

Article

Atividade Antibacteriana *in vitro* de Extratos e Frações da Casca do Caule e Folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess (Caryocaraceae)

Wenderson Costa da Silva¹ , Fátima Maria de Souza Pereira² , Márcio Leonardo de Moraes Nobre³ , Francisléia Falcão França Santos Siqueira⁴ , Antônia Fernanda Lopes da Silva⁵ , Karine Costa Melo⁶ , Romário de Sousa Oliveira⁷ , Francisco Laurindo da Silva⁸ 

¹ Mestrando em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão. ORCID: 0000-0001-6031-9775. E-mail: wendersoncosta09@hotmail.com

² Doutora em Ciências de Materiais pela Universidade Federal de Pernambuco. ORCID: 0000-0002-2948-0971 E-mail: fatima.pereira@ifma.edu.br

³ Doutorando em Tecnologias Aplicadas aos Animais de Interesse Regional pela Universidade Federal do Piauí. ORCID: 0000-0003-3341-2020. E-mail: marcio.leo.nobre@gmail.com

⁴ Mestranda em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão. ORCID: 0000-0001-7021-3640 E-mail: leiafalcao7@gmail.com

⁵ Mestranda em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão.. ORCID: 0000-0003-1296-8767. E-mail: nandalopesslp@hotmail.com

⁶ Especializanda em Gestão e Saúde pela Universidade Federal do Maranhão. ORCID: 0000-0001-8253-859X. Email: karinemelo09@gmail.com

⁷ Mestrando em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão. ORCID: 0000-0002-4976-2044. E-mail: rsobioq@hotmail.com

⁸ Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais. Professor do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde na Universidade Estadual do Maranhão. ORCID: 0000-0001-6837-4509. E-mail: flspb@yahoo.com.br

RESUMO

Apesar dos avanços técnico-científicos no campo da saúde, as doenças infecciosas continuam sendo umas das principais causas de morte em todo o mundo, sendo a resistência microbiana o principal agravante desse problema. As plantas medicinais possuem uma composição muito rica em fitoquímicos que podem ser estruturalmente otimizados e processados em novos medicamentos. O objetivo desse estudo foi investigar o potencial antibacteriano do extrato e frações preparadas a partir da casca do caule e das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess, utilizando ensaios *in vitro*. A triagem fitoquímica de plantas foi realizada usando métodos de precipitação e coloração e a atividade antibacteriana utilizando o método de difusão em disco e microdiluição em caldo contra cepas padronizadas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os resultados da triagem fitoquímica revelaram a presença de flavonoides, esteroides livres, triterpenóides pentacíclicos livres, saponina e alcaloides. Neste estudo, os extratos brutos e frações de *C. brasiliense* apresentaram efeito inibitório contra *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* com halos de inibição que variou de 7,5±1,40 a 18,3±6,06 mm, sendo *S. aureus* mais sensível aos testes de difusão em disco. Pela microdiluição em caldo os extratos foram mais efetivos contra *K. pneumoniae* (Concentração Inibitória Mínima (CIM) = 125-1000 µg/mL) seguido de *S. aureus* (CIM = 250-1000 µg/mL). Os extratos foram inativos contra *E. coli*. Com base nos resultados, os extratos de *C. brasiliense* podem vir a ser agentes alternativos para o controle de infecções associadas a essas bactérias, após estudos de toxicidade e testes *in vivo*.

Palavras-chave: pequi; compostos fitoquímicos; extratos vegetais; plantas medicinais; bactérias.

ABSTRACT

Despite the technical and scientific advances in the health field, infectious diseases continue to be one of the main causes of death worldwide, with microbial resistance being the main aggravating factor of this problem. Medicinal plants have a very rich composition



Submissão: 10/02/2023



Aceite: 05/10/2023



Publicação: 27/10/2023



of phytochemicals that can be structurally optimized and processed into new drugs. The objective of this study was to investigate the antibacterial potential of the extract and fractions prepared from the stem bark and leaves of *Caryocar brasiliense* Cambess using *in vitro* assays. Plant phytochemical screening was performed using precipitation and staining methods and antibacterial activity using disk diffusion and broth microdilution method against standardized strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. The results of phytochemical screening revealed the presence of flavonoids, free steroids, free pentacyclic triterpenoids, saponin and alkaloids. In this study, the crude extracts and fractions of *C. brasiliense* showed inhibitory effect against *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* with inhibition halos ranging from 7.5 ± 1.40 to 18.3 ± 6.06 mm, being *S. aureus* more sensitive to disc diffusion tests. By broth microdilution the extracts were most effective against *K. pneumoniae* (Minimum Inhibitory Concentration (MIC) = 125-1000 $\mu\text{g/mL}$) followed by *S. aureus* (MIC = 250-1000 $\mu\text{g/mL}$). The extracts were inactive against *E. coli*. Based on the results, *C. brasiliense* extracts may become alternative agents for the control of infections associated with these bacteria after toxicity studies and *in vivo* testing.

Keywords: pequi; phytochemicals; plant extracts; plants, medicinal; bacteria.

1. Introdução

Nas últimas décadas, o aparecimento de resistência bacteriana representa uma das principais ameaças à saúde pública global (Munita & Arias 2016). Entre os patógenos mais comuns e oportunistas incluem *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), os quais são alvos dessa investigação. Infecções causadas por essas bactérias resistentes, resultam em maior duração de hospitalização e representam uma carga econômica significativa nos sistemas nacionais de saúde (Christaki et al. 2019).

Esse problema tem concentrado a comunidade científica na busca por novos compostos antimicrobianos. Nesse contexto, encontrar alternativas adequadas às terapias antibióticas convencionais é fundamental, onde as plantas medicinais são uma alternativa eficaz e de baixo custo (Baptista et al. 2018).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que cerca de 80% da população em países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para seus cuidados primários de saúde, no qual a maior parte faz o uso de ervas medicinais, seus extratos e de seus princípios ativos (Mishra et al. 2016). No mundo, o Brasil é o país com maior proporção de biodiversidade (por volta de 15% a 20%) e detém valiosos conhecimentos tradicionais associados ao uso de ervas medicinais (Ministério da Saúde 2016).

Entre os potenciais fitoterápicos antimicrobianos que faz parte dessa diversidade biológica, está o *C. brasiliense*, um membro da família Caryocaraceae conhecido popularmente como “pequi”, “piqui” ou “pequizeiro”. É uma espécie arbórea neotropical, nativa do Brasil, sendo uma das espécies mais representativas do Cerrado, no qual está amplamente distribuída nesse bioma (Geöcze et al. 2021).

Além do Cerrado, é encontrada na Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica. Essa espécie oferece oportunidades de desenvolvimento econômico para essas regiões, como a produção de cosméticos, na indústria de alimentos e para fins medicinais (Amaral et al. 2014, Guedes et al. 2017). Sua produção de frutos é sazonal, ocorrendo principalmente entre setembro e fevereiro (Guedes et al. 2017). Nutricionalmente, o fruto é bastante rico e funcional, onde apresenta propriedades sensoriais como cor, aroma e sabor diferenciado em relação a outras frutas, e possui sabor agradável (Bezerra et al. 2015).

Seu uso para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos ocorre devido ao alto teor de compostos bioativos presentes em sua composição com potencial terapêutico (Barroso et al. 2020). Na sua composição química, estudos mostram a presença de flavonoides, taninos hidrolisáveis, alcaloides, terpenos, saponinas, esteroides e cumarinas (Ribeiro et al. 2018, Bemfeito et al. 2020, Caldeira et al. 2021, Vargas et al. 2021).

Como resultado, importantes atividades farmacológicas desta espécie foram anteriormente relatadas, tais como: antioxidante (Baptista et al. 2018, de Oliveira et al. 2018); antidiabética (Caldeira et al. 2021);

antilipidêmico (Silva et al. 2020); analgésica, anti-inflamatória (Jorge Junior et al. 2020); anticolinesterásica (de Oliveira et al. 2018); leishmanicida (de Paula-Junior et al. 2006); bem como, atividade antimicrobiana (Ribeiro et al. 2018, Amaral et al. 2014).

Observado que o Pequi, espécie nativa do Brasil, é utilizada popularmente com finalidades medicinais, com reconhecidos compostos que apresentam atividades biológicas diversas, e considerando a escassez de estudos, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial antibacteriano do extrato e frações preparadas a partir da casca do caule e das folhas de *C. brasiliense* utilizando ensaios *in vitro*. Adicionalmente, foi realizada a identificação dos potenciais constituintes bioativos.

2. Materiais e Métodos

2.1 Coleta e identificação de material vegetal

Para os testes, foram utilizadas folhas e casca do caule de *C. brasiliense*, coletados na região do Cerrado de São João do Soter, Maranhão, Brasil (4°57'02.0"S 43°34'33.0"W). A planta foi identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário Professor Aluizio Bittencourt (HABIT) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) sob o voucher HABIT 4144. Registrada no Sistema Distribuído de Informação que Integra Dados Primários de Coleções Científicas (SpeciesLink) e cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A6A46ED.

2.2 Obtenção dos extratos vegetais

Após a secagem a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, sob abrigo da luz, as folhas e a casca do caule foram moídas em moinho de facas. A extração foi feita por maceração estática das amostras em pó (100 g cada) em 1000 ml de etanol 99% (álcool etílico absoluto PA ACS, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}/99,8\%$, *Dinâmica*®) como solvente, em extrator de vidro ($26 \pm 1^\circ\text{C}$). Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo (Solab SL-126), acoplado a uma bomba de vácuo (Primatec 132) para remoção dos solventes e obtenção do extrato bruto.

2.3 Fracionamento químico

Os extratos etanólicos de *C. brasiliense* das folhas e da casca do caule foram suspensos separadamente em uma mistura de metanol (álcool hidratado neutro PA, CH_3OH , *Dinâmica*®) e água destilada (2:3), e submetidos sucessivamente ao processo de divisão líquido-líquido com Hexano (PA, C_6H_{14} , *Dinâmica*®), Clorofórmio (PA, CHCl_3 , *Dinâmica*®) e Acetato de etila (PA, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, *Dinâmica*®).

Após a remoção dos solventes em evaporador rotativo (Solab SL-126), acoplado a uma bomba de vácuo (Primatec 132), foram obtidas quatro frações do extrato etanólico das folhas e casca do caule de *C. brasiliense* em: Hexano (FHex), Clorofórmio (FCL), Acetato de etila (FAce) e Hidrometanol (FHi) (Uchôa et al. 2016). Os extratos brutos em etanol e frações resultantes da partição foram submetidos a ensaios *in vitro* de atividade antimicrobiana e análise fitoquímica.

2.4 Atividade antimicrobiana

2.4.1 Culturas microbianas

Os extratos vegetais foram testados contra as cepas padrões da *American Type Culture Collection* (ATCC), a saber: *K. pneumoniae* ATCC 13883, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923. Os microrganismos foram ativados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Kasvi) e incubados por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.



Após esse período, as cepas foram semeadas em *Tryptic Soy Agar* (TSA, Kasvi) por 24 h a $36 \pm 1^\circ \text{C}$. As cepas bacterianas foram mantidas em repiques sucessivos em meio de cultura ágar TSA durante os testes de suscetibilidade *in vitro*.

2.4.2 Método difusão em disco

Para análise da atividade antimicrobiana foi realizado através do teste de difusão em disco em ágar Muller-Hinton (MH, Kasvi), segundo Bauer et al. (1966). Discos de papel filtro foram impregnados (15 μL) com as diferentes frações, que foram diluídas em Dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% na concentração de 100 mg/mL, e então colocados na placa de ágar previamente inoculada com cada cepa mencionada. Cada inóculo equivalia a 0.5 na escala de McFarland, aproximadamente 1.5×10^8 unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Foi utilizado como controle positivo discos de antibióticos de Ciprofloxacina (5 μg), e como controle negativo DMSO a 10%. As placas foram incubadas invertidas em estufa microbiológica ($35 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 h). Cada fração e em cada concentração foram testadas em triplicata.

Os halos de inibição foram medidos em mm de diâmetro em áreas onde não era visível o crescimento microbiano e os resultados foram interpretados de acordo com diretrizes (Bauer et al. 1966, Soyngbe et al. 2018).

2.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo em placas com 96 poços, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2015) usando resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) como indicador de viabilidade bacteriana. O inóculo ajustado (0.5 McFarland) foi diluído em caldo BHI duplo até a concentração final de 10^5 UFC/mL por poço.

A montagem do teste consistiu primeiramente na distribuição de 100 μL de BHI previamente inoculado nos poços da placa de microdiluição, em seguida, 100 μL do extrato e frações foram adicionados aos poços da linha A, homogeneizou-se e realizou-se diluições seriadas até a linha G, obtendo-se as concentrações finais de 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 e 62.5 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 h de incubação, foram adicionados 20 μL de resazurina (0.01%) e após 1 h de reação, as leituras foram realizadas. Todos os testes foram realizados em triplicata. Foram realizados também os seguintes controles: controle negativo (meio de cultura, DMSO e inóculo); controle positivo (meio de cultura, antibiótico ciprofloxacina e inóculo); controle de crescimento (meio de cultura com inóculo e sem antibiótico ou extrato) e controle de esterilidade (BHI sem inóculo e extratos vegetais).

Para a análise de resultados, considerou-se boa atividade inibitória, quando o valor de CIM foi menor que 100 $\mu\text{g/mL}$, atividade inibitória moderada, entre 100–500 $\mu\text{g/mL}$, atividade inibitória fraca, entre 500–1000 $\mu\text{g/mL}$, e ausência de atividade inibitória, quando maior que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Holetz et al. 2002).

2.5 Análise fitoquímica

A prospecção fitoquímica de metabólitos secundários no extrato etanólico e frações de *C. brasiliense* foi realizada de acordo com reações qualitativas de precipitação e coloração em tubo de ensaio, segundo Matos (2009). A presença de taninos, flavonoides, esteroides, triterpenóides, saponinas e alcaloides foi investigada. Todos os testes foram realizados em tubos de ensaio contendo 2 mL de cada fração separadamente, em triplicata. Como controle, foi utilizada água destilada no lugar das frações de extrato.

Para o teste de tanino, 150 μL de cloreto férrico (FeCl_3 , 5%) foram adicionados aos tubos e agitados em vórtex (Coleman) por 5s; a presença de taninos hidrolisáveis é indicada pelo aparecimento de precipitado azul e taninos condensados em precipitado verde.

Na identificação dos flavonoides foi realizado através do teste de Shinoda. Foram adicionados 100mg de magnésio (Mg) e 2 mL de ácido clorídrico (HCl, PA). O término da reação é indicado pelo fim da efervescência, onde a presença de flavonoides é confirmada pela coloração vermelha ou marrom.

Para testar esteroides e triterpenóides foi realizado através da reação de Lieberman-Burchard. Em 2 mL do extrato foi adicionado 3 mL de clorofórmio (CHCl₃, PA), 2 mL de anidrido acético (C₄H₆O₃) e 150µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄), de forma cuidadosa agitada repetidamente e observada o aparecimento de coloração; o aparecimento de cor azul seguido de verde permanente indica a presença de esteroides livres, enquanto o azul seguido de vermelho indica triterpenóides pentacíclicos livres.

Para os testes de saponina, foram adicionados 2mL de CHCl₃ e 5 mL de água destilada, agitando em vórtex por 3 min; a formação de espuma persistente indica a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

No teste de alcaloides, foram adicionados 3 mL de HLC 10% e aquecido por 10 minutos a 100±1,0°C. Logo após, o extrato foi resfriado a temperatura ambiente. Nos tubos de ensaio foram inseridas 250µL do reativo de Wagner (1,27 g de I₂ (iodo) e 2g de iodeto de potássio (KI) diluído em 5 mL de água destilada, completando-se para 100 mL) e homogeneizou-se manualmente por 1 minuto. Uma leve turbidez ou precipitado se forma no fundo do tubo, apresentando coloração (roxa a alaranjada, ou branco, creme e marrom) evidenciando a presença de compostos alcaloides (Kloss et al. 2016).

2.6 Análise estatística

Os dados gerados a partir do efeito antibacteriano dos extratos vegetais foram inseridos no Microsoft Excel para computar estatísticas descritivas de média e desvio padrão do diâmetro médio dos halos de inibição. Esses dados foram então exportados para o *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 20.0, cujos dados que apresentaram normalidade (Teste de Shapiro Wilk) e homogeneidade (Teste de Levene) foram analisados pela análise de variância Two way ANOVA complementado pelo teste de comparações múltiplas post-hoc de Sidak. Cujos dados que não atenderam a esses pressupostos, foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Bonferroni. Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Análise fitoquímica

A prospecção fitoquímica das classes de metabólitos secundários da folha e casca do caule de *C. brasiliense* são mostradas na Tabela 1. Os taninos hidrolisáveis, taninos condensados e fenóis não estavam presentes em nenhuma parte desta espécie. Existem flavonoides em todas as frações da folha de *C. brasiliense*, enquanto que, na casca do caule este grupo de metabólito secundário estava presente somente na FBr e FHi.

Os esteroides livres ocorrem somente na FHex e FHi das folhas, enquanto que os triterpenóides pentacíclicos livres estavam presentes nas frações FBr e FCl das folhas; e FBr, FHex, FCl e FHi da casca do caule. As saponinas e alcaloides estavam presentes em todas as frações das folhas e casca do caule de *C. brasiliense*.

Tabela 1. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico bruto e frações das folhas e casca do caule de *C. Brasiliense*.



Compostos	Folhas					Casca do caule				
	FBr	FHex	FCl	FAce	FHi	FBr	FHex	FCl	FAce	FHi
Taninos hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos condensados	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fenóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Esteroides livres	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Triterpenóides pentacíclicos livres	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Saponina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alcaloides	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Reação: presente (+); ausente (-); FBr: Fração Bruta; FHex: Fração Hexânica; FCl: Fração clorofórmica; FAce: Fração Acetato de Etila; FHi: Fração Hidrometanólica.

3.2 Atividade antibacteriana

Os resultados da atividade antibacteriana do extrato bruto e frações das folhas de *C. brasiliense* são mostrados na Tabela 2. De acordo com o estudo, todos os extratos tiveram atividade contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, com halos de inibição variando de $7,5 \pm 1,40$ a $18,3 \pm 6,06$ mm. Os extratos não tiveram atividade contra *E. coli*. A maior atividade inibitória foi observada contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* da FCl com halos de inibição que variaram de $18,1 \pm 5,31$ e $18,3 \pm 6,06$ mm, respectivamente.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos diâmetros dos halos de inibição dos extratos bruto etanólico das folhas e frações de *C. brasiliense*.

Frações	<i>S. Aureus</i>		<i>P. Aeruginosa</i>		<i>K. Pneumoniae</i>		<i>E. Coli</i>	
	ATCC 25923		ATCC 27853		ATCC 13883		ATCC 25922	
	ZI	C+	ZI	C+	ZI	C+	ZI	C+
FBr	13,9±1,58	30	7,5±1,40	24	9,0±0,98 ^h	35	NA	33
FHex	15,5±2,14 ^a	30	8,0±1,72 ^{ae}	24	14,9±5,69 ^e	35	NA	33
FCl	18,1±5,31 ^b	30	9,0±2,59 ^{bf}	24	18,3±6,06 ^{hf}	35	NA	33
FAce	15,6±2,78 ^c	30	8,1±2,00 ^{cg}	24	15,2±3,67 ^g	35	NA	33
FHi	16,3±2,40 ^d	30	8,0±1,91 ^d	24	14,0±1,84	35	NA	33
Dados estatísticos						p-valor = 0,000		

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão dos ensaios em três réplicas. Os sobrescritos com letras iguais (a, b, c, d, e, f, g, h)

representam dados que diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste Two Way ANOVA; FBr: Fração Bruta; FHex: Fração Hexânica; FCl: Fração Clorofórmica;

FAce: Fração Acetato de Etila; FHi: Fração Hidrometanólica; ZI: Zona de Inibição; C+: Ciprofloxacina; NA: Não ativo.

Observou-se que a suscetibilidade entre cepas bacterianas aos extratos das folhas diferiu significativamente ($p < 0,05$) (Tabela 2 e Figura 1). A FCl apresentou média significativamente maior em comparação com o extrato bruto das folhas contra *K. pneumoniae*. Na comparação entre as cepas bacterianas, a FHex, FCl, FAce e FHi contra *S. aureus*, a FHex, FCl e FAce contra *K. pneumoniae*, apresentaram média significativamente maior quando comparadas com as frações contra *P. aeruginosa*.

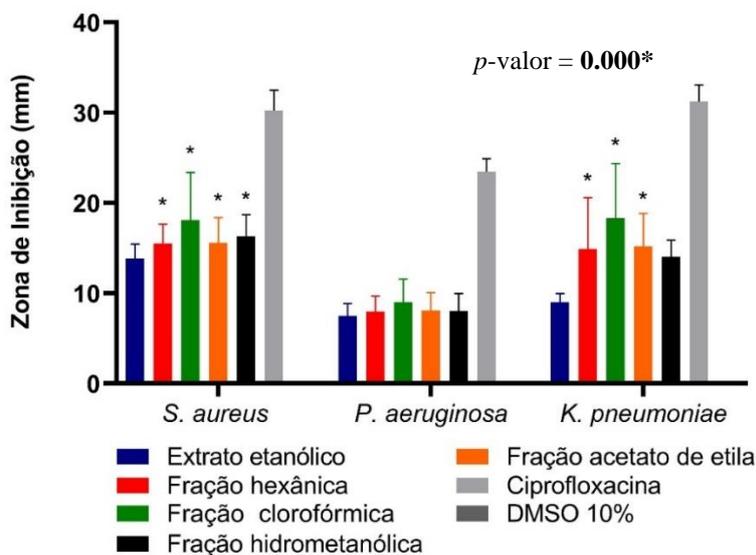


Figura 1. Comparação dos diâmetros médios dos halos de inibição do extrato bruto etanólico e frações das folhas *C. brasiliense*.

*: Dados que expressam atividade antibacteriana significativamente maior ($p < 0,05$) pelo teste de Two Way ANOVA.

O efeito antibacteriano dos extratos da casca do caule de *C. brasiliense* é mostrado na Tabela 3. A atividade antibacteriana foi observada contra *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, com halos de inibição que variaram de $8,3 \pm 1,53$ a $15,0 \pm 5,29$ mm. O extrato etanólico e as diferentes frações não mostraram nenhum efeito sobre *E. coli*. O extrato bruto e frações exibiram maior atividade contra *S. aureus* com maior halo de inibição de $15,0 \pm 5,29$ mm na FAc, seguido da FCl ($14,3 \pm 4,9$ mm) e FHi ($12,7 \pm 1,53$ mm).

Tabela 3. Média e desvio padrão dos diâmetros dos halos de inibição dos extratos bruto etanólico da casca do caule e frações de *C. brasiliense*.

Frações	<i>S. Aureus</i>		<i>P. Aeruginosa</i>		<i>K. Pneumoniae</i>		<i>E. Coli</i>	
	ATCC 25923		ATCC 27853		ATCC 13883		ATCC 25922	
	ZI	C+	ZI	C+	ZI	C+	ZI	C+
FBr	12,0±0,00	32	9,7±0,58	30	8,3±1,53	30	NA	30
FHex	11,3±0,58	32	11,0±1,00	30	8,7±1,53	30	NA	30
FCl	14,3±4,9 ^{ab}	32	9,0±0,00 ^a	30	9,0±1,00 ^b	30	NA	30
FAce	15,0±5,29 ^{cd}	32	9,0±1,00 ^e	30	8,7±1,15 ^d	30	NA	30
FHi	12,7±1,53 ^e	32	8,3±0,58 ^e	30	8,7±0,58	30	NA	30
Dados estatísticos						p-valor = 0,000		

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão dos ensaios em três réplicas. Os sobrescritos com letras iguais (a, b, c, d, e) representam dados que diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. FHex: Fração Hexânica; FCl: Fração Clorofórmica; FAc: Fração Acetato de Etila; FHi: Fração Hidrometanólica; ZI: Zona de Inibição; C+: Ciprofloxacina; NA: Não ativo.

Observou-se que a atividade dos extratos da casca do caule diferiu significativamente ($p < 0,05$). O teste de Kruskal-Wallis mostra que a FCl e FAc contra *S. aureus*, apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com as referidas frações contra *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Além disso, a FHi contra *S. aureus* apresentou melhor atividade inibitória quando comparada com a FHi contra *P. aeruginosa* (Tabela 3 e Figura 2).

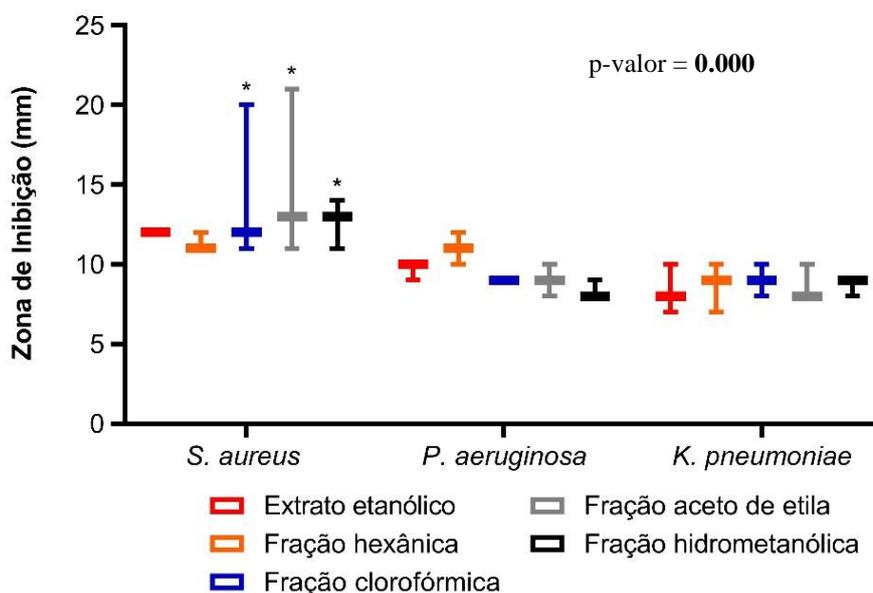


Figura 2. Análise comparativa dos halos de inibição do extrato bruto etanólico e frações da casca do caule de *C. brasiliense*.

*: Dados que expressam mediana significativamente maior ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para verificar se houve diferenças entre as frações da casca do caule e folhas de *C. brasiliense* foi realizado o teste de Kruskal-Wallis. A FCl da folha apresentou média significativamente maior que a FBr, FHex, FCl, FAce e FHi da casca do caule contra *K. pneumoniae* ($p > 0,05$) (Figura 3).

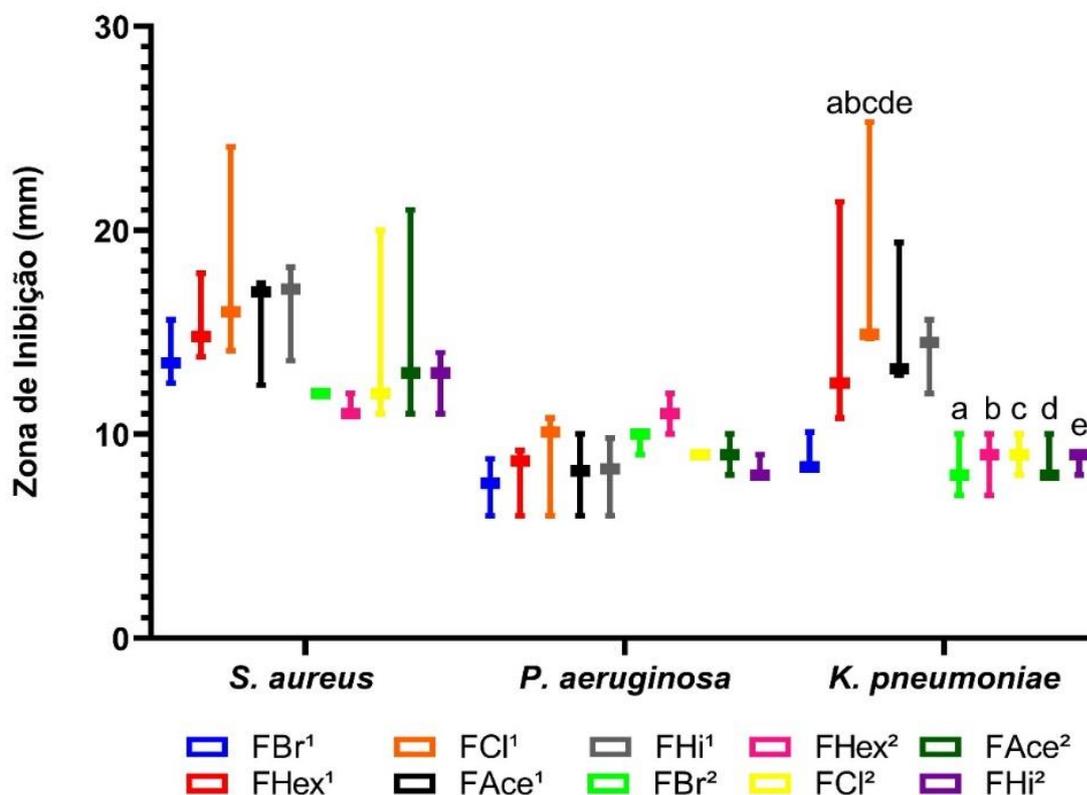


Figura 3. Análise comparativa dos halos de inibição entre os extratos das folhas e casca do caule de *C. brasiliense*.

Os dados com letras iguais (a, b, c, d, e) representam resultados que diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Kruskal-Wallis. ¹: Folhas; ²: Casca do caule;

FBr: Extrato Bruto; FHex: Fração Hexânica; FCI: Fração Clorofórmica; FAce: Fração Acetado de etila; FHi: Fração Hidrometanólica.

3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os valores de CIM (expressas em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos de *C. brasiliense* obtidos a partir de testes antibacterianos usando o método de microdiluição em caldo são apresentados na Tabela 4. A atividade antibacteriana mais potente foi exibida contra *K. pneumoniae* com valores de CIM a $125 \mu\text{g/mL}$ na maioria das frações testadas. Para a *P. aeruginosa* o menor valor foi registrado na FHex da casca do caule a $125 \mu\text{g/mL}$, enquanto que nas outras frações da casca do caule e folhas a maior parte apresentaram atividade fraca ($1000 \mu\text{g/mL}$). Para *S. aureus* a atividade mais potente foi registrada na FAce das folhas a $250 \mu\text{g/mL}$, nas demais frações a maior parte apresentaram atividade moderada. Para *E. coli* todos as frações apresentaram inatividade ($\text{CIM} > 1000 \mu\text{g/MI}$).

Tabela 4. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos bruto e frações das folhas e casca do caule de *C. brasiliense*.



Bactérias	Extratos CIM (µg/mL)									
	Folhas					Casca do caule				
	FBr	FHex	FCI	FAce	FHi	FBr	FHex	FCI	FAce	FHi
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	125	125	125	1000	250	250	125	1000	500	125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	500	2000	1000	500	2000	1000	125	1000	1000	500
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	500	500	500	250	500	500	500	1000	1000	500
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2000	4000	2000	4000	4000	4000	2000	4000	4000	4000

FBr: Fração Bruta; FHex: Fração Hexânica; FCI: Fração Clorofórmica; FAce: Fração Acetato de Etila; FHi: Fração Hidrometanólica; CIM: Concentração Inibitória Mínima; µg/mL: microgramas por mL.

4. Discussão

Neste estudo, os extratos brutos e frações de *C. brasiliense* apresentaram efeito inibitório contra três das quatro espécies bacterianas analisadas, indicando a importância de estudos de bioprospecção em vegetação do Cerrado.

Nos testes, a melhor ação inibitória foi exibida contra *K. pneumoniae* e *S. aureus*. E menor resposta contra *P. aeruginosa*. Os extratos apresentaram inatividade contra *E. coli*. A maior resistência dos organismos Gram-negativos ocorre devido à complexidade da membrana. Essas bactérias têm uma membrana adicional, a chamada membrana externa, que limitam a difusão de compostos bioativos, o que pode explicar esses achados (Joshi 2018).

O efeito inibitório dos extratos de *C. brasiliense* foi verificado em outros estudos. Da Silva Machado et al. (2018) avaliaram o potencial antibacteriano do extrato aquoso da folha de *C. brasiliense* frente aos microrganismos *E. coli* (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC25923) e *P. aeruginosa* (ATCC27853) e apresentou atividade inibitória apenas sobre a *S. aureus*. Diferentemente dos resultados dos extratos aqui testados, que além de *S. aureus*, mostraram a presença de atividade contra *P. aeruginosa*. De Pinho et al. (2012) também reportaram resultados diferentes, os extratos hidroalcoólicos da casca usados na dose de 500 mg/mL não mostraram inibição quando testados contra as cepas de referência de *S. aureus*.

Por outro lado, pesquisas descrevem efeitos divergentes dos extratos quando comparados com os resultados desse estudo contra isolados de *E. coli* pelo método de difusão em ágar. Os estudos de Ribeiro et al. (2018) e Borges et al. (2020), testaram as folhas de *C. brasiliense* contra isolados padronizados e não padronizados de *E. coli* e observaram a presença de atividade inibitória.

Com relação a microdiluição em caldo, os resultados mostram atividade de moderada a fraca (125-1000 µg/mL) sendo *K. pneumoniae* e *S. aureus* mais sensíveis aos testes na maioria das frações (atividade moderada). Para *P. aeruginosa* a atividade foi considerada fraca (1000 µg/mL) na maior parte das frações e para *E. coli* os extratos foram inativos (CIM >1000 µg/mL).

Ribeiro et al. (2018) encontraram resultados semelhantes para *S. aureus*, o extrato etanólico das folhas de *C. brasiliense* foi capaz de inibir a referida cepa a 270 µg/mL. No entanto, apresentaram atividade para *E. coli* a 270 µg/mL, enquanto nossos resultados mostram inatividade.



É importante destacar que os extratos de *C. brasiliense* apresentaram CIMs mais baixas contra cepas testadas do que outros estudos. De Paula-Junior et al. (2006) relataram que o extrato hidroetanólico das folhas de *C. brasiliense* exibiu valores de CIM de 4 mg/mL contra *P. aeruginosa* (ATCC27853) e *S. aureus* (ATCC25923) e Amaral et al. (2014) descreveram CIMs superiores de *C. brasiliense* contra *S. aureus* ATCC 6538 (22,5 mg/mL). Nesses estudos os extratos apresentaram inatividade contra as cepas citadas, tendo em vista a necessidade de uma alta dose do produto natural para inibir o crescimento microbiano. Diferentemente dos nossos resultados, que foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* com valores de CIM \leq 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Essas diferenças observadas em ambos os métodos podem estar associadas a composição bioquímica e polaridade dos solventes utilizados. As interações e as diferenças dos constituintes dos extratos poderiam explicar seus espectros de ação contra bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas (Barbosa-Filho et al. 2015, Ribeiro et al. 2018). De Pinho et al. (2012) acrescentam que essas diferenças são decorrentes de fatores de concentração do extrato, qualidade do vegetal utilizado, época do ano, qualidade do solo, teor de metabólitos secundários, índice pluviométrico, sazonalidade, etc. Todos esses fatores, poderiam elucidar o motivo de outros estudos terem encontrados resultados distintos, mesmo utilizando a mesma espécie para os testes.

Com relação as análises fitoquímicas, os alcaloides foram os compostos majoritários e os flavonoides estavam presentes na maioria das frações testadas. Acredita-se que esses compostos foram os responsáveis pela atividade antimicrobiana observada (Ribeiro et al. 2018, Amaral et al. 2014, Andrade-Ochoa et al. 2015, Miklasinska et al. 2016).

Segundo a literatura, os principais constituintes de *C. brasiliense* são flavonoides e terpenóides, compostos químicos identificados como agentes antimicrobianos. O galato de etila foi o flavonoide isolado em alto rendimento do extrato etanólico bruto da fruta de *C. brasiliense*, o que sugere que esse composto pode ser responsável pela atividade antimicrobiana (Ascari et al. 2010, Amaral et al. 2014, Andrade-Ochoa et al. 2015, Miklasinska et al. 2016). Além desses compostos, Barbosa-Filho et al. (2015), acrescentam que os alcaloides são conhecidos por serem responsáveis pela atividade antimicrobiana da maioria dos vegetais.

Com relação aos membros da família Caryocaraceae, outra espécie de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm), a casca e a polpa de frutos maduros foram testadas quanto ao potencial antifúngico pelo método de microdiluição em caldo e foram eficazes contra seis cepas de patógenos. Os autores associaram os flavonoides quercetina, rutina e isoquercitrina como indicadores importantes dessas atividades. A biodisponibilidade da isoquercitrina mostrou-se superior à dos outros dois flavonoides (Alves et al. 2017).

Outro estudo realizado por de Lacerda Neto et al. (2017) com essa mesma espécie de pequi mostram que os extratos hidroalcoólico das folhas de *C. coriaceum* apresentaram atividade inibitória contra *E. coli* (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC12692) e *P. aeruginosa* (ATCC15442) (determinadas por ensaios de difusão em ágar). Os resultados mostraram que os extratos hidroalcoólico das folhas é composto principalmente por flavonoides (89,68 mg/g). A presença de rutina e quercetina foi confirmada pela técnica de cromatografia em camada delgada pelo referido estudo.

Esses resultados mostram que os flavonoides são compostos comuns na família Caryocaraceae. Sendo a rutina, isoquercitrina, galato de etila e quercetina os compostos principais, e são associados com a atividade antimicrobiana observada nessa família. Com base nos resultados, os extratos de *C. brasiliense* podem vir a ser agentes alternativos para o controle de doenças associadas a essas bactérias, após estudos de toxicidade e testes *in vivo*.



5. Considerações Finais

Os resultados mostram que os extratos de *C. brasiliense* podem ser fontes potenciais de agentes naturais contra *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Sendo as cepas de *K. pneumoniae* e *S. aureus* mais sensíveis aos testes. A presença de compostos flavonoides e alcaloides podem ser os principais responsáveis pelo efeito antibacteriano observado.

Esses patógenos estão associados a vários processos infecciosos em humanos e representa um problema de saúde pública no mundo. Portanto, mais pesquisas são necessárias para explorar as propriedades biológicas apresentadas pelo extrato de folhas de *C. brasiliense* em modelos *in vivo*, para que possam ser utilizados clinicamente no controle dessas bactérias.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pela bolsa de mestrado (número: BM-01021/21), Reitoria da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Caxias, Brasil, e ao Laboratório de Química e Microbiologia do Instituto Federal do Maranhão (IFMA), Caxias, Brasil, pelo suporte técnico na preparação e testes dos extratos vegetais.

Referências

Alves DR, de Moraes SM, Tomiotto-Pellissier F, Miranda-Sapla MM, Vasconcelos FR, da Silva ING, de Sousa, HA, Assolini JP, Conchon-Costa I, Pavanelli WR, Freire FCO 2017. Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome. Evid Based Complement Altern Med 2017: 1-7.

Amaral LF, Moriel P, Foglio MA, Mazzola PG 2014. *Caryocar brasiliense* supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for personal care products. BMC Complement Altern Med 14(1):1-7.

Andrade-Ochoa S, Nevárez-Moorillón GV, Sánchez-Torres LE, Villanueva-García M, Sánchez-Ramírez BE, Rodríguez-Valdez LM, Rivera-Chavira BE 2015. Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. BMC Complement Altern Med 15(1):1-11.

Ascari J, Takahashi JÁ, Boaventura MAD 2010. Phytochemical and biological investigations of *Caryocar brasiliense* Camb. Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat 9(1):20-28.

Baptista A, Gonçalves RV, Bressan J, Pelúzio MDCG 2018. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Crude Extracts and Fractions of Cashew (*Anacardium occidentale* L.), Cajui (*Anacardium microcarpum*), and Pequi (*Caryocar brasiliense* C.): A Systematic Review. Oxid Med Cell Longev 2018:1-13.

Barbosa-Filho VM, Waczuk EP, Leite NF, Menezes IR, da Costa JG, Lacerda SR, Adedara IA, Coutinho HD, Posser T, Kamdem JP 2015. Phytocompounds and modulatory effects of *Anacardium microcarpum* (cajui) on antibiotic drugs used in clinical infections. Drug Des Devel Ther 9:5965-72.

Barroso NG, Barros ELS, Sanches MAR, Camelo-Silva C, Verruck S, Tussolini L 2020. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) – Uma revisão. In: Verruck, S. *Avanços em ciência e tecnologia de alimentos*. Científica digital, Guarujá, p. 336-344.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45(4):493-6.

Bemfeito CM, Carneiro JDS, Carvalho EEN, Coli PC, Pereira RC, Vilas Boas EVB 2020. Nutritional and functional potential of pumpkin (*Cucurbita moschata*) pulp and pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) peel flours. *J Food Sci Technol* 57(10):3920-3925.

Bezerra NKMS, Barros TL, Coelho NPMF 2015. A ação do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. *Rev Bras Pl Med* 17(42):875-880.

Borges LLR, Guimarães ADB, Moraes-Costa F, Duarte ER, Martins M, Careli RT 2021. Efficacy of *Caryocar brasiliense* Camb. and *Annona crassiflora* Mart. leaves in the reduction of biotransferred *Escherichia coli* from *Lactuca sativa* L. leaves to polypropylene. *Research, Society And Development* 10(17):124101724268.

Caldeira ASP, Mbiakop UC, Pádua RM, van de Venter M, Matsabisa MG, Campana PRV, Cortes SF, Braga FC 2021. Bioguided chemical characterization of pequi (*Caryocar brasiliense*) fruit peels towards an anti-diabetic activity. *Food Chem* 345:128734.

Christaki E, Marcou M, Tofarides A 2019. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* 88(1):26-40.

Clinical and laboratory standards institute 2015. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition*. Vol. XXXV, Clinical And Laboratory Standards Institute, Wayne, 87 pp.

de Lacerda Neto LJ, Ramos AGB, KerntopfMR, Coutinho HDM, Quintans-Junior LJ, Almeida JRGS, Ribeiro-Filho J, Menezes IRA 2018. Modulation of antibiotic activity by the hydroalcoholic extract from leaves of *Caryocar coriaceum* WILLD. *Nat Prod Res* (4):477-480.

de Oliveira TS, Thomaz DV, da Silva Neri HF, Cerqueira LB, Garcia LF, Gil HPV, Pontarolo R, Campos FR, Costa EA, Dos Santos FCA, de Souza Gil E, Ghedini PC 2018. Neuroprotective Effect of *Caryocar brasiliense* Camb. Leaves Is Associated with Anticholinesterase and Antioxidant Properties. *Oxid Med Cell Longev* 2018:9842908.

de Paula-Junior W, Rocha FH, Donatti L, Fadel-Picheth CMT, Weffort-Santos AM 2006. Atividade leishmanicida, antibacteriana e antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess. *Rev bras farmacogn* 16:625-630.

de Pinho L, Souza PNS, Macedo Sobrinho E, Almeida AC de, Martins ER 2012. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. *Cienc Rural* 42(2):326-331.



Geöcze KC, Barbosa LCA, Lima CF, Ferruzzi MG, Fidêncio PH, Sant'ana HMP, Silvério FO 2021. *Caryocar brasiliense* Camb. fruits from the Brazilian Cerrado as a rich source of carotenoids with pro-vitamin A activity. J Food Compost Anal 101:1-8.

Guedes AMM, Antoniassi R, Galdeano MC, Grimaldi R, de Carvalho MG, Wilhelm AE, Marangoni AG 2017. Length-scale Specific Crystalline Structural Changes Induced by Molecular Randomization of Pequi Oil. Journal Of Oleo Science 66(5): 469-478.

Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DAG, Nakamura CV, Dias Filho BP 2002. Seleção de algumas plantas utilizadas na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças infecciosas. Mem Inst Oswaldo Cruz 97(7):1027-1031.

Jorge Junior A, Leitão MM, Bernal LPT, Dos Santos E, Kuraoka-Oliveira ÂM, Justi P, Argandoña EJS, Kassuya CAL 2020. Analgesic and Anti-inflammatory Effects of *Caryocar brasiliense*. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem 19(3):313-322.

Joshi RK 2018. Role of Natural Products against Microorganisms. American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials 1:1-5.

Kloss LC, Albino AM, Souza RG, Lima RA 2016. Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico de *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE). South American Journal of Basic Education, Technical and Technological 3(2):118-128.

Machado DDS, Abreu SGF, Lamounier LO, Negreiros D 2018. Avaliação antibacteriana do extrato aquoso da folha de *Caryocar brasiliense* Cambess. (CARYOCARACEAE). Visão Acadêmica 19(1):5-19.

Matos FJA 2009. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. Edições UFC, Fortaleza, 150 pp.

Ministério da Saúde 2016. *Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos*. Ministério da Saúde, Brasília, 192 pp.

Mishra A, Seth A, Maurya SK 2016. Therapeutic significance and pharmacological activities of antidiarrheal medicinal plants mention in Ayurveda: A review. J Intercult Ethnopharmacol 5(3):290-307.

Munita JM, Arias CA 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr 4(2):1-37.

Ribeiro ICO, Mariano EGA, Careli RT, Moraes-Costa F, de Sant'Anna FM, Pinto MS, de Souza MR, Duarte ER 2018. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. BMC Vet Res 14(1):32.

Silva GT, Di Pietro Fernandes C, Hiane PA, Freitas KC, Figueiredo PS, Inada AC, Filiú WF, Maldonade IR, Nunes AA, Oliveira LCS, Caires ARL, Michels F, Candido CJ, Cavalheiro LF, Arakaki Asato M, Rodrigues Donadon J, Bacelar de Faria B, Tatara MB, Rosa Croda JH, Pott A, Nazário CED, Guimarães RCA 2020. *Caryocar brasiliense* Cambess. Pulp Oil Supplementation Reduces Total Cholesterol, LDL-c, and Non-HDL-c in Animals. Molecules 25(19):4530.



Soyingbe OS, Mongalo NI, Makhafola TJ 2018. In vitro antibacterial and cytotoxic activity of leaf extracts of *Centella asiatica* (L.) Urb, *Warburgia salutaris* (Bertol. F.) Chiov and *Curtisia dentata* (Burm. F.) C.A.Sm - medicinal plants used in South Africa. BMC Complement Altern Med 18(1):315.

Uchôa VT, Sousa CMM, Carvalho AA, Sant'Ana AEG, Chaves MH 2016. Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts. J Appl Pharm Sci 6:91-96.

Vargas SH, Camili EC, Coelho MFB, De Vasconcelos LG, Soares MA, Sampaio OSM, Vendruscolo SJ 2021. Atividade fitotóxica e composição química de extratos foliares aquosos de espécies do Cerrado. Floresta Ambient 28(3):20210011.