Atividade antioxidante e antimicrobiana de cascas de árvores nativas da Floresta Amazônica.

Antioxidant and antimicrobial activity of native tree barks from the Amazon Forest.

Gabriela Aparecida Gnoatto*, Solange Teresinha Carpes[†],
Bruno Henrique Fontoura[‡], Ellen Cristina Perin[§]

RESUMO

A procura por novas fontes de compostos bioativos, tem estimulado os estudos sobre os princípios ativos de plantas, atraindo atenção para a região Amazônica, devido a sua grande biodiversidade. Os principais compostos responsáveis pela atividade antioxidante (AA) e antimicrobiana são os compostos fenólicos. O objetivo deste estudo foi determinar o potencial antioxidante de extratos etanólicos de cascas de Samaúma e Maçaranduba oriundas da Floresta Amazônica. O teor de composto fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin Ciocalteu, atividade antioxidante pelo método do radical DPPH•, ABTS e FRAP e a atividade antimicrobiana pela concentração inibitória minima (CIM) contra *Escherichia coli* e *Bacilus cereus*. Os extratos apresentaram potencial bactereostática e alto potencial antioxidante contra as bacterias testadas. Uma elevada atividade antioxidante da Maçaranduba foi confirmado pelo baixo valor encontrado de EC50 (0,13 mg/mL) (EC50: concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH), ou seja, quanto menor o valor do EC50, maior é a capacidade antioxidante desses extratos. O extrato de Maçaranduba apresentou potencial para uso como antioxidante e bactereostático natural em produtos alimentícios e farmacêuticos.

Palavras-chave: antioxidantes, antibacteriano, *Ceiba Petandra*, *Manilkara Uberi*.

ABSTRACT

The search for new sources of bioactive compounds has stimulated studies on the active principles of plants, attracting attention to the Amazon region, due to its great biodiversity. The main compounds responsible for antioxidant (AA) and antimicrobial activity are phenolic compounds. This study, aimed to determine the antioxidant potential of ethanol extracts from Samaúma and Maçaranduba barks from the Amazon Forest. The total phenolic compound content was determined by the Folin Ciocalteu method, antioxidant activity by the DPPH•, ABTS and FRAP radical method and the antimicrobial activity by the minimum inhibitory concentration (MIC) against *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. The extracts showed bacteriostatic potential and high antioxidant potential against the tested bacteria. High antioxidant activity of Maçaranduba was confirmed by the low value found for EC50 (0.13 mg/mL) (EC50: minimum concentration necessary for the antioxidant to reduce the initial concentration of DPPH by 50%), that is, the lower the value of EC50, the greater the antioxidant capacity of these extracts. Maçaranduba extract showed potential for use as an antioxidant and natural bacteriostatic in food and pharmaceutical products.

Keywords: antioxidants, antibacterial, *Ceiba Petandra*, *Manilkara Uberi*.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem cerca de dez por cento de toda a flora mundial, no entanto, menos de um por cento das espécies vegetais brasileiras já foram estudadas e a caracterização quimica e potencial farmacológico dessa espécies foram determinadas (Ferreira, S.H., 2002). O grande interesse na extração de polifenólicos derivados de plantas, é devido a seu elevado poder de remoção de radicais livres, os quais, quando em excesso, estão associados com várias doenças degenerativas. A atividade antioxidante desses compostos, contribuem para a preservação da estrutura e das funções celulares, prevenindo os danos ocasionados pelo processo de oxidação celular (Silva et al., 2005; Souza et al., 2008; Bravo, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidade e antibacteriano das cascas das plantas de Samaúma (*Ceiba pentandra*) e Maçaranduba (*Manilkara uberi*).

2 MÉTODOS

As cascas de Samaúma (*Ceiba pentandra*) e Maçaranduba (*Manilkara uberi*) foram coletadas na Floresta Amazônica. As cascas foram gentilmente doadas pela empresa de extração de óleos essenciais Fonte Clara Indústria e Comércio de Produtos Naturais Ltda, localizada em Pato Branco – PR.

As cascas foram secas em estufa a 40 ºC durante 48 h e moídas em moinho de facas. Para o preparo dos extratos etanólicos foram pesados separadamente tubo tipo Falcon, 0,5 g da casca desidratada e moída de cada planta e adicionado 30 mL de etanol 20% v/v. Os tubos foram homogeneizado em vortex e colocados em banho-maria a 80ºC, por 1 hora. Os tubos foram homogeneizados em vortex a cada 20 minutos. Após o tempo de extração, os extratos foram filtrados em papel filtro e os sobrenadantes foram armazenados no freezer a -15 ºC. Todo o processo e estudos realizados nos laboratórios da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – campus Pato Branco.

2.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi realizado através do método espectrofotométrico de Folin Ciocalteau, utilizando ácido gálico como padrão de referência, descrito por Sigleton et al. (1999). Em aliquotas de 500 µL do extrato de cada planta foi adicionado 2,5 mL da solução de Folin Ciocalteau 10% e 2,0 mL de bicarbonato de sódio 4%. As soluções foram homogeneizadas em vortex e colocadas em repouso ao abrigo da luz em temperatura ambiente durante 2 horas. Após o repouso, foram realizadas as leituras da absorbância a 740nm (Naczk et al., 2004). O resultado foi expresso em mg de EAG/g de planta (EAG: Equivalente em ácido gálico) e a análise foi feita em triplicata.

2.2 Potencial atividade antioxidante dos extratos

A atividade antioxidante (AA) dos extratos das plantas foram determinados por três métodos: sequestro do radical DPPH$^{\bullet}$ (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), sequestro do radical ABTS (2,-2′ -azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid) e poder antioxidante do Ferro (FRAP).

A atividade antioxidante pelo método do DPPH foi determinada com uma alíquota 500 µL do extrato, 3 mL de etanol P.A. e 3 µL da solução do radical DPPH$^{\bullet}$ 0,5 mM em etanol. A atividade por esse método foi expressa em termos de EC_{50} (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH$^{\bullet}$ inicial da reação). O decréscimo da absorbância foi lida em 517 nm e monitorada a cada 20 min até atingir a

estabilidade em 80 min após o início da reação. O EC_{50} foi calculado pela media da regressão linear entre a concentração do extrato em mg/mL (eixo X) e a media da % de AA (eixo Y) de acordo com a equação 1 (Brand-Willians et al., 1995). Para essa análise, o extrato de casca de Samaúma foi diluido em concentrações de 66,67 mg/mL até 13,33 mg/mL, enquanto que o extrato de Maçaranduba foi preparado em concentração de 0,33 à 0,08 mg/mL. Os extratos foram diluidos em concentrações diferentes, em função das diferenças na composição dos compostos bioativos e características físicas e químicas de cada planta. A determinação do do EC_{50} foi realizada em triplicata. A AA também foi expressa em mg de Trolox/g de cascas, usando uma curva padrão de Trolox.

$$\%AA = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\} \quad (1)$$

A atividade antioxidante pelo método do ABTS foi efetuado de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999) e a leitura da absorbância dos extratos foram avaliados em 734 nm. Os resultados foram expressos em µmol de Trolox/g de amostra.

A atividade antioxidante pelo poder de redução do ferro foi procedida pelo método de Firuzi et al. (2005), com a curva padrão de sulfato ferroso ($FeSO_4 .7H_2$) 2000 µM. A reação ocorreu na presença de 2,4,6-tri (2 -pyridyl) -1,3,5-triazine (TPTZ) e as abosrbâncias das amostras foram lidas a 595 nm. Os resultados foram expressos em µmol Fe^{2+}/g de casca.

2.3 Atividade antimicrobiana

A concentração inibitória minima (CIM) dos extratos foi determinada baseada no teste de microdiluição em caldo, em microplacas de 96 poços, empregando duas bactérias: *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*. Uma alíquota de 50 µL de solução bacteriana previamente reativada foi colocado em 50 mL de caldo BHI, obtendo uma concentração em torno de $1\text{-}2x10^5$ UFC/mL. Na microplaca foi adicionado 190 µL de caldo BHI previamente inoculado, e 10 µL de cada extrato etanólico das plantas em concentrações de 16,67 mg/mL a 0,26 mg/mL para Samaúma e 66,67 mg/mL a 1,04 mg/mL para a Maçaranduba. O clorafenicol 0,12% (m/v) e o etanol 20% v/v foram utilizados como controle positive e negative, respectivamente. As placas foram incubadas a 37ºC por 24 horas. A resazurina (30 µL, 0,01% m/v) foi utilizada para revelar os poços positivos. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expresso em mg/mL.

Para o teste de concentração bacterida mínima (CBM), uma alíquota de 10 µL de cada teste positivo da CIM foi retirado e inoculados em placas de ágar BHI.

3. RESULTADOS

3.1 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

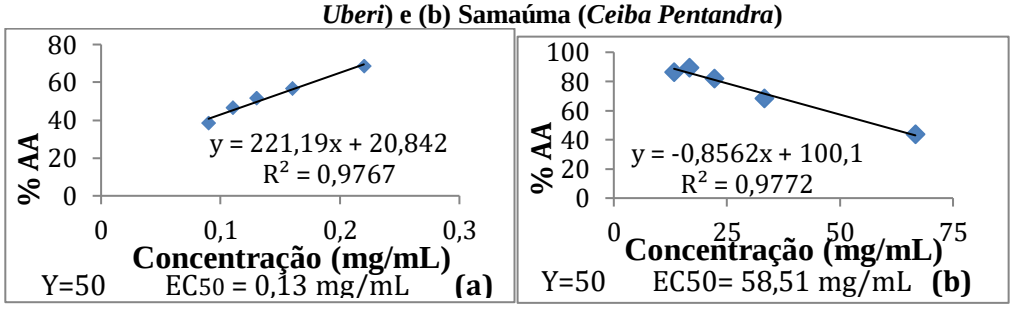
O teor de compostos fenólicos totais dos extrato etanólico das cascas das plantas analisadas foram de 24,32 mg EAG (equivalente em ácido gálico)/g de Samaúma e 193, 25 mg EAG/g de Maçaranduba. Os resultados foram calculados a partir da equação de reta da curva padrão de ácido gálico y = 0,0074x – 0,3926, R2 = 0,9916 e pelas leituras das absorbâncias no espectrofotômetro a 740 nm. Os valores encontrados do teor de compostos fenólicos dos extratos etanólicos das plantas foram altos, podendo ter uma capacidade de atividade antioxidante, pois alguns autores associam os teores de compostos fenólicos com a atividade antioxidante (Park et al., 1995).

Nas análises do teor da atividade antioxidante pelo método DPPH• que consistiram em resultados de 21,70 mg TE (capacidade antioxidante equivalente em trolox)/g de Samaúma e 251,54 mg Trolox/g de Maçaranduba. Esses valores foram calculados com base na curva padrão de Trolox com a equação da reta y = -0,0032x + 0,7883, R2 = 0,9969 e absorbâncias lidas no espectrofotômetro a 517 nm. Na análise de atividade antioxidante pelo método DPPH• dos extratos etanólicos das plantas, foi possível observar valores consideravelmente bons.

Os valores encontrados da atividade antioxidante em EC50 para os extratos etanólicos Maçaranduba (*Manilkara uberi*) e Samaúma (*Ceiba pentandra*), respectivamente foram de 0,13 mg/mLe 58,51 mg/mL (Figura 1). Cabe salientar que qunto menor for o valor do EC50, maior é a atividade antioxidante do composto (Carvalho et al., 2003).

Pela análise da Figura 1, percebeu-se que a planta Samaúma (*Ceiba pentandra*) possui uma atividade pró-oxidante, uma vez que em concentrações maiores do extrato a atividade antioxidante diminui. Já a Maçaranduba (*Manilkara uberi*) obteve-se um valor de EC50 final muito baixo, significando que sua atividade antioxidante é maior em comparação os extratos de cascas das Samaúma.

Figura 1 – Cálculo do EC50 para os extratos etanólicos das cascas das plantas, (a) Maçaranduba (*Manilkara Uberi*) e (b) Samaúma (*Ceiba Pentandra*)



Fonte: Autoria própria (2021)

A atividade antioxidante pelo sequestro do ABTS nas cascas de Maçaranduba (2457,31 mg Trolox/g amostra) também foi superior ao da Samauma que apresentou valores de 51,65 mg Trolox/g de amostra. O método FRAP é realizado para observar o potencial antioxidante de compostos que são redutores de Ferro. Característica muito comum entre os compostos fenólicos e se dá por reações de transferências de elétrons. A atividade redutora dos extrato etanólico das cascas das plantas analisadas foram de 192,96 mg Fe^{2+}/g de Samaúma e 7285,71 Fe^{2+}/g de Maçaranduba. A Maçaranduba mostrou uma maior atividade antioxidante pelos três métodos utilizados nesse estudo.

3.2 Atividade antimicrobiana dos extratos de cascas de Samaúma e Maçaranduba

A análise demonstrou que o etanol utilizado nas extrações não apresentou nenhuma ação inibitória e o antibiótico clorafenicol, utilizado como controle positivo, apresentou a mesma ação com todas as bactérias utilizadas para a análise, inibindo o crescimento bacteriano. Nas concentrações testadas (16,67 mg/mL a 0,26 mg/mL), o extrato etanólico de Samaúma apresentou inibição da *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* em concentração do extrato de >0,825 mg/mL. Entretanto, o extrato de Maçaranduba foi mais eficiente contra as bacterias testadas, apresentando uma CIM de 0,825 contra a *Escherichia coli* e de 0,052 mg/mL contra o *Bacillus cereus*. Os extratos das cascas de Maçaranduba foram bactericidas na concentração de 0,208 mg/mL contra a *Escherichia coli* e 0,420 mg/mL contra o *Bacillus cereus* (Tabela 1).

Tabela 1 – Atividade antibacteriana de extratos de cascas das plantas

Bactérias	Extrato de cascas de Samaúma		Extrato de cascas de Maçaranduba	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Escherichia coli	≥0,825	≥0,825	≥0,825	≥0,208
Bacillus cereus	≥0,825	≥0,825	≥0,052	≥0,420

CIM: Concentração inibitória minima, CBM: Concentração bactericida minima
Fonte: Autoria própria (2021).

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados, mostraram que extratos etanólicos das cascas das plantas possuem potencial antioxidante pelo método DPPH$^{\bullet}$ (EC_{50}); ABTS e FRAP. Neste estudo foi observado uma relação pró-antioxidante da planta Samaúma (*Ceiba Pentandra*), tendo uma característica interessante para que novas investigações científicas possam ser realizadas mais à frente. Os resultados mostraram valores significativos, sendo que a Maçaranduba (*Manilkara Uberi*) se expressou consideravelmente superior aos outros extratos analisados.

Os resultados decorrentes das análises realizadas para a atividade antioxidante das plantas analisadas Maçaranduba (*Manilkara Uberi*) e Samaúma (*Ceiba Pentandra*) se expressaram de forma positiva, podendo no futuro serem realizados mais estudos para aplicação em indústrias farmacêuticas, alimentícias.

Além da expressiva atividade antioxidante, os extratos de cascas de Maçaranduba apresentou uma maior inibição contra os dois microrganismos testados (*Escherichia coli* e *Bacillus cereus*). Para análise da CBM apenas amostras de Maçaranduba apresentou ação bactericida. Desta forma o extrato etanólico de Maçaranduba apresentam caráter bacteriostático e bactericida contra as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus cereus*.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a fundação Araucária pela bolsa de Iniciação Científica, a Capes pela bolsa de pós-doc e a UTFPR pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity**. LWT - Food Science and Technology, v.28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. **Polyphenols : Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance**. Nutrition Reviews, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. **Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer**. *Life Sciences*, v. 74, p. 2157 – 2184, 2004.

CARVALHO, J. T.; ALMANÇA, C. C. J. **Formulário de Prescrição Fitoterápica**. São Paulo: Atheneu, 2003.

ESPIN, J.C.; SOLOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCIA-VIGUERA, C. **Anthocyanin-based natural colorants**: A new source of antiradical activity for foodstuff. *Journal Agricultural Food Chemistry.*, v. 48, p. 1588-1592, 2000.

FERREIRA, S.H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. 2002.

FIRUZI, O.; LACANNA, A.; PETRUCCI, R.; MARROSU, G.; SASO, L. **Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by ‘‘ferric reducing antioxidant power’’ assay and cyclic voltammetry**. Biochimica et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1721, n. 1-3, p. 174-184, 2005.

IACOPINI, P.; BALDI, M.; STORCHI, P. & SEBASTIANI, L. Catechin**, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions**. *Journal of Food Composition Analysis*, 21, p. 589-598, 2008.

LEJA, M.; MARECZEK, A.; WYZGOLIK, G.; KLEPACZ-BANIAK, J.;CZEKONSKA, K. **Antioxidative properties of bee pollen in seleted plant species. Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 237-240, 2007.

NACZK M, SHAHIDI F. **Extraction and analysis of phenolics in food. J Chromatogr A** 2004;1054 (1/2): 95-111.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. **Estudo de alguns componentes da própolis coletada por Apis mellifera no Brasil. Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n.4, p. 1235-1259, 1995.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. (1999). **Antioxidant activity applying an improved ABTS$^{\bullet+}$ radical cation decolorization assay**. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231–1237.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNO, M.N.; FALCAO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M.; NOGUEIRA, F.L.P.; QUARESMA, C.H.; SILVA, J.F.M.; MENEZES, F.S.; ELEUTHERIO, E.C.A. **Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. Pharmacological Research**, v. 52, nº 3, p.229–233, 2005.

SINGLETON, V.; LIBBEY, L. M.; WALRADT, J. P**. analisis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Anitoxidants by Means Of Folin-Ciocalteu Reagent.**

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M.; LOIR, A.; REES, J.F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. **Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological in vitro assays**. Food Chemistry, v. 106, nº 1, p. 331–339, 2008.