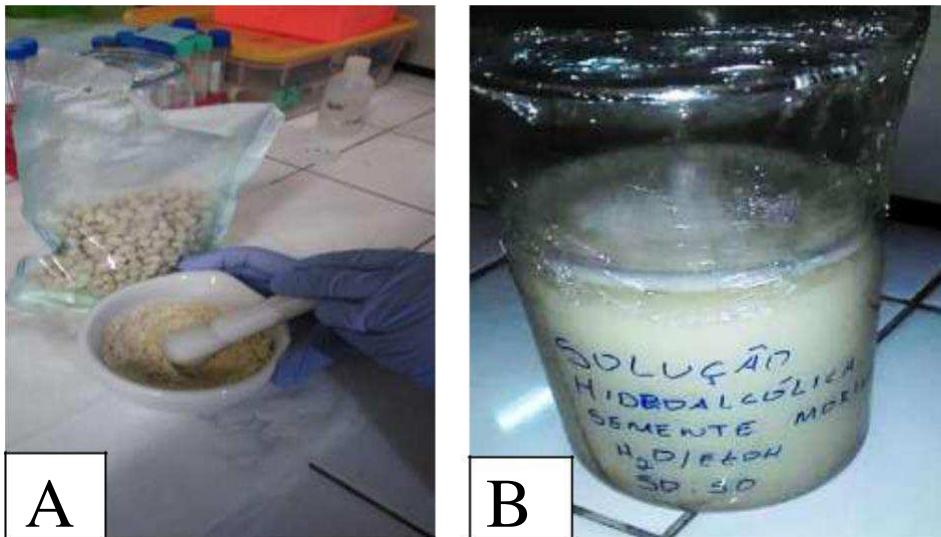
**Figura 12** - Amostra das sementes de *Moringa oleifera* após retirado a casca.



Fonte: Da própria pesquisa, 2020.

No laboratório de microbiologia da UFPB as sementes foram maceradas manualmente em cadim de porcelana (figura 13 A) em seguida colocadas em um recipiente de vidro transparente, embebida em 250mL de álcool absoluto e 250mL de água destilada na proporção 1:1, por um período de 72h (figura 13 B).

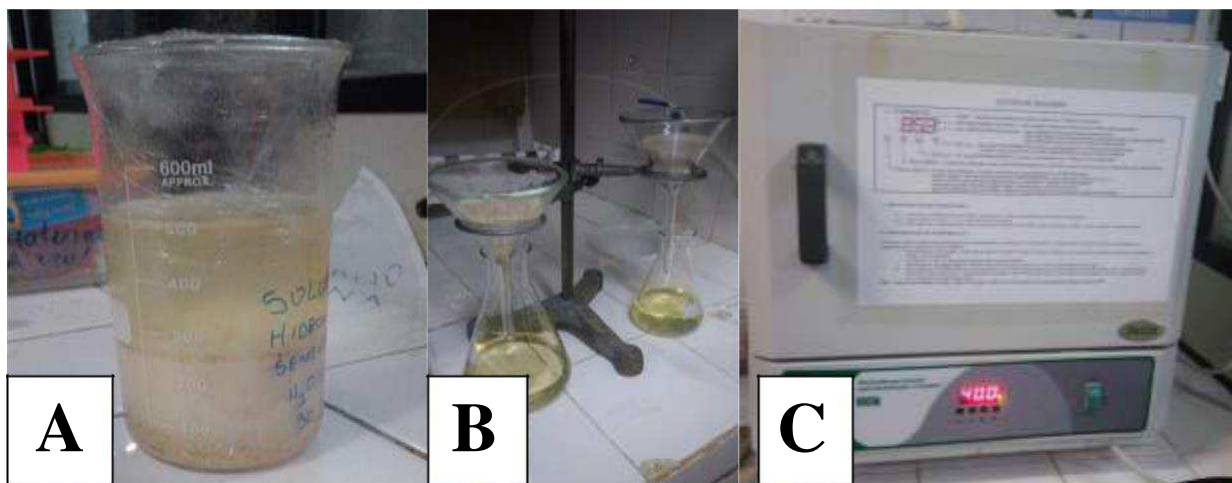
**Figuras 13 A e B** – Maceração das sementes de Moringa e solução hidroalcoólica 1:1



Fonte: Da própria pesquisa, 2020.

Passado as 72 horas (figura 14 A), a solução foi filtrada sendo retida a parte sólida (figura 14 B). A secagem do extrato da semente da *Moringa oleífera* foi realizada em uma estufa digital timer 200° da marca Sterilifer onde ocorreu o processo de esterilização e secagem (figura 14 C).

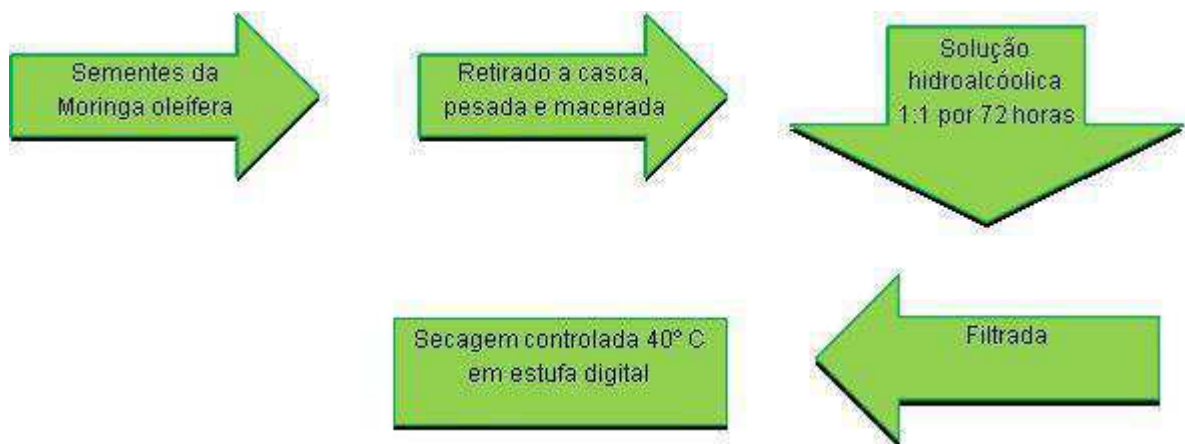
**Figura 14 A, B e C:** Solução hidroalcoólica 72h após, Filtragem e Estufa Digital à 40°C.



Fonte: Própria pesquisa

Na estufa, o processo ocorreu com as seguintes condições operacionais: a) controle temperatura de entrada: 40 °C; b) controle de temperatura de saída: 40 °C; c) O processo de secagem controlada consiste na mudança de um produto que se encontra no estado fluido para o estado sólido em forma de pó, o coeficiente efetivo de difusão e a energia de ativação da semente de *Moringa oleífera* é ajustado por modelos matemáticos, sendo a secagem à 40 °C que apresentou melhor ajuste aos dados experimentais (ALMEIDA *et al.*, 2015).

**Figura 15-** Fluxograma da preparação do extrato da *Moringa oleífera*.



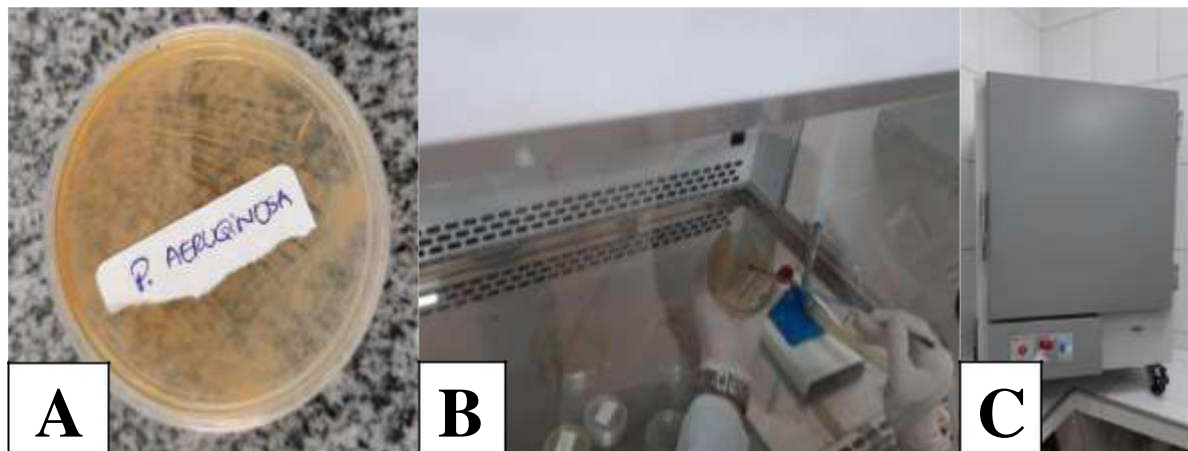
Fonte: Da própria pesquisa, 2020.

## 5.5 Determinação da atividade antibacteriana do extrato da *Moringa oleífera*

### 5.5.1 Microrganismos

A linhagem padrão utilizada foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) que está mantida no laboratório de Microbiologia do Centro de Formação de Professores (CFP/UFCG) (figura 16 A). Foi realizado a repicagem ou subcultivo da *Pseudomonas aeruginosa* (figura 16 B), colocada em estufa à 37 °C (figura 16 C) por 24 horas, de acordo com Sola *et al* (2012), a repicagem ou subcultivo é uma técnica antiga de conservação obtida para manter a viabilidade de microrganismos por um método simples e tradicional de manutenção de culturas em laboratórios. Após o repique os estoques de culturas foram mantidos em Agar Heart Infusion (HIA) e armazenados em refrigerador.

**Figura 16 A, B e C:** Linhagem ATCC, Subcultivo da *Pseudomonas* e Estufa a 37°C respectivamente.



**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

### 5.5.2 Preparo das soluções de extrato e antibióticos

Para avaliação da atividade moduladora da ação antibiótica do extrato da *Moringa oleífera* foram utilizados os antibióticos Benzetacil® (benzilpenicilina benzatina) 1.200.000 U/ml conteúdo 4 ml produzido pela Eurofarma Laboratórios S.A., o antibiótico Ciprofloxacino 2mg/ml bolsa de 200ml produzido pela Isofarma® Industrial Farmacêutica Ltda e o antibiótico Oxacilil (Oxacilina sódica) 500mg pó para solução injetável e frasco ampola de água estéril 2,7ml para diluição, o produto foi produzido pela Novafarma Indústria Farmacêutica Ltda. Em seguida, 0,5 µg do pó de extrato da *Moringa oleífera* foi diluído em 1ml de Tween 80 e 4 ml de água destilada em recipiente estéril.

**Figura 17 A, B e C:** Antibióticos, Extrato da *Moringa oleífera* em Pó e Extrato diluído.



**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

### 5.5.3 Concentração Inibitória Mínima

A concentração inibitória mínima (CIM  $\mu\text{g/mL}$ ), tanto do extrato de *Moringa oleífera* como dos antibióticos selecionados, foi determinada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI 100 %) através do método de micro diluição, numa suspensão de  $10^5$  (Unidade Formadora de Colônia) UFC/mL (para escala de Mcfarland 0,5) em concentração do extrato da *Moringa oleífera* 1024  $\mu\text{g/mL}$  padronizadas segundo CLSI (2015) diluídas sequencialmente pelo título 1:2 e incubadas em estufa com temperatura controlada à 37 °C por 24h (JAVADPOUR *et al.*, 1996) (quadro 1).

**Quadro 1:** Determinação da concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato da semente de *Moringa*.

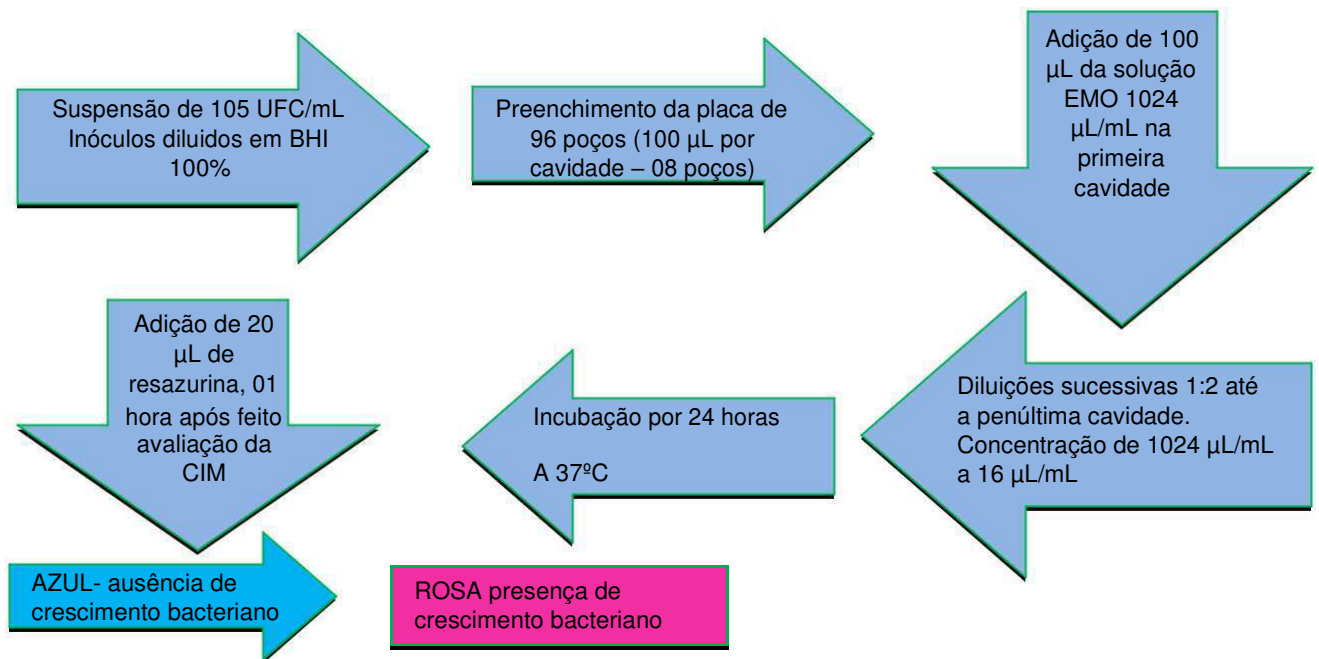
Benzilpenicilina			Ciprofloxacina			Oxacilina			Extrato da semente		
1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024	1024
512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512	512
256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256	256
128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128	128
64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN	CN

**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

Seguindo os ensaios, foi preparado o meio de distribuição em tubos estéreis utilizando 100  $\mu\text{L}$  do inóculo em 900  $\mu\text{L}$  do meio de cultura líquido BHI. Posteriormente, o conteúdo do tubo foi transferido para placa de microdiluição de 96 poços com tampa, perfazendo 09 poços em sentido horizontal, utilizando 100  $\mu\text{L}$  em cada poço. Em sentido vertical foi utilizado 100  $\mu\text{L}$  em cada poço, perfazendo 08 poços. Após essa etapa, a microdiluição das substâncias (extrato da *Moringa oleífera* e dos antibióticos Ciprofloxacino, Benzilpenicilina e Oxacilina) foi realizada sendo 100  $\mu\text{L}$  nesse meio até penúltima cavidade (1:1). Em concentrações de 1024  $\mu\text{g/mL}$  à 16  $\mu\text{g/mL}$ . Na última cavidade não foi adicionada microdiluição por ser o controle de crescimento. As placas foram incubadas por 24h em estufa de crescimento à 37 °C. Após este período foi realizada a leitura visualmente e observado se houve mudança de cor do meio, caracterizado pela

adição de 20  $\mu\text{L}$  de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). A leitura visual das placas teve como característica, a mudança de cor do meio de azul para rosa, indicando se houve presença de crescimento bacteriano, permanecendo em azul, indicaria a ausência deste crescimento (figura 18). Para avaliar as substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8 para PA-ATCC 27853.

**Figura 18-** Fluxograma da Concentração Inibitória Mínima (CIM).



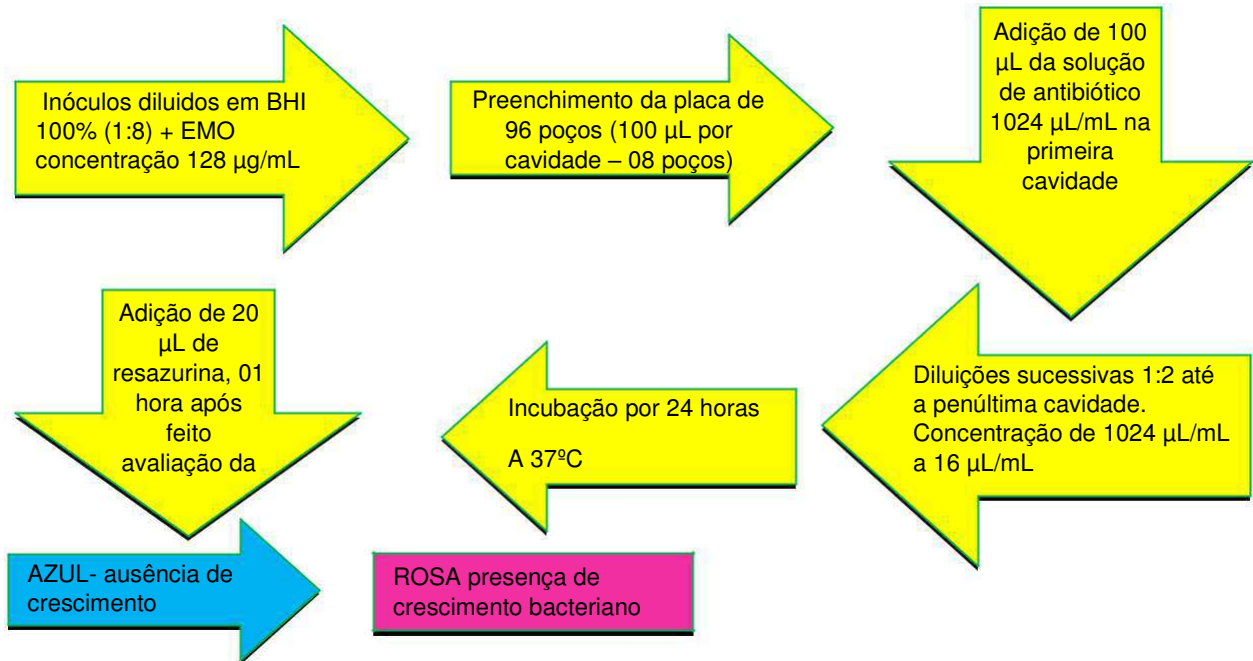
**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

#### 5.5.4 Modulação

Os testes para avaliar a atividade moduladora da ação de antibióticos em combinação com o extrato de *Moringa oleífera* foram realizados em triplicata. Em cada poço da placa de microdiluição foi colocado o extrato da *Moringa oleífera* em concentração subinibitória de forma constante e os antibióticos em concentrações decrescentes, iniciando em 1024  $\mu\text{g/mL}$ , diluídas sequencialmente 1:2 até 16  $\mu\text{g/mL}$ , sendo misturadas em caldo BHI 100%, preparado com água destilada estéril. Sendo adicionado em cada poço 100  $\mu\text{L}$  de caldo BHI 100% com 128  $\mu\text{g/mL}$  do extrato da *Moringa oleífera* e inóculo bacteriano ( $10^5$  UFC/mL). No primeiro poço, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de uma solução do antibiótico

com 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em diluição sequencial com título 1:2 nos demais poços. Após o procedimento, as placas foram incubadas a 37°C por 24h e o crescimento bacteriano foi avaliado visualmente pelo uso de 20  $\mu\text{L}$  resazurina (Figura 19).

**Figura 19:** Fluxograma da atividade moduladora



**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Rendimento do extrato da *Moringa oleífera*

A massa inicial do extrato da *Moringa oleífera* foi 50g, ao final na forma de pó obteve-se 26,523g, gerando um rendimento de 53,1%.

**Figura 20 :** Pó obtido do extrato hidroalcoólico da *Moringa oleífera*.

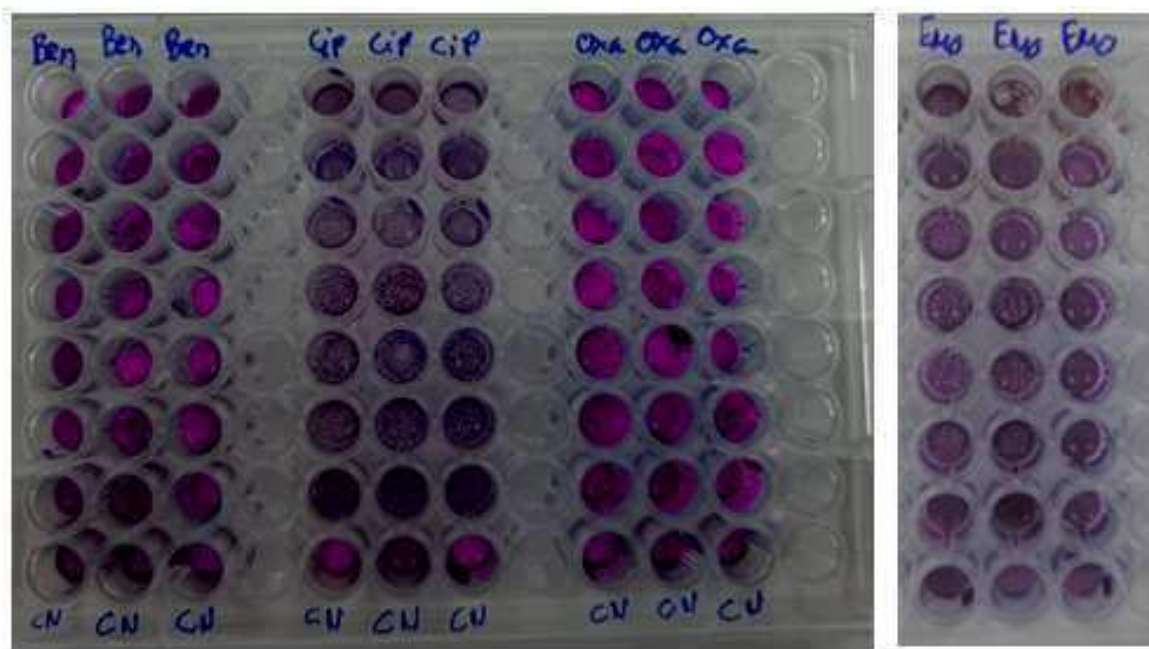


**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

## 6.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da *Moringa oleífera* e dos antibióticos

O teste por poço de difusão foi realizado conforme recomendações da CLSI (2015). Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima do extrato da *Moringa oleífera* revelaram um valor da CIM  $\geq 1024\mu\text{g/mL}$  para a *Pseudomonas aeruginosa*, indicando não haver atividade antimicrobiana clinicamente relevante, de forma isolada. Nota-se que nos poços identificados em ordem decrescente: 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CN (Controle Negativo); a coloração foi considerada como rosa pela visão a olho nu, constatando a presença de crescimento bacteriano em todos os poços, para todas as concentrações (figura 21).

**Figura 21:** Placas avaliadas na CIM, Antibióticos e EMO Extrato da *Moringa oleífera*.



**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

Em relação aos antibióticos usados, notou-se atividade antimicrobiana do Ciprofloxacino em todas as concentrações: 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CN (Controle Negativo); onde a coloração visualizada foi azul em todos os poços, exceto no CN, indicando inibição de crescimento bacteriano ou atividade antimicrobiana, do referido antibiótico (tabela 1). No experimento de Ferreira (2005) e Abreu (2018), o Ciprofloxacino demonstrou baixo valor para a CIM, corroborando com o que encontramos.



De acordo com Ferreira (2005), a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta um sério problema de resistência que cresce para muitos agentes antimicrobianos. Enquanto que, nos antibióticos Benzilpenicilina e Oxacilina, observou-se mudança da cor do meio de azul para rosa, indicando presença de crescimento bacteriano e a não atividade antimicrobiana das substâncias testadas em todos os poços, em todas as concentrações 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CN (Controle Negativo). As atividades do extrato da *Moringa oleífera* e dos antibióticos sobre *Pseudomonas aeruginosa* de forma isolada demonstraram que a Ciprofloxacino apresentou CIM a partir de 16 e as demais substâncias testadas poderão ou não obter resultados satisfatórios se forem testadas em nível >1024.

**Tabela 01.** Determinação da Concentração Inibitória Mínima diante de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

PRODUTOS TESTADOS	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) <b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b>
Extrato Moringa oleífera	>1024
Oxacilina	>1024
Benzilpenicilina	>1024
Ciprofloxacino	16

**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

Trabalhos utilizando esta metodologia do nosso experimento com o extrato hidroalcoólico de sementes de *Moringa oleífera* para enfrentamento a *Pseudomonas aeruginosa* não foram encontrados durante a pesquisa bibliográfica. Há estudos realizados anteriormente onde revelaram que componentes bioativos dos revestimentos de sementes de *Moringa oleífera* exibiram potencial antibiofilme contra os organismos de teste pertencentes a Gram-positivos, Gram negativo e levedura (ONSARE e ARORA, 2014). Segundo os autores, a atividade antimicrobiana de amplo espectro é encorajadora, devido sua classe de fitoconstituintes e sua não mutagenicidade e não citotoxicidade. Para o desenvolvimento e exploração do produto final eles salientam que estudos para elucidação da estrutura do composto ativo são necessárias para complementar produtos disponíveis no combate as ameaças do biofilme.

Em estudo realizado por Sousa *et al.* (2014), utilizando o extrato aquoso das sementes de *Moringa oleífera*, apresentou atividade antimicrobiana contra a bactéria

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; já contra a *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 não houve inibição do crescimento, o que ocorreu com nosso extrato hidroalcoólico, corroborando com nosso experimento.

Em pesquisa utilizando o extrato hidroalcoólico de sementes da *Moringa oleífera*, Silva *et al.* (2017), investigaram o efeito da atividade antibacteriana deste extrato sobre bactérias patogênicas humanas. Os resultados encontrados, segundo os autores, mostraram que o extrato hidroalcoólico de *Moringa oleífera* apresentou inibição do crescimento de todas as cepas de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em nosso estudo, a inibição do crescimento da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* com o extrato da *Moringa oleífera* de forma isolada não foi obtida em nenhuma das repetições da triplicata, contrapondo Silva *et al.* (2017). Vale salientar que nosso experimento foi utilizado a semente sem a casca.

Nesta pesquisa, não foi possível relatar os motivos pelos quais o EMO não inibiu o crescimento da bactéria, porém, Augustini *et al.* (2015), afirmam que a maturidade fisiológica da *Moringa oleífera* é caracterizada pela cor do epicarpo. A maturidade fisiológica das sementes é atingida no estágio 4 de maturação, com maior acúmulo de matéria seca (95,89g), menor teor de água (42,74%) e alto índice de velocidade de germinação. Segundo os autores, este parâmetro é usado para avaliar a maturação das sementes de *Moringa oleífera* e seria no estágio 4 onde a cor predominante é a marrom escuro, o que não ocorreu nesta pesquisa porque os frutos secavam ainda numa cor marrom claro, onde as vagens abriam-se naturalmente e as sementes caíam, sendo necessário realizar a coleta antes do contato com o solo evitando a contaminação das sementes. Possivelmente, possa ter ocorrido este fato pelo uso de diferentes estirpes (CARDOSO *et al.*, 2002). A alteração fitoquímica dos compostos da planta pode ser resultado das condições edafoclimáticas de acordo com Farooq *et al.*, (2007).

Em relação aos resultados da determinação do CIM dos antibióticos, Ciprofloxacino, Benzilpenicilina e Oxacilina, observou-se no primeiro antibiótico testado a inibição do crescimento bacteriano por meio da coloração azul em triplicata apresentada nos poços, em todas as concentrações. Nos antibióticos, Benzilpenicilina e Oxacilina, ocorreu crescimento bacteriano evidenciado pela alteração da coloração do meio de azul para rosa corroborando com a pesquisa de Abreu (2018).

### **6.3 Modulação**

Os resultados do teste de modulação demonstraram que o Ciprofloxacino (figura 19), associados à concentração subinibitória do EMO, não inibiu o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa*, (ATCC 27853). O resultado foi diferente da ação do antibiótico testado isoladamente. Em todas as concentrações dos antibióticos ( 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CN (Controle Negativo), houve crescimento bacteriano demonstrado pela coloração azul em todas as concentrações, demonstrando ação contrária à realizada na primeira etapa sobre esta cepa bacteriana.

No antibiótico Benzilpenicilina, associado a concentração subinibitória do EMO, não apresentou sinergismo, antagonismo e nem efeito bactericida, demonstrado anteriormente quando o antibiótico foi testado isoladamente. Há resistência bacteriana a este medicamento nas seguintes concentrações de 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16, foi observada através da mudança do meio de azul para rosado.

**Tabela 2.** Modulação do extrato de *Moringa oleífera* com antibióticos diante de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

<b>PRODUTOS TESTADOS</b>	<b>CIM (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
Oxacilina isolada	>1024
Oxacilina+EMO	16
Benzilpenicilina isolada	>1024
Benzilpenicilina+EMO	>1024
Ciprofloxacino isolada	16
Ciprofloxacino+EMO	>1024

**Legenda:** EMO – Extrato de *Moringa oleífera*

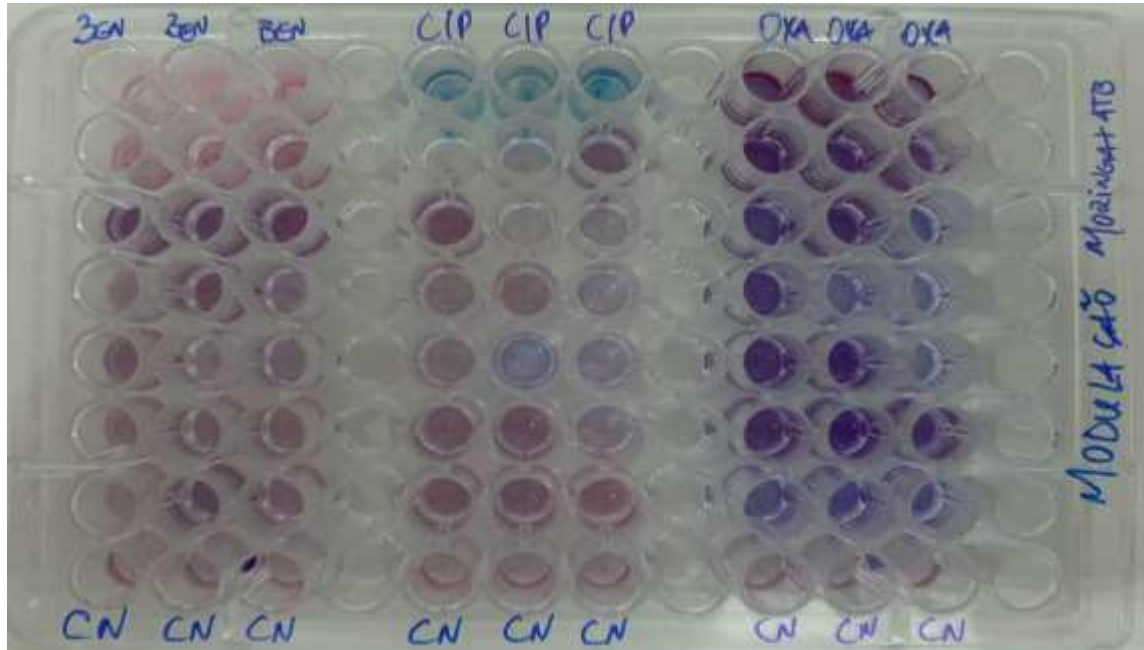
**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

No antibiótico Oxacilina associado à concentração subinibitória do EMO, apresentou uma alta porcentagem de redução da CIM, demonstrando que não houve crescimento bacteriano ao contrário do teste anterior quando o antibiótico foi testado isoladamente. Observamos que não houve desenvolvimento bacteriano nas concentrações de 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16. (Figura 22).

Percebemos que o inverso ocorreu com o antibiótico Ciprofloxacino ocorrendo um aumento na porcentagem da CIM de 16 para >1024 o que sugere uma interação medicamentosa do EMO ao efeito do antibiótico isolado conforme descrito na tabela 02,

sendo observado o crescimento bacteriano nas concentrações de 1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16. Permanecendo sem alterações o antibiótico Benzilpenicilina tanto isolado quanto associado ao EMO.

**Figura 22:** Placa avaliada no processo de modulação.



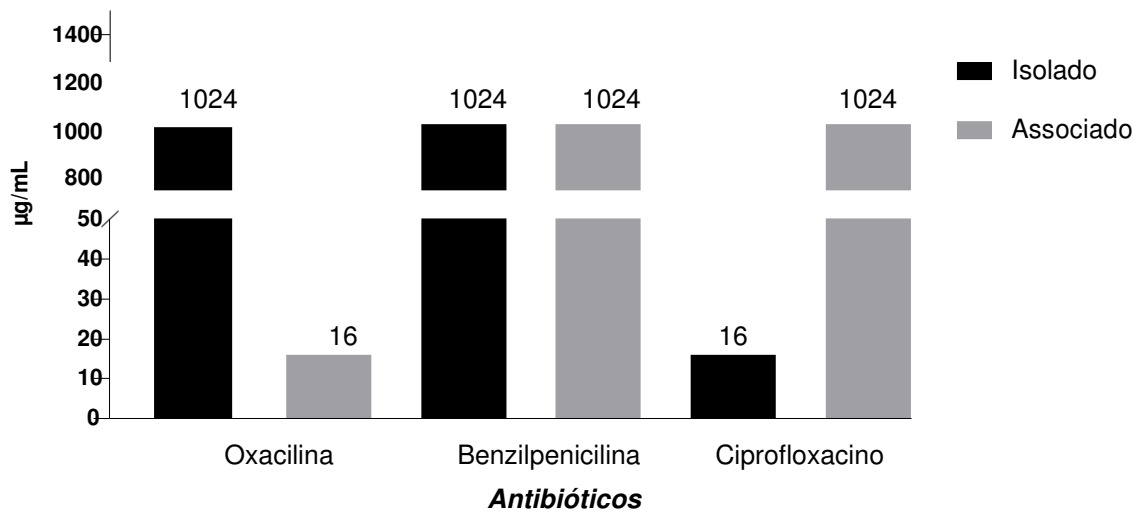
**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

**Quadro 2 :** Esquema de distribuição dos antibióticos em modulação para *P. aeruginosa* (ATCC 27853).

EMO + Benzilpenicilina				EMO + Ciprofloxacino				EMO + Oxacilina		
1024	1024	1024		1024	1024	1024		1024	1024	1024
512	512	512		512	512	512		512	512	512
256	256	256		256	256	256		256	256	256
128	128	128		128	128	128		128	128	128
64	64	64		64	64	64		64	64	64
32	32	32		32	32	32		32	32	32
16	16	16		16	16	16		16	16	16
CN	CN	CN		CN	CN	CN		CN	CN	CN

**Fonte:** Da própria pesquisa, 2020.

**Figura 23** : Gráfico da modulação do extrato de *Moringa oleífera* com antibióticos diante de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.



Fonte: Da própria pesquisa, 2020.

Quando usados isoladamente e associados ao EMO nos antibióticos Oxacilina e Ciprofloxacino ocorre uma inversão em relação a sua CIM, verificou-se uma inibição de crescimento bacteriano ao associar o antibiótico Oxacilina ao extrato da *Moringa oleífera*. E ocorreu o impedindo a ação do Ciprofloxacino ao associar a EMO, o que não ocorreu quando este antibiótico foi usado de forma isolada. A Benzilpenicilina isolada e/ou associada ao extrato da *Moringa oleífera* não inibiu o crescimento bacteriano da *Pseudomonas aeruginosa* (figura 23).

## 7 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcolólico das sementes sem casca da *Moringa oleífera* não possui atividade antibacteriana sobre a *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). A concentração inibitória do extrato da *Moringa oleífera* não possui atividade clinicamente relevante para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), pois o valor do CIM  $\geq 1024$  µg/mL, o que sugere identificar os componentes químicos da semente da *Moringa oleífera*, pois pode apresentar variação em virtude da sazonalidade, período de coleta, origens geográficas diferentes, presença de contaminantes, entre outros.

A principal descoberta desta pesquisa foi a interação medicamentosa da *Moringa oleífera* associada ao antibiótico Ciprofloxacino inibindo a ação deste sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

A *Moringa oleífera* é uma planta notável, de ampla atividade antimicrobiana, os fitoquímicos nela presente podem ser usados contra várias espécies de micro-organismos patogênicos. É importante conhecer as influências que a *Moringa oleífera* in natura, em cápsulas, pó ou chá possa exercer quando utilizada concomitantemente com os fármacos. Neste caso, deverá ser evitado seu consumo em associação ao antibiótico Ciprofloxacino, objeto desta pesquisa, até que sejam realizadas mais pesquisas no âmbito das interações medicamentosas para maiores detalhes.

## REFERÊNCIAS

ABREU, R. M. S. X. **Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha do semiárido paraibano sobre *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) - Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar. Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, 2018. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/3526> Acesso em: 25 out 2018.

ALMEIDA, M. S. M., **Moringa oleífera Lam., seus benefícios medicinais, nutricionais e avaliação de toxicidade**. Dissertação (upgrade ao Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra – Coimbra, 2018. Disponível em: [https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/84557/1/Monografia\\_MartaAlmeida.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/84557/1/Monografia_MartaAlmeida.pdf) Acesso em: 04 abr 2019.

ALMEIDA, F. N. C. *et al* Cinética da secagem da semente de *Moringa oleífera* Lam. XXXVII O Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados - ENEMP Outubro de 2015. Universidade Federal de São Carlos – SP, 2015. 1638-1647. 10.5151/ENEMP2015-SE-543. Disponível em: <<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/cintica-da-secagem-da-semente-de-moringa-oleifera-lam-20773>> Acesso em: 21 abr 2019.

ALVES, C. A. B. *et al*. Comercialização de plantas medicinais: um estudo etnobotânico na feira livre do município de Guarabira, Paraíba, nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, 19 dez. 2016. Disponível em: <<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:obNTKiQLiFkJ:https://periodicos.ufpb.br/ojs/index.php/gaia/article/view/33236+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br&client=firefox-b-d>> Acesso em: 15 mar 2019.

AUGUSTINI, M. A. B. *et al*. Maturidade fisiológica de sementes de *Moringa oleífera* (Lam). **Revista Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 8, n. 3, p. 267-278, 2015. Disponível em:< <http://periodicos.iftm.edu.br/index.php/inova/article/view/4>> Acesso em: 12 abr 2019.

ARORA, D. S.; ONSARE, J. G.; KAUR, H. - Bioprospecting of *Moringa* ( Moringaceae ): Microbiological Perspective. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. ISSN 2278-4136. 1:6 (2013) 193–215. Disponível em:< <http://www.phytojournal.com/vol1Issue6/15.html>> Acesso em: 20 abr 2019.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. H. Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17089328/>> Acesso em: 20 abr 2019.

BICUDO, C. E. M. Taxonomia. Biota Neotrop., Campinas, v. 4, n. 1, p. I-II, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-06032004000100001&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-06032004000100001&lng=en&nrm=iso)>. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032004000100001>. Acesso em: 23 Ago 2019.

BUCIOR, I. *et al.* Pseudomonas aeruginosa pig and flagella mediated distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. **PLoS Pathogens**. v. 4, p.1-18, 2012. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Pseudomonas-aeruginosa-Pili-and-Flagella-Mediate-at-Bucior-Pielage/a595395852878e5742437a19f5d2698a55c51c6d>> Acesso em: 23 abr 2019.

CALDEIRA, N. C. A. **Avaliação da Moringa oleifera Lam para remoção de dureza de águas**. Montes Claros: Universidade Federal de Minas Gerais, 2012. (Monografia de graduação). Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/BUBD-A2CJJQ>> Acesso em: 04 abr 2019.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.S.P.; ZANATTA, G.F. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas de Escherichia coli de origem aviária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, n.2, p.1-5, 2002. Disponível em: <[http://projetos.extras.ufg.br/conpeex/2009/artigos/pibic\\_pivic/pivic.pdf](http://projetos.extras.ufg.br/conpeex/2009/artigos/pibic_pivic/pivic.pdf)> Acesso em: 23 mai 2019.

CARNEIRO, A.N.C.; COMARELLA, L., Principais interações entre plantas medicinais e medicamentos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, Paraná .vol. 9, n.5 | jan – jun - 2016. Disponível em: <<https://www.uninter.com/revistasaude/index.php/.../article/download/.../305>> Acesso em: 23 jul 2019.

COAN, M. C.; MATIAS, T. A utilização das plantas medicinais pela comunidade indígena de Ventarra Alta- RS. **Instituto de Desenvolvimento Educacional do Alto Uruguai - IDEAU** Vol. 8 Nº 18 - Julho - Dezembro 2013 Semestral ISSN: 1809-6220. Disponível em: <https://docplayer.com.br/7857193-A-utilizacao-das-plantas-medicinais-pela-comunidade-indigena-de-ventarra-alta-rs.html>. Acesso em 23 mar 2019.

COOGAN, K. A.; WOLFGANG, M.C. Global Regulatory Pathways and Cross-talk Control *Pseudomonas aeruginosa* Environmental Lifestyle and virulence Phenotype. **Curr Issues Mol Biol**. v. 14, p. 47-70, 2012.

CIOFU, O. *et al.*, Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium. Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. **Microbiology**, v. 154, p. 103-113, 2008.

CUNHA, A. P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia**. Disponível em: <<http://www.antoniopcunha.com.sapo.pt/>>. Acesso em: 08 nov 2019.

CLSI. M07-A10—Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; **Approved Standard**—Tenth Edition; Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

DHAKAR, R. C. *et al.* Moringa: the herbal gold to combat malnutrition. **Chronicles of Young Scientists**, v. 2, n. 3, p. 119-121, 2011.

DALEI, J. *et al.* - Review on nutritional and pharmacological potencies of Moringa oleifera. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**. 3:1 (2016) 150–155.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, n.7, 2006. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_05\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf)>.

DI STASI, L.C. **Plantas Mediciniais**: verdades e mentiras - o que os usuários e os profissionais da saúde precisam saber. São Paulo: UNESP, 2007.

FREITAS, A. D. **Estudo de atributos de virulência e resistência a antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa***. Tese Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Faculdade de Ciências médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

FAROOQ, A. *et al.* Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v.21, n.1, p.17–25, 2007.

FERREIRA, C.C. *et al.* **Utilização de moringa oleífera em preparação de hambúrguer de grão de bico para dieta vegana**. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos 24 a 27 de outubro de 2016. FAURGS – GRAMADO/RS, 2016.

FERREIRA, L.L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação Mestrado em medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 114 p. 2005.

FUENTEFRIA, D. B. *et al.* **Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related?** **J Environ Manage.** 2011;92(1):250-5. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.09.001>> Acesso em: 16 jun 2019.

GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. W. regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory in *Pseudomonas aeruginosa*. **Rev microbial.** v. 33, p. 279-94, 2009.

HENRIQUES, J. A. *et al.* **Potencial de uso da Moringa Oleífera Lamarck na Clarificação de Água para Abastecimento em Comunidades Difusas de Áreas Semiáridas.** p. 76–83, 2014. ISSN Impresso 1808-4524 / ISSN Eletrônico: 2176-9478 Disponível em: <<http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/handle/123456789/416>> Acesso em: 25 jan 2019.



JÁCOME, P. R. L. A. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes internados em hospitais de Recife-PE.** Dissertação Mestrado em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/7089> acesso em 23 de mar de 2019.

JAVADPOUR, M. M. *et al.* De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry.** v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

KASOLO, J. N. *et al.* Phytochemicals and uses of *Moringa oleífera* leaves in Ugandan rural communities. **Journal of Medicinal Plants Research,** v. 4, n. 9, p. 753-757, 2010.

KAIHAMI, G. H. **Novos reguladores de resposta envolvidos na virulência de *Pseudomonas aeruginosa*.** 2018. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/T.46.2018.tde-20072018-084306. Acesso em: 2019-09-24.

KORCZOVEI, S. R. M.; ROMAGNOLO, M. B. **Plantas medicinais:** valorização e preservação do conhecimento popular associado ao conhecimento científico. Os desafios da escola pública paranaense na perspectiva do professor PDE. 2013. Disponível em: <[www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/.../cadernospde/pdebusca/...pde/.../2013\\_uem\\_cien\\_artigo\\_silvia\\_raquel\\_martini\\_korczovei.pdf](http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/.../cadernospde/pdebusca/...pde/.../2013_uem_cien_artigo_silvia_raquel_martini_korczovei.pdf)> Acesso em: 21 mai 2019.

KONEMAN, E.W. *et al.* Diagnóstico Microbiológico. **Texto e Atlas Colorido** - 6ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ; 2008.

KOUL, B.; CHASE, N. *Moringa oleifera* Lam.: panacea to several maladies. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.** ISSN 0975-7384.7:6 (2015) 687–707

LALEYE, F. *et al.* - Etude bibliographique de trois plantes antidiabétiques de la flore béninoise : *Khaya senegalensis* (Desr) A . Juss (Meliaceae), *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) et *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae) Bibliographic study of three antidiabetic. **Internacional Journal of Biological and Chemical Sciences.** 9:5 (2015) 2682–2700

LAU, G.W.; HASSETT, D. J.; BRITIGAN, B. E. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. **Trends in Microbiology.** v.13, p. 389-97, 2005.

LOUREIRO, R. J. *et al.*, O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev Port Saúde Púb.** 2016; 34(1):77-84.

LORENZI, H.; MATOS, A. **Plantas medicinais no Brasil:** nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p. 541-542.

MAIA, L. F. *et al.* Plantas medicinais e hipertensão. **Farmácia Revista.**, Fev-Mar. 2011, p 24-25.

MARTINS, E. S. S.; COSTA, J.C. Importância Relativa das Plantas Medicinais Comercializadas nas Feiras dos Municípios de Paulo Afonso - Bahia, Delmiro Gouveia -

Alagoas e Petrolândia - Pernambuco, Brasil. **Opará: Etnicidades**, Movimentos Sociais e Educação, v. 4, n. 5, p. 63-80, 2016.

MISHRA, G. *et al.* Traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties of Moringa oleifera plant: An overview. **Der Pharmacia Lettre**, v. 3, n. 2, p. 141-164, 2011.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Local Markets and Medicinal Plant Commerce: A Review with Emphasis on Brazil. **Economic Botany**, 64(4): 2010. P.352-356.

MOREIRA, C.P., **Moringa Oleifera: a Árvore da Vida**. VIII Semana de Iniciação Científica FJN – Faculdade de Juazeiro do Norte – CE. 2016. ISSN: 2316-2678 Disponível em: <<http://www.fjn.edu.br/sic2016/app/aprovados/article.php?uid=125&aid=289>> Acesso em: 11 fev 2019.

MURRAY, P.R. Laboratory Procedures for Epidemiologic Analysis. In: **Manual of Clinical Microbiology** 6th ed., 1995.

NASCIMENTO, E. A. *et al.* Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n.3, p.379-386, 2008.

NOLLA, D.; SEVERO, B.M.A.; MIGOTT, A.M.B.M. **Plantas Medicinais**. 2 ed. Passo Fundo: UPF, 2005.

OLIVEIRA, H. M.; SILVA, C. P. R.; LACERDA, R. A. Policies for control and prevention of infections related to healthcare assistance in Brazil: a conceptual analysis. **Rev Esc Enferm USP**. 2016;50(3):502-508. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-623420160000400018>

OLIVEIRA, L. S. *et al.* Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil - Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos. **Revista Científica Internacional**, v.4, n.17, p.54-74, 2011.

PEIXOTO, J. R. O. *et al.*, In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** (2011), p. 201-204 Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60069-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60069-2)> Acesso em 20 mar 2019.

PINHATI, F. R. *et al.* . Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 37, n. 8, p. 1269-1274, 2014 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-0422014000800002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-0422014000800002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 18 nov. 2019. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140221>.

PRODANOV, C. C.; FREITAS, E. C. **Metodologia do trabalho científico: Métodos e Técnicas da Pesquisa e do Trabalho Acadêmico**. 2ª. ed. Novo Hamburgo: Feevale, 2013, p. 37.

QURESHI, S.; SOLANKI, H. Moringa oleifera Lam., a wonder plant curing

multiple ailments, its phytochemistry and its pharmacological applications. **International Research Journal Of Chemistry (IRJC)**. 2845:2015) 64–71.

RANGEL, M. S. A. *et al.* **Propagação sexuada *in vitro* de *Moringa oleífera* (*Moringa oleífera* Lam).** EMBRAPA (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento) - Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE, vol. 39, p. 17, 2010.

RIVAS, K. A. C., *et al.*, Susceptibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua, Maracaibo, estado Zulia. Unidad de Investigación en Microbiología Ambiental (UIMA). Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología** 2015; 35:83-88

SADIKOT, R. T. *et al.*, Pathogen-host interactions in *pseudomonas aeruginosa*-infected endothelial cell. **Braz J Microbiolol.** v. 34, p. 25-6, 2005.

SADIKOT, R. T. *et al.*, Pathogen-host interactions in *pseudomonas aeruginosa*-infected endothelial cell. **Braz J Microbiolol.** v. 34, p. 25-6, 2005.

SILVA, C. M. R. *et al.* Elaboração de geleias light e diet a partir da casca do maracujá amarelo - jun.2011. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.** UTFPR Campus Ponta Grossa - Paraná - Brasil ISSN: 1981-3686 / v. 06, n. 02:, 2012.

SOUSA, J. P. G. *et al* Atividade Antimicrobiana do Extrato Bruto da *Moringa oleífera* Lam. em função do binômio tempo/temperatura. In: 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014. Blucher Food Science Proceedings, Anais MICROAL n. 1, v. 1. São Paulo, 2014. Disponível em: <<https://www.sbmicrobiologia.org.br/cdmicroal2014/resumos/R0389-1.html>> Acesso em : 23 mar 2019.

SOUSA, G.S. **Tratado descritivo do Brasil em 1587.** Disponível em: <<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/me003015.pdf>> Acesso em: 23 mar 2019.

SOLA, M. C. *et al.*, Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade enciclopédia Biosfera, **Centro Científico Conhecer**, v.8, n.14, Goiânia, 2012. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/biologicas/manutencao.pdf>> Acesso em: 13 mai 2019.

SILVA, B. B. **Caracterização da própolis vermelha:** sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica. Dissertação de Mestrado em Odontologia. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP. 2008. Disponível em: <[http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/288530/1/Bueno-Silva\\_Bruno\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/288530/1/Bueno-Silva_Bruno_M.pdf)> Acesso em 14 mar 2019.

SILVA, C. L. P. A. C. **Ação moluscicida de *Moringa oleífera oleífera* Lam. sobre o molusco *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) e efeitos ecotoxicológicos em organismos aquáticos não alvo.** 2013. Dissertação (Mestrado em

Biodiversidade e Saúde) – Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro/RJ, 2013.

TODAR, K., The mechanisms of Bacterial Pathogenicity. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**. 2009. Disponível em: <http://textbookbacteriology.net/themicrobialword/pathogenesis.html>. Acesso em 15 de março de 2019.

TRABULSI, L.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 8. ed., São Paulo: Atheneu, 2015.

VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI B. H. **Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerg Infect Dis.** 1998;4(4):551–560. doi:10.3201/eid0404.980405 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2640238/> Acesso em: 12 abr 2019.

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. *Pseudomonas aeruginosa*: Host defense in lung diseases. **Respirology**. v. 15, p.1037-56, 2010.

ZAKU, S. G. *et al.* - Moringa oleifera : An underutilized tree in Nigeria with amazing versatility : A review. **African Journal of Food Science**. ISSN 1996-0794. 9:9 (2015) 456–461. doi: 10.5897/AJFS2015.1346.