

INFORMAÇÕES GERAIS DO TRABALHO

Título do Trabalho: Avaliação da atividade biocida de extratos brutos de plantas medicinais nativas do Alto Paraopeba frente à biodeterioração da pedra sabão.

Autores: Almeida, W.I.F.; Padovani A.P.A.; Santana W.C.; Vital Á.A.S.; Vidal-Diniz A.T.

Palavras-chave: Biodeterioração. Biocida. Produtos naturais.

Campus: Congonhas.

Área do Conhecimento (CNPq): Ciências Biológicas, Agrárias e Zootecnia.

RESUMO:

O presente projeto foca seus estudos na atividade biocida de espécies *Annona crassiflora* e *Vernonia polysphaera* frente à biodeterioração da pedra sabão. Ambas as espécies são plantas medicinais nativas do Alto Paraopeba, região de Minas Gerais que abriga um dos maiores acervos de arte colonial brasileira, esculpida em pedra-sabão. A exposição dessas esculturas ao ar livre leva a desgastes, decorrentes de intensos processos climáticos, além da proliferação de fungos, líquens, algas e bactérias, que resulta na degradação denominada biodeterioração. Juntos, estes fatores contribuem significativamente para a deterioração dos monumentos e, conseqüentemente da memória colonial. Em relação às espécies vegetais em estudo, embora ambas possuam atividades antimicrobianas já descritas e uma alta concentração de metabólitos, não há na literatura trabalhos que apontem para o potencial biocida das mesmas. É em meio a esta conjuntura, que se propôs a utilização de extratos de plantas nativas da região como biocidas naturais, sendo uma possível alternativa para o biocida sintético p-hidroxibenzoato de etila (Aseptim A®), apontado por um grupo de pesquisadores do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (Iphan), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e da Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (Cetec-MG) como eficaz no controle da proliferação de microrganismos responsáveis pela deterioração do conjunto de estátuas do escultor Aleijadinho 12 conhecido como "Os Profetas". Tal biocida, apesar de eficaz, tem aplicação limitada em grandes superfícies como túmulos, obras de arte, calçadas e muros de pedra-sabão que ornamentam Congonhas e diversas cidades históricas do interior mineiro, por representar um elevado custo, além de potencial toxicidade ambiental e para o ser humano. Neste sentido, a utilização de extratos de plantas nativas da região como biocidas naturais seria de grande relevância econômica, ambiental, científica, histórica, social e cultural. O trabalho se encontra em execução no IFMG - Campus Congonhas e conta com a participação de quatro alunos do ensino médio. Até o momento, foram coletadas amostras de microrganismos em diversos elementos em pedra-sabão da cidade de Congonhas e foi realizado o cultivo dos mesmos em condições laboratoriais, as quais foram devidamente padronizadas. A etapa de coleta e preparo dos extratos etanólicos das espécies vegetais foi recentemente executada, para posterior avaliação de sua potencial atividade biocida, etapa final do projeto proposto. Comprovada tal atividade, este estudo pode contribuir para a preservação do patrimônio histórico mineiro, resultando em enorme benefício sociocultural para as gerações futuras. De qualquer maneira, caso tais espécies sejam isentas de atividade biocida, a estruturação e adequação das técnicas possibilitará a expansão dos estudos para outras espécies.

O estado de Minas Gerais reúne o mais representativo conjunto de arquitetura e arte do período colonial do Brasil, abrigando um grande número de cidades que cresceram e se desenvolveram a partir da valorização de seu passado (ÁGUEDA, 2005). Algumas cidades se destacam pelo agrupamento de obras que fazem parte do acervo histórico nacional, dentre elas Ouro Preto, São João Del Rei, Mariana e Congonhas. Nesta última se encontra o Santuário do Bom Jesus de Matosinhos, cuja construção se iniciou no século XVIII e traz em seu adro os 12 Profetas em pedra-sabão de Antônio Francisco Lisboa, o Aleijadinho. Por esta razão a cidade, que hoje sedia um dos câmpus do Instituto Federal de Minas Gerais, é Patrimônio da Humanidade, resultado da herança histórica deixada pelo conjunto de obras do artista, tombado em 1939, que atrai turistas de todo o mundo, impulsionando a economia local e valorizando a arte e cultura de Minas Gerais.

Tamanha riqueza requer adequada preservação, principalmente se considerada a exposição, por séculos, às diversas condições ambientais. Tal exposição leva a desgastes e degradação, como resultado de intempéries físicas, químicas e biológicas, isoladamente ou em conjunto, associadas ainda ao tipo de rocha, variações climáticas, à localização do monumento, seu estado de preservação e poluição (RESENDE, 1997; PAPIDA *et al.*, 2000; SCHEERER *et al.*, 2009). À degradação desencadeada por agentes biológicos denomina-se biodeterioração, definida como qualquer alteração indesejável nas características de um material, causada pela atividade metabólica de microrganismos (CANEVA, 1991). Os processos de biodeterioração em pedras nos monumentos históricos e esculturas alcançam desde prejuízos na aparência estética a mudança nas características físicas e químicas das estruturas (WARSCHEID *et al.*, 2000; RESENDE, 2008).

Os principais agentes biológicos envolvidos na biodeterioração em pedras são algas, bactérias, fungos e líquens, que formam filmes microbianos – ou biofilmes, em praticamente em todas as estruturas expostas às condições atmosféricas variadas podendo, além da alteração estética causada pela camada de microrganismos e seus produtos na superfície da pedra, modificar sua composição química e mineralógica original (GAYLARDE, 1997; RESENDE, 2008). A pedra-sabão, por sua composição, reúne as características propícias à biodeterioração, as quais, associadas a fatores ambientais favorecem o desenvolvimento de uma grande variedade de atividades metabólicas provenientes de microrganismos (SANTOS & CASTELO, 1994).

Na literatura são descritas diferentes substâncias empregadas no controle da biodeterioração de monumentos e construções em pedra, como enzimas, bactericidas, fungicidas, algacidas, tensoativos e sabões, taninos, gases e radiação (CANEVA, 1991; LOPES *et al.*, 2003; SCHEERER *et al.*, 2009). Independentemente do tipo de tratamento, é importante que o agente usado respeite as características físicas da estrutura original, evitando incompatibilidades funcionais, químicas e estéticas aos monumentos (GUPTA, 2011). Além disso, Warscheid *et al.* (2000) alertam que é crucial o desenvolvimento de etapas bem definidas para os métodos de restauração e conservação, os quais exigem uma colaboração interdisciplinar entre engenheiros, geólogos, químicos, biólogos e restauradores.

Desde a década de 90, pesquisadores do projeto IDEAS - *Investigations Into Devices Against Environmental Attack on Stones*, vêm avaliando o uso de diferentes biocidas na remoção de microrganismos da superfície em pedras dos monumentos históricos de Minas Gerais (BECKER *et al.*, 1994). Dentre as substâncias testadas na remoção dos líquens das esculturas dos profetas de Aleijadinho na Igreja Bom Jesus de Matosinhos, os melhores resultados foram obtidos com o produto comercial Asseptin A[®], cujo princípio ativo é o p-hidroxibenzoato de etila (RESENDE *et al.*, 2006). Já Navarro *et al.* (2013) observaram, em ensaios laboratoriais, a diminuição do crescimento e proliferação de microrganismos em blocos de pedra-sabão sobre os quais foram colocadas placas compostas dos metais cobre e zinco, sugerindo sua utilização como um agente biocida não invasivo.

Apesar de promissores, os estudos citados apresentam limitações, sejam elas de eficácia, econômicas, ambientais ou toxicológicas. Segundo Warscheid *et al.* (2000), o cobre vindo de placas de

bronze pode realmente reduzir a população microbiana, porém carece de efeito preventivo. Em relação aos biocidas comerciais empregados, apesar de estes apresentarem um espectro de atividade mais específico, sua aplicação pode representar um elevado custo quando se objetiva o tratamento de grandes superfícies, além de gerar uma discussão sobre o impacto ambiental, visto que são frequentemente de difícil degradação, persistindo no meio ambiente ou se acumulando em uma variedade de sistemas (GUIAMET *et al.* 2006). Neste sentido, Gupta (2011) e Guiamet *et al.* (2006) encorajam a realização de estudos com o intuito de se obter extratos de plantas medicinais que possam ser utilizados efetivamente nos monumentos como biocidas, uma vez que estes podem representar produtos biodegradáveis e, portanto, menos impactantes para o meio ambiente.

A região do Alto Paraopeba possui rica diversidade botânica, com espécies nativas que apresentam atividades bactericida e antifúngica descritas (SILVA, 2009; CORREIA, 2016) e, de acordo com Guiamet *et al.* (2006), espécies com significativa atividade antimicrobiana apresentam potencial atividade biocida. A revisão sistemática sobre as propriedades fungicida e/ou bactericida de plantas medicinais mineiras chama a atenção para duas espécies em potencial: *Annona crassiflora* e *Vernonia polysphaera*.

A primeira espécie, *Annona crassiflora*, é característica do cerrado brasileiro e conhecida como araticum, sendo utilizada tradicionalmente contra diarreia, reumatismo e infecções microbianas. Na espécie foram identificados acetogeninas com ações antimicrobianas e citotóxicas (BIBA *et al.*, 2014), alcaloides com propriedades antibacteriana e antiprotozoária (OLIANI, 2012) e compostos fenólicos antioxidantes (LUZIA & JORGE, 2013)

A espécie *Vernonia polysphaera*, por sua vez, pertence à família Asteraceae, é nativa da Mata Atlântica e é popularmente conhecida como assa-peixe. Tem sido utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças como bronquite, pneumonia e abscessos e possui atividade antifúngica demonstrada (SILVA, 2009). Recentemente, a atividade antimicrobiana na proteção contra fitopatógenos em folhas de café foi relatada para o óleo essencial de *Vernonia* sp, sendo identificados como constituintes químicos ativos triterpenóides, lactonas sesquiterpenica, alcaloides, cumarinas e flavonoides, especialmente cariofileno e germacreno (SILVA *et al.*, 2014).

Neste contexto, este projeto visa a avaliação do efeito dos extratos etanólicos brutos de plantas medicinais nativas da região do Alto Paraopeba no controle da população de fungos e bactérias que causam a biodeterioração em pedra sabão, visto que não há estudos que apontem o potencial biocida das espécies selecionadas, a despeito de suas atividades antimicrobianas descritas e altas concentrações de metabólitos.

METODOLOGIA:

- **Preparo dos meios de cultura**

Previamente ao preparo dos meios, todas as vidrarias e materiais foram esterilizados em autoclave, com vistas a garantir confiabilidade nos dados obtidos. O meio utilizado foi o Ágar Nutriente, na concentração de 28 g/litro. Cada placa foi preparada utilizando aproximadamente 20 ml de caldo esterilizado, e, após solidificação, o meio foi acondicionado em estufa de esterilização e secagem a 37° por 24h, para exclusão da presença de microrganismos contaminantes.

- **Coleta e cultivo dos microrganismos**

Para a coleta dos microrganismos, foram preparados *swabs* utilizando hastes de algodão inseridas em tubos de ensaio tampados, os quais foram esterilizados em autoclave. Foram, então, realizadas as coletas das amostras a partir de biofilmes em elementos de pedras-sabão em construções localizadas na cidade de Congonhas-MG, sendo coletadas 2 amostras de cada ponto escolhido. As amostras foram

obtidas na fachada da Igreja Matriz de Nossa Senhora da Conceição, na escultura do profeta que orna a entrada do prédio da prefeitura municipal e no adro e profetas do Santuário de Bom Jesus do Matosinhos. Em seguida, as amostras foram inoculadas nas placas previamente preparadas, por estriação dos swabs no meio de cultura. Após inoculação, as placas foram encubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 7 dias, permitindo então, a formação de colônias. Após o crescimento microbiano, foram diluídas amostras das diferentes colônias em salina estéril a 0,9%, obtendo suspensões microbianas com turbidez semelhante ao tubo da Escala Mac Farland que indica um inóculo de aproximadamente 6×10^6 UFC/ml. Após este procedimento, as suspensões foram inoculadas em novas placas com ágar nutriente e incubadas em estufa a 37°C, visando o isolamento das colônias, para posterior avaliação da atividade biocida dos extratos etanólicos das espécies vegetais em estudo.

Por fim, todos os meios de cultura, swabs e outros materiais utilizados foram autoclavados para a inativação correta dos microrganismos coletados, de maneira que não ocorra o descarte no meio ambiente.

- **Preparo do extrato etanólico das espécies vegetais**

Foi realizada a coleta das partes aéreas de *Annona crassiflora* e *Vernonia polysphaera*, as quais foram secas em estufa a 35°C. Após secagem, o material vegetal foi pulverizado em moinho de facas e seu extrato extraído por percolação com etanol à temperatura ambiente, utilizando percolador de vidro, até seu esgotamento. O solvente foi eliminado por evaporação sob pressão reduzida, utilizando-se evaporador rotativo acoplado a bomba de vácuo e, o resíduo obtido foi mantido sob vácuo para obtenção do extrato etanólico bruto.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

As coletas de microrganismos realizadas em diferentes locais permitiu uma padronização quanto ao procedimento adotado. A observação do crescimento dos microrganismos coletados em campo indicam que locais com baixa luminosidade e menor trânsito de pessoas e automóveis, aumentam consideravelmente a possibilidade de sucesso das coletas. Além disso, percebeu-se que essas devem ser realizadas em locais que não são lavados e higienizados com regularidade.

Foram observadas formações de diversas colônias, não identificadas axenicamente, mas consideradas satisfatórias para a verificação da potencial atividade biocida dos extratos. A próxima etapa do estudo, em execução, é a efetiva avaliação da atividade dos extratos das plantas na inibição do crescimento dos microrganismos nos meios selecionados. Sobre os microrganismos repicados em placas serão dispostos discos de papel de filtro *Whatman* impregnados com extratos etanólicos de *Annona crassiflora* e *Vernonia polysphaera*. As placas serão incubadas a 25°C durante cinco dias e, após este período, serão realizadas as leituras, baseadas na presença de halo inibitório do crescimento microbiano em volta do disco, sendo considerado na presença do halo, positivo e na sua ausência, negativo.



Figura 1: Coleta e cultivo dos microrganismos

CONCLUSÕES:

A padronização dos procedimentos de coleta e cultivo dos microrganismos, realizada até o momento, é de extrema importância, por se tratar de linha de pesquisa em implantação no IFMG – Campus Congonhas. Dado que as espécies *Annona crassiflora* e *Vernonia polysphaera* possuem atividade antimicrobiana descrita e alta concentração de metabólitos, espera-se as mesmas apresentem a atividade biocida pesquisada. De qualquer maneira, ainda que tal atividade não seja verificada para as espécies vegetais atualmente em estudo, extratos de outras plantas medicinais nativas da região do Alto Paraopeba serão pesquisados, almejando alternativas sustentáveis e ambientalmente seguras que possam ser compartilhadas com a comunidade, visando a preservação do acervo patrimonial histórico mineiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ÁGUEDA, M. L. Memórias e identidades em mudanças: a substituição dos profetas de Aleijadinho por réplicas em Congonhas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, 93p, 2005.

BECKER, T. W. ; KRUMBEIN, W. E. ; WARSCHEID, T. ; RESENDE, M. A. . Investigations Into Microbiology. In: Helmut K. Bianchi. (Org.). **Ideas- Investigations Into Devices Against Environmental Attack On Stones**. 1ed.Geesthacht, Alemanha: Gkss, V. 1, P. 147-190, 1994.

BIBA, V. S. et al., Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of Annonaceae family. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 3, p. 1595-1604, 2014.

CANEVA, G.; NUGARI, M. P.; SALVADORI, O. Biology in the conservation of works of art. Rome: **International Centre for the Study of the Preservation and Restauration of Cultural Property**, 1991.

CORREIA, A.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas do cerrado brasileiro sobre isolados clínicos de *Candida* spp. Tese de doutorado. Universidade de Brasília. 95 p., 2016.

GAYLARDE, C. MORTON, L. The importance of biofilms in microbial deterioration of constructional materials. **Revista de microbiologia**. Porto Alegre, v.28, p.221-229, 1997.

GUIAMET, P. S. et al. Natural products isolated from plants used in biodeterioration control. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 537-544, 2006.

GUPTA S. P; SHARMA K. Biodeterioration and preservation of Sita Devi Temple, Deorbija, Chhattisgarh, India. **International Journal of Conservation Science**, vol. 2, 2011.

LOPES, C.V.G.; DE CAMPOS CARVALHO, F. J. P.; KRIEGER, N. Biodeterioração: ataque de microrganismos a monumentos históricos. **Ciência Hoje**, v. 200, p. 34, 2003.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. Seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 231-235, 2013.

NAVARRO, D. B. S.; SANTOS, A. F. B.; RESENDE-STOIANOFF, M.A. . Efeito da ação biocida do cobre sobre monumentos históricos e pedra-sabão do estado de Minas Gerais. **In: II Simpósio Brasileiro de Patrimônio Geológico**, Belo Horizonte: UFMG, 2013.

OLIANI, J. Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro* dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo – USP, 228p. 2012.

PAPIDA, S., MURPHY, W., MAY, E. Enhancement of physical of building stones by microbial populations. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**, n-46, p. 305-317, 2000.

RESENDE, M. A. . Biodeterioração de monumentos históricos. In: Itamar Soares de Melo, João Lúcio de Azevedo. (Org.). **Microbiologia Ambiental**. 2ed.São Paulo: Hamburg Gráfica Editora, v. 01, p. 501-520, 2008.

RESENDE, M. A.. Biodeterioração de Monumentos Históricos. In: Itamar Soares de Melo; João Lúcio Azevedo. (Org.). **Microbiologia Ambiental**. 1ed.Sao Paulo, Brasil: Hamburg Gráfica Editora, v. 1, p. 335-356, 1997

RESENDE, M. A; BECKER, T.; WARSCHEID, T. Tratamento e controle das esculturas dos profetas da Igreja Bom Jesus de Matozinhos, Congonhas, MG, com biocida. **Projeto IDEAS**, CETEC, MG, 2006.

SANTOS, A. F. & CASTELLO BRANCO, H. D. Object identification. **In IDEAS: Investigation into Devices Against Attack on Stones**. Geestthacht: Gkss Fosrch, Geestthacht, GmH, p. 45-61, 1994.

SCHEERER, Stefanie; ORTEGA-MORALES, Otto; GAYLARDE, Christine. Microbial deterioration of stone monuments—an updated overview. **Advances in applied microbiology**, v. 66, p. 97-139, 2009.

SILVA, F. M. Potencial antifúngico de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 222 p, 2009.

SILVA, J. L. et al. Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 16, n. 3, p. 539-544, 2014.

UNESCO. Patrimônio mundial no Brasil. Brasília, UNESCO, Caixa Econômica Federal, 1989.

WARSCHEID, T, BRAAMS, J, et al. Biodeterioration of stone: a review. **Internacional Biodeterioration & Biodegradation**, Germany, v. 46, p.343-368, 2000.

Participação em Congressos, publicações e/ou pedidos de proteção intelectual:

14º SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Como forma de participação nas atividades de pesquisa, os alunos participaram da 14ª SNCT do IFMG Campus Congonhas, que contou com elaboração do *banner* e apresentação avaliada por um docente do Campus. Após a conclusão do evento, os alunos e a coordenadora do Projeto de Pesquisa receberam certificados de participação emitidos pela instituição.