

# Capítulo 1

## Potencial antibacteriano de extratos das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre *Escherichia coli*

Camila Ribeiro Rocha\*<sup>1</sup>; Roberta Torres Careli<sup>2</sup>; Camila Carolina de Sousa Silva<sup>3</sup>; Adriana Gonçalves Freitas<sup>3</sup>; Eduardo Robson Duarte<sup>2</sup>; Franciellen Morais-Costa<sup>4</sup>

### Resumo

Com o passar dos anos os microrganismos patogênicos estão desenvolvendo resistência aos antibióticos comumente utilizados e apresentam risco à saúde pública. Dessa forma, diversos estudos estão direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais que possam oferecer tratamento alternativo para o controle bacteriano. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial antimicrobiano de extratos aquosos e etanólicos das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb., coletadas em diferentes fases fenológicas da planta, sobre *Escherichia coli*. Os extratos foram caracterizados quimicamente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). A concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos extratos foram determinadas pelo método de macrodiluição em caldo. Os principais componentes identificados nos extratos foram os flavonoides. O valor da CIM encontrado para os extratos etanólicos das folhas do pequizeiro na frutificação e na floração, foi de 150 mg/mL e para o extrato aquoso da folha do pequizeiro na frutificação foi de 75 mg/mL. Não foi possível determinar o valor da CBM em nenhum dos extratos avaliados. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente a *E. coli*, contudo o estágio fenológico da planta não influenciou na ação dos extratos.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana. Extratos naturais. Pequizeiro.

### Introdução

*Escherichia coli* é um importante patógeno de origem alimentar e está dentre os maiores causadores de surtos no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). O controle de doenças

---

<sup>1</sup>Mestre em Ciência Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa

<sup>2</sup>Docente, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>3</sup>Engenheira de Alimentos, Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>4</sup>Doutora em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

\*Autor para correspondência: camilaribeirorochoa@yahoo.com.br

transmitidas por alimentos têm sido um desafio, e com o passar dos anos os microrganismos patogênicos estão desenvolvendo resistência aos antimicrobianos comumente utilizados e apresentam risco a saúde pública (YAP; YIAP; PING., 2014). Diante disso, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas e direcionadas à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, que possam oferecer tratamento alternativo para o controle bacteriano, com menor toxicidade e mais eficazes (MACHADO *et al.*, 2018; PINHO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Com uma estrutura química diferente dos antibióticos sintéticos, os compostos vegetais podem regular o metabolismo intermediário de patógenos, ativando ou bloqueando reações e síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN *et al.*, 2005). A busca por novas substâncias capazes de controlar o crescimento bacteriano é atualmente uma área de pesquisa essencial para garantir a segurança alimentar.

O Cerrado é um tipo de vegetação presente na América do Sul e nativo de mais de 10 mil espécies vegetais que contêm produtos naturais para fitoterapia. O *Caryocar brasiliense* Camb. (pequizeiro) é uma árvore frutífera nativa do Cerrado brasileiro, especificamente utilizado em cosméticos, na indústria de alimentos, e para fins medicinais (AMARAL *et al.*, 2014). As folhas de *C. brasiliense* apresentam compostos fenólicos, taninos e óleos essenciais que possuem ação antioxidante, auxiliando no combate da ação oxidativa dos radicais livres, além de possuir ação antibacteriana (PAULA-JUNIOR *et al.*, 2006).

No presente trabalho objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de extratos aquosos e etanólicos de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. obtidas em diferentes fases fenológicas sobre *Escherichia coli*. E, para identificar os principais componentes presentes, os extratos foram caracterizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

## Material e métodos

Nesse estudo foi utilizada a estirpe padrão *Escherichia coli* ATCC 8739, mantida em tubos com tampa apegada contendo BHI e glicerol a 30 % e armazenada a -20 °C. Para o preparo das suspensões, a cultura foi ativada por duas vezes consecutivas em 10 mL de caldo BHI e incubada a 37 °C por 24 h, obtendo-se uma concentração final de 10<sup>8</sup> UFC/mL, usando como referência o padrão de turbidez da escala de McFarland 0,5.

As folhas de *Caryocar brasiliense* utilizadas no preparo dos extratos foram coletadas de outubro a janeiro no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais

(UFMG), em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Esta região está localizada na latitude de 16°51' e longitude de 44°55'. As folhas dessa espécie vegetal foram coletadas em duas fases fenológicas: floração e frutificação. A exsicata foi depositada no Herbário Montes Claros de Minas Gerais (HMCMG) da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes), sob o registro n° 338.

As folhas saudáveis e sem lesões foram selecionadas e secas até peso constante em um secador de circulação forçada de ar (TE 394/4, Tecnal Equipamentos Científicos Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 38 °C por 72 h, trituradas em um liquidificador e armazenadas dentro de sacos de papel escuro a 4 °C (RIBEIRO *et al.*, 2018).

O extrato aquoso foi produzido colocando as folhas secas em um banho de água destilada a 40 °C por 60 min. Os extratos etanólicos foram obtidos a partir de folhas secas maceradas em etanol absoluto e armazenadas em recipientes de vidro de cor âmbar ao abrigo de luz por sete dias. Os extratos foram filtrados através de um funil de gaze e subsequentemente evaporados a 40 °C por 48 h sob circulação de ar forçado até que estivessem completamente secos e armazenados a 4 °C até o uso.

Para a análise cromatográfica dos extratos foi utilizado um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) Waters Alliance 2695, composto por uma bomba quaternária, amostrador automático e detector de arranjo de diodos (DAD) 2996. Para o controle do sistema cromatográfico e coleta dos dados foi usado o programa Waters Empower (Waters Corporation, Milford, EUA). As análises foram realizadas em uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (250 × ID de 4 mm, 5µm; Merck, Darmstadt, Alemanha) combinada com uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (4 x 4 mmid,5µm; Merck) a 40 °C. Água (A) e acetonitrila (B) foram utilizadas como eluentes, ambos contendo 0,1 % (v/v) de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, a uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min da seguinte forma: 0 min, 95 % A e 5 % de B; 60 min, 5 % de A e 95 % de B, seguido por 10 min de eluição isocrático. Os solventes utilizados foram de grau HPLC (Merck, Alemanha) e foram desgaseificados por sonicação antes da utilização. Os cromatogramas foram obtidos a 210 nm, e os espectros de UV foram registados em linha 190-400 nm. Os extratos secos foram dissolvidos em metanol (grau HPLC), água ultrapura, ou soluções hidroetanólicas, de acordo com a sua solubilidade, a concentrações de 10 mg/mL. Após centrifugação a 8400xg por 10 min, a solução da amostra (10 µL) foi automaticamente injetada no aparelho.

A concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos necessária para inibir o crescimento do microrganismo foi realizada pelo método de macrodiluição em caldo, conforme descrito pela norma NCCLS (NCCLS, 2003). Antes do preparo das soluções, os extratos foram filtrados em membrana milipore de celulose com 0,2 µm e posteriormente alíquotas foram submetidas à determinação de matéria seca em estufa a 105 °C, para a padronização dos extratos.

Após a padronização das soluções para concentração de 150 mg/mL, foram produzidas diluições subsequentes contendo 2,5 mL de extrato e 2,48 mL de Caldo BHI nas concentrações finais de 75; 37,5; 18,75 e 9,37 mg/mL. Completando um volume final de 5 mL, foi inoculado 120 µL da suspensão ativa de *E. coli*, homogeneizados em vórtex e incubados a 35 °C por 24 h. O controle positivo foi realizado com acréscimo de 120 µL da suspensão direta do microrganismo em caldo BHI e os controles negativos foram avaliados a partir das diluições dos extratos sem acréscimo da suspensão bacteriana. Após o período de incubação, uma alçada dos tubos que não apresentaram turvação foi transferida para placas contendo ágar caseína de soja (TSA), as quais foram incubadas a 35 °C por 24 h, para observar eventual crescimento microbiano e determinar a concentração bactericida mínima (CBM). Os procedimentos foram realizados em duplicata e três repetições para cada tratamento.

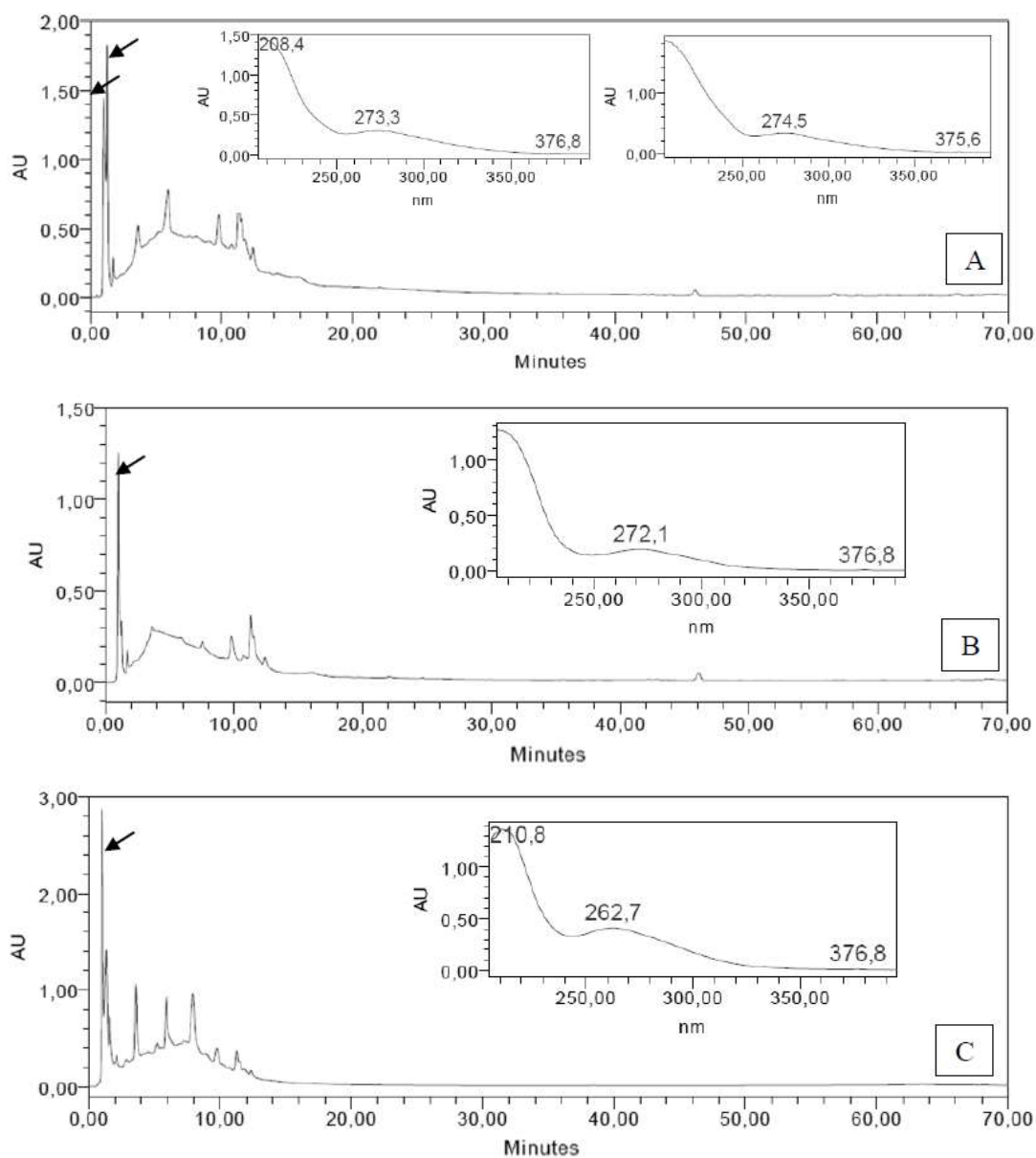
## Resultados e discussão

Os cromatogramas obtidos por HPLC dos extratos de folhas de *C. brasiliense* mostraram que os picos principais apresentam espectros de UV característico de flavonoides, pois a absorvância ficou na região entre 262,7 a 376,8 nm (Figura 1).

Estudos anteriores já demonstraram que um dos principais constituintes das folhas de *C. brasiliense* são os flavonoides, compostos químicos identificados como agentes antimicrobianos (PAULA-JUNIOR *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2014). Os flavonoides são uma família de compostos derivados de plantas com atividades potenciais, como atividades antibacterianas, sinergismo com antibióticos e supressão da virulência bacteriana. Estes compostos podem interagir com a membrana citoplasmática das células bacterianas, inibindo a função e comprometendo a integridade celular e também podem inibir a síntese de ácidos nucleicos e interrupção do metabolismo (CUSHNIE e LAMB, 2011).

Verificou-se que o crescimento de *E. coli* foi inibido pela maior concentração testada dos extratos etanólicos das folhas obtidas nos estágios de frutificação e de floração, 150 mg/mL. Ao avaliar o extrato aquoso em estágio de frutificação, constatou-se inibição de crescimento bacteriano em concentração de 75 mg/mL. Não foi possível determinar a CBM de nenhum dos extratos, pois foi detectada células viáveis após o contato com os extratos nas maiores concentrações avaliadas (Tabela 1).

Figura 1 - Cromatogramas obtidos por HPLC para extratos de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. em diferentes fases fenológicas.



Fonte: Dos autores, 2015.

Legenda: (A) extrato etanólico de folhas na frutificação, (B) extrato etanólico de folhas na floração, e (C) extrato aquoso de folhas na frutificação.

O extrato aquoso de folhas quando estava na frutificação apresentou melhor inibição do crescimento de *E. coli*, em comparação com o extrato etanólico no mesmo estágio fenológico. Enquanto para os extratos etanólicos das folhas em estágios fenológicos diferentes (frutificação e floração), não apresentou diferença na inibição do microrganismo.

Tabela 1 - Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos de folhas de *C. brasiliense* Camb. obtidos em diferentes fases fenológicas frente células de *Escherichia coli* ATCC 8739.

Tipo de extratos	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Etanólico na frutificação	150	> 150
Etanólico na floração	150	> 150
Aquoso na frutificação	75	> 150

Fonte: Dos autores, 2015.

Machado *et al.* (2018) avaliaram o potencial antibacteriano do extrato aquoso da folha de *C. brasiliense* frente a *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e verificaram que extrato apresentou bioatividade inibitória somente sobre *S. aureus* em concentração de 50 g/mL, não demonstrando atividade sobre as demais bactérias. Pinho *et al.* (2012) verificaram que o extrato hidroetanólico da casca do pequi contém metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas importantes e, apesar da presença desses compostos, não foi detectada atividade do extrato frente *E. coli* e *S. aureus*.

Entretanto, em pesquisa realizada por Paula-Júnior *et al.* (2006) foi demonstrado que o extrato hidroetanólico de folhas do pequizeiro apresentou atividade antibacteriana *in vitro* sobre estirpes de bactérias patogênicas para o homem (*E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*) e a triagem fitoquímica do extrato mostrou a presença de flavonoides, taninos, saponinas e terpenóides.

A diferença nos resultados obtidos nesse estudo com de outros pesquisadores, pode ter sido decorrente de diversos fatores, como concentração do extrato, qualidade da parte vegetal (condições climáticas, solo, sazonalidade), os métodos de obtenção do extrato, metodologias de análise da atividade antimicrobiana, ou mesmo da menor e/ou maior sensibilidade dos microrganismos estudados. Estes fatores poderiam explicar o fato de outros estudos terem chegado a resultados distintos, mesmo utilizando a mesma espécie vegetal (PINHO *et al.*, 2012).

## Conclusão

Os principais componentes presentes nos extratos das folhas de *C. brasiliense* identificadas por HPLC foram os flavonoides. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente *E. coli*, contudo o estágio fenológico da planta não influenciou na ação dos extratos, porém a metodologia

utilizada para a obtenção dos extratos na forma aquosa e na forma etanólica influenciou a inibição do crescimento do microrganismo. Concentrações mais elevadas e outras metodologias de obtenção dos extratos podem ser estudadas, e tornar uma alternativa viável e sustentável para o tratamento antimicrobiano.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG e a Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG pela disponibilização de recursos financeiros para a realização dos experimentos.

## Referências

- AMARAL, L. F. B.; MORIEL, P.; FOGGIO, M. A.; MAZZOLA, P. G. *Caryocar brasiliense* supercritical CO<sub>2</sub> extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 73, p. 2-7, 2014.
- CUSHNIE T. P.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, p. 99-107, 2011.
- MACHADO, D. S. *et al.* Avaliação antibacteriana do extrato aquoso da folha de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae). **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 1, p. 5-19, 2018.
- MICHELIN, D. C. *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta---o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: 27 de abr. de 2019.
- NCCLS. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**: Norma Aprovada – Sexta Edição. Norma NCCLS M7-A6. 53 p. 2003.
- PAULA-JUNIOR, W. *et al.* Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliensis* leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, supl. 0, p. 625-630, 2006.
- PINHO, L. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.
- RIBEIRO, I. C. D. O. *et al.* Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 32, 2018.
- YAP, P. S. X.; YIAP, B. C.; PING, H. C. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. **The Open Microbiology Journal**, v. 8, p. 6-14, 2014.