



Extrato bruto e particionado da espécie *Carpotroche brasiliensis*: Prospecção de compostos secundários e avaliação de propriedades antimicrobianas frente a linhagens de microorganismos específicos.

Karolinny Lopes Jansen Soares, Dario Alves de Oliveira, Sarah Christina Carvalho Batista, Odirlei Simoes de oliveira, Henrique Maia Valério, Marcela Magda Rocha Aguiar

Introdução

A espécie *Carpotroche brasiliensis* Endl. pertence à família Flacourtiaceae, é uma árvore de médio a grande porte, que produz frutos de casca rígida e polpa carnuda. Seu fruto é muito apreciado por cotias e macacos, dando-lhe os nomes populares de fruta de cotia ou fruta de macaco. É encontrada nas florestas montanhosas dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Piauí. Relatos apontam que o óleo extraído da *C. brasiliensis* tem função inseticida, parasiticida, é eficaz no combate à caspa, piolhos e nas manifestações herpéticas [2]. Com o agravamento da resistência de bactérias a antimicrobianos, surge a necessidade de encontrar novas substâncias alternativas no combate a esses microrganismos, principalmente os de origem hospitalar [1]. Assim, o presente estudo visa prospectar componentes do metabolismo da espécie *Carpotroche brasiliensis*, cujo extrato vegetal demonstre ação antimicrobiana, evidenciando assim, potencial do uso dessa planta como agente antibacteriano.

Material e métodos

A. Coleta do material botânico

As folhas de *Carpotroche brasiliensis* foi coletada em áreas rurais do município de Joáima, MG. A coleta foi realizada em indivíduos dispostos aleatoriamente. A identificação da espécie foi realizada com utilização de exsicata depositada no Herbário Montes Claros, na Universidade Estadual de Montes Claros. Em seguida, o material vegetal foi seco a temperatura ambiente e moído em moinho tipo Wiley. Após a pulverização as amostras foram armazenadas em sacos de papel e mantidas sob refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).

B. Obtenção dos Extratos brutos hidroalcoólicos e Extratos Particionados

O extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Carpotroche brasiliensis* foi obtido a partir do material vegetal seco, realizou-se a maceração exaustiva das amostras com utilização dos solventes etanol: água (70:30), por um período de 48 horas. Após este período a solução foi filtrada em papel filtro qualitativo e concentrada em evaporador rotativo a 40°C , o resíduo da filtração foi novamente colocado em contato com solvente e o processo repetido três vezes consecutivas. Após evaporados os extratos foram combinados e liofilizados. Os extratos obtidos foram armazenados em frasco de vidro, ao abrigo da luz e sob refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).

Os extratos particionados foram obtido por meio do fracionamento do extrato bruto com solventes orgânicos de polaridade crescente como o hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol.

C. Prospecção Fitoquímica dos Extrato Brutos e particionados

A caracterização fitoquímica das folhas de *Carpotroche brasiliensis* foi realizada por meio de testes clássicos conforme Mouco (2003)

D. Bactérias utilizadas

Para a realização da atividade antibacteriana foram utilizadas cepas padrão provenientes da American Type Culture Collection (ATCC) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

E. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) extratos brutos e partições

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo conforme [6]. O caldo utilizado no presente teste foi o Müller-Hinton e os inóculos bacterianos para *S. aureus* (ATCC 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram normatizados previamente para se chegar a uma concentração de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL a partir do padrão de McFarland 0.5. As placas de Elisa usadas no testes passaram por uma higienização afim de evitar qualquer interferência externa nos resultados, elas foram esterilizadas com hipoclorito 5% durante 24 horas e em seguida foram lavadas com água destilada e submetidas à luz UV por 30 minutos. Os extratos brutos e particionados foram isoladamente testados em concentrações que variaram de 400-50 $\mu\text{g/mL}$, em um intervalo de 50 $\mu\text{g/mL}$ a cada



concentração. Em cada poço havia 20µL de inóculo bacteriano mais o caldo, que variavam em quantidade de forma que todo o material depositado ocupassem até 100µL em cada poço. Foi utilizado como controle negativo o meio caldo adicionado da solução de extrato e como controle positivo o meio caldo adicionado do inóculo bacteriano. Para evitar a desidratação dos meios, as placas foram seladas com filme plástico estéril e colocadas em uma estufa bacteriológica a 35°C. Após 24 horas de incubação foi adicionado 30µL de solução estéril de resazurina 0,02%. Esperou-se 2 horas e realizou-se a leitura das placas pela interpretação visual da cor contida em cada poço. A cor azul indica ausência de crescimento bacteriano e coloração róseo-avermelhada, presença de bactérias.

Os testes foram feitos em triplicata e a concentração bactericida mínima (CBM) dos isolados dos extratos brutos e particionados foi realizado com a retirada de 50 µL dos poços controles de todas as situações em que não houve crescimento bacteriano aparente demonstrado pela resazurina, este foi então será plaqueado o conteúdo em Ágar Müller-Hinton, sendo o mesmo incubado por 20 horas à 37°C. A ausência de crescimento bacteriano indicou a concentração bactericida mínima.

Resultados e Discussão

A análise fitoquímica realizada com as folhas de *Carpotroche brasiliensis* permitiu caracterizar através de testes clássicos a presença de alguns compostos de importância comercial, foram confirmados a presença de taninos através do desenvolvimento da coloração negra na reação com cloreto férrico e a formação de um precipitado branco na reação com solução aquosa de alcaloides; Para a reação de acetato neutro de chumbo era esperado a formação de um precipitado castanho avermelhado mas formou-se um precipitado amarelo esbranquiçado; A reação com acetato de cobre apresentou claramente a presença de um precipitado castanho avermelhado; Na Reação específica de taninos: Reação com ácido acético glacial e acetato de chumbo era esperado a formação de um precipitado castanho avermelhado mas foi observado um precipitado amarelo acastanhado [5]. Todas as reações para taninos foram positivas mas nem todas apresentaram a coloração esperada, possivelmente porque não há reações específicas para uma determinada espécie. Segundo estudos, os taninos são importantes devido a ação antimicrobiana de muitas espécies vegetais [4]. Foi identificado também saponinas através da formação de espuma persistente por mais de 15 min. [5]. Para os testes de identificação de flavonóides foi detectado uma coloração vermelha que indica sua presença de acordo com a reação de Shinoda, também houve a detecção de uma intensa fluorescência da amostra através da reação de cloreto de alumínio. A identificação de alcalóides foi realizado a partir das extrações ácidas e básicas do material vegetal, após esta preparação foi feito os testes com reativos gerais de alcalóides - Dragendorff, Mayer e Bouchardart, Bertrand [5]. Para o reativo Mayer o resultado foi negativo; para o Reativo Dragendorff houve a formação da coloração castanha; para Bouchardart houve a formação da coloração vermelho tijolo e para Bertrand formou-se a coloração vermelho tijolo como era esperado. Em apenas um dos testes, o Bouchardart [5], o resultado foi positivo, nos demais testes não foi possível obter resultados como era esperados pela metodologia.

De acordo com os ensaios realizados para avaliar a CIM do extrato bruto e do extrato particionado da espécie *C. brasiliensis* houve ação bactericida somente nas concentrações de 400 µg/mL para todos os testes (tabela 1).

Para a CBM dos isolados dos extratos brutos e partições foi detectado atividade bacteriostática dos extratos. Esse resultado se deu pelo crescimento bacteriano no repique dos poços que não apresentaram o crescimento de microorganismos na CIM, o teste foi feito em triplicata. Deste modo não foi possível definir a concentração bactericida mínima pois o desempenho das bactérias em relação aos extratos apenas inibiu o crescimento, tendo assim, efeito bacteriostático.

Conclusão

A espécie *C. brasiliensis* apresenta compostos com importante ação microbicida mas esta só conseguiu inibir fracamente o crescimento dos micro-organismos.

A análise da atividade antimicrobiana da espécie *C. brasiliensis* demonstra ação bactericida somente em uma das concentrações dos testes da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Não foi possível determinar a Concentração bactericida mínima (CBM) pois os extratos só obtiveram nas concentrações avaliadas frente as bactérias, ação bacteriostática.



Agradecimentos

Agradeço aos meus colegas que me auxiliaram sempre que precisei. Ao Laboratório de Ecologia de Microrganismos e Microbiologia Ambiental por ter me possibilitado a execução de parte do meu trabalho. E meu sincero agradecimento ao CNPq pelo incentivo e auxílio financeiro durante meu trabalho.

Referências

- [1] BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hamburger bovino e testes de aceitação.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- [2] CORRÊA, M. P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. II.
- [3] MARINS, Katiuska. et al. Atividade antimicrobiana das folhas Casearia decantra Jacq.. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 92 (4):295-298,2011.
- [4] MOUCO, GB; BERNARDINHO, MJ; CORNÉLIO, ML. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 2003;31(2):68-73.
- [5] NCCLS. National Commitee for Clíical Laboratory Standards. **Metodologia dos testes de sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para bactérias de Crescimento Aeróbico.** Norma Aprovada – Sexta Edição. V.23, n.2, 2003a. (Atual CLSI- Labotatóry Standards Institute).
- [6] PEREIRA, Renata Junqueira; CARDOSO, Maria das Graças. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol 3, 2012. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. 2001. Disponível em: </www1.ibge.gov.br/ibge/estatistica/indicadores/agropecuária/lspa/default.shtm>. Acesso em: 01 Jan. 2001.

Tabela 1. Teste para avaliar a Concentração Inibitória Mínima dos extratos brutos e particionados da espécie *C. Brasiliensis*. Os resultados foram emitidos por sinais para auxiliar na interpretação, sendo (+) presença de ação inibitória em microorganismos e (-) ausência de ação inibitória em microorganismos.

Tipo de Bactéria	Tipo de Extrato	Concentração µg / ml do Extrato							
		400µg/ml	350µg/ml	300µg/ml	250µg/ml	200µg/ml	150µg/ml	100µg/ml	50µg/ml
<i>P. aeruginosa</i>	Bruto	+	-	-	-	-	-	-	-
	Particionado	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	Bruto	+	-	-	-	-	-	-	-
	Particionado	+	-	-	-	-	-	-	-