

ATIVIDADE IN VITRO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE COPERNICIA PRUNIFERA (ARECACEAE) CONTRA BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA EM SAÚDE PÚBLICA

DOI: 10.25110/arqsaude.v27i1.20239102

Recebido em: 03/01/2023

Aceito em: 03/02/2023

Wenderson Costa da Silva ¹
Antônia Fernanda Lopes da Silva ²
Francisléia Falcão França Santos Siqueira ³
Márcio Leonardo de Moraes Nobre ⁴
Fátima Maria de Sousa Pereira ⁵
Karine Costa Melo ⁶
Francinete Sousa de Oliveira ⁷
Chrisllayne Oliveira da Silva ⁸
Alanna Nunes Soares ⁹
Francisco das Chagas Araújo Sousa ¹⁰
Francisco Laurindo da Silva ¹¹

RESUMO: Introdução: O aumento contínuo da resistência bacteriana aos antibióticos convencionais é um problema de importância global. Encontrar produtos como alternativas terapêuticas naturais é essencial. As plantas medicinais possuem uma composição química muito rica, que podem ser estruturalmente otimizadas e processadas em novos antimicrobianos. Objetivo: Avaliar o potencial antibacteriano frente a

¹ Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). E-mail: wendersoncosta09@hotmail.com
Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6031-9775>

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). E-mail: nandalopesslp@hotmail.com
Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-1296-8767>

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). E-mail: leiafalcao7@gmail.com
Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7021-3640>

⁴ Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas aos Animais de Interesse Regional pela Universidade Federal do Piauí (UFPI). E-mail: marcio.leo.nobre@gmail.com
Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-3341-2020>

⁵ Doutora em Ciências de Materiais pela Universidade Federal de Pernambuco.
E-mail: fatima.pereira@ifma.edu.br Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-2948-0971>

⁶ Especializanda em Gestão e Saúde pela Universidade Federal do Maranhão (UFMA).
E-mail: karinemelo09@gmail.com Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8253-859X>

⁷ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ambiente e Saúde pela Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). E-mail: fransouoliveira@gmail.com
Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7171-1828>

⁸ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências e Saúde pela Universidade Federal do Piauí (UFPI). E-mail: chris-layne10@hotmail.com. Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0844-0268>

⁹ Pós-graduanda em Saúde Pública, Saúde da Família. E-mail: alanna_ns@hotmail.com
Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0904-4515>

¹⁰ Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal do Piauí (UFPI).
E-mail: franciscoaraujo@ccs.uespi.br Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-8086-2150>

¹¹ Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
E-mail: flspb@yahoo.com.br Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-6837-4509>

microrganismos humanos potencialmente patogênicos do extrato etanólico e frações de *Copernicia prunifera*. Metodologia: 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*. Resultados: A triagem fitoquímica revela a presença de taninos, flavonoides, esteroides, triterpenóides, saponinas e alcaloides. Os extratos etanólico e frações da casca do caule e folhas tiveram atividade inibitória contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* com zona de inibição que variou de $7,0\pm 1,73$ a $9,33\pm 0,58$ mm pelo método de difusão em disco. Pelo método de microdiluição em caldo os extratos foram satisfatórios somente contra *K. pneumoniae* (CIM = 125 a 1000 $\mu\text{g/mL}$) *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* se mostraram resistentes aos testes (CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$). Conclusão: Esses resultados fornecem uma base para futuras investigações em modelos *in vivo*, para que os compostos de *C. prunifera* possam ser aplicados no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra *K. pneumoniae*.

PALAVRAS-CHAVE: Bactérias; Carnaúba; Triagem Fitoquímica; Metabólitos Secundários.

IN VITRO ACTIVITY OF EXTRACTS AND FRACTIONS OF COPERNICIA PRUNIFERA (ARECACEAE) AGAINST BACTERIA OF CLINICAL IMPORTANCE IN PUBLIC HEALTH

ABSTRACT: Introduction: The continuous increase in bacterial resistance to conventional antibiotics is a problem of global importance. Finding products as natural therapeutic alternatives is essential. Medicinal plants have a very rich chemical composition, which can be structurally optimized and processed into novel antimicrobials. Objective: To evaluate the antibacterial potential against potentially pathogenic human microorganisms of the ethanolic extract and fractions of *Copernicia prunifera*. Methodology: Phytochemical screening of plants was performed using precipitation and staining methods and antibacterial activity using the disk diffusion and broth microdilution method against standardized strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Results: Phytochemical screening reveals the presence of tannins, flavonoids, steroids, triterpenoids, saponins and alkaloids. The ethanolic extracts and fractions of stem bark and leaves had inhibitory activity against *S. aureus* and *K. pneumoniae* with zone of inhibition ranging from 7.0 ± 1.73 to 9.33 ± 0.58 mm by disc diffusion method. By broth microdilution method the extracts were satisfactory only against *K. pneumoniae* (MIC = 125 to 1000 $\mu\text{g/mL}$) *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli* were resistant to the tests (MIC > 1000 $\mu\text{g/mL}$). Conclusion: These results provide a basis for further investigation in *in vivo* models, so that compounds from *C. prunifera* can be applied in the development of new antimicrobial agents against *K. pneumoniae*.

KEYWORDS: Bacteria; Carnauba; Phytochemical Screening; Secondary Metabolites.

ACTIVIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE COPERNICIA PRUNIFERA (ARECACEAE) FRENTE A BACTERIAS DE IMPORTANCIA CLÍNICA EN SALUD PÚBLICA

RESUMEN: Introducción: El continuo aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales es un problema de importancia mundial. Es esencial encontrar productos como alternativas terapéuticas naturales. Las plantas medicinales

tienen una composición química muy rica, que puede optimizarse estructuralmente y transformarse en nuevos antimicrobianos. Objetivo: Evaluar el potencial antibacteriano frente a microorganismos humanos potencialmente patógenos del extracto etanólico y fracciones de *Copernicia prunifera*. Metodología: Se realizó el cribado fitoquímico de las plantas mediante los métodos de precipitación y tinción y la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en disco y microdilución en caldo frente a cepas estandarizadas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Resultados: El cribado fitoquímico revela la presencia de taninos, flavonoides, esteroides, triterpenoides, saponinas y alcaloides. Los extractos etanólicos y las fracciones de la corteza del tallo y las hojas presentaron actividad inhibitoria contra *S. aureus* y *K. pneumoniae* con una zona de inhibición que osciló entre $7,0 \pm 1,73$ y $9,33 \pm 0,58$ mm por el método de difusión en disco. Por el método de microdilución en caldo, los extractos sólo fueron satisfactorios frente a *K. pneumoniae* (CMI = 125 a 1000 $\mu\text{g/mL}$). *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* fueron resistentes a las pruebas (CMI > 1000 $\mu\text{g/mL}$). Conclusiones: Estos resultados proporcionan una base para futuras investigaciones en modelos in vivo, de modo que los compuestos de *C. prunifera* puedan aplicarse en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos contra *K. pneumoniae*.

PALABRAS CLAVE: Bacterias; Carnauba; Screening Fitoquímico; Metabolitos Secundarios.

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços técnicos-científicos, as doenças infecciosas ocupam posição de destaque como causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Isso ocorre devido a habilidade dos microrganismos se tornarem resistentes a uma linha de antibióticos robusta, diminuindo a eficácia terapêutica. Tal habilidade impõe a necessidade de estudos com foco no desenvolvimento de novos antimicrobianos a serem utilizados no combate e/ou no controle desses patógenos (MUNITA; ARIAS, 2016).

Nesse contexto, a busca por substâncias com atividade antimicrobiana tem direcionado a atenção especial as plantas medicinais, entre elas, a da flora brasileira. Nesse cenário, o Brasil é o país com maior proporção de biodiversidade, por volta de 15% a 20% do total no mundo (BRASIL, 2016; MUNITA; ARIAS, 2016).

Dentro dessa diversidade biológica, encontra-se a Carnaúba, carnaíba ou carnaubeira (*Copernicia prunifera*, Arecaceae), que é uma árvore nativa do nordeste do Brasil, do bioma da caatinga, localizada sobretudo nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte e em menor densidade no Tocantins, Goiás, no Norte de Minas Gerais e vale do São Francisco. Tudo na *C. prunifera* pode ser utilizado, tronco, frutos, folhas, palmito, raízes e as sementes, para alimentação, artesanato, cosméticos e produtos farmacêuticos. O pó cerífero (cera) é o produto de maior importância econômica (BRASIL, 2014).

A cera recobre as folhas, principalmente as mais jovens, tornando-a internacionalmente conhecida como “carnauba wax” (DE SOUSA *et al.*, 2015). Esta cera tem grande importância, onde tem sido utilizada como matéria-prima para diversos produtos industriais (DE FREITAS *et al.*, 2019).

Além de oferecer possibilidades de atividades econômicas diversas, as raízes têm uso medicinal; e a cera entra na composição de diversos produtos na indústria farmacêutica (CAVALCANTI, 2014). No entanto, considerando que a Carnaúba possui uma composição química diversificada, e é amplamente utilizada em processos industriais, incluindo a fabricação de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos, surpreendentemente poucos estudos investigaram sua atividade antimicrobiana (ANDRADE *et al.*, 2018).

Em revisão sobre o perfil fitoquímico da Carnaúba, foi identificada a presença de fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, saponinas, esteroides livres, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavonoides e xantonas, que são compostos com reconhecidas atividades biológicas, entre elas, antibacteriana, antifúngica e antiviral (SILVA *et al.*, 2017; ANDRADE *et al.*, 2018).

Embora *C. prunifera* seja hoje reconhecida como uma planta nativa brasileira com crescente interesse em pesquisa e aumento do uso comercial e industrial de produtos terapêuticos, pode-se afirmar que o potencial terapêutico da casca do caule e folhas não foi totalmente explorado. Até onde sabemos, os compostos dos extratos da casca do caule e folhas desta espécie não foram analisados quanto o potencial *antimicrobiano contra as cepas aqui testadas*. Considerando esse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano frente a microrganismos humanos potencialmente patogênicos do extrato etanólico e frações de *Copernicia prunifera*. Além disso, o perfil fitoquímico foi avaliado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e Identificação de Material Vegetal

Para os testes, foram utilizadas folhas e casca do caule de *C. prunifera*, 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 4142. Registrada no Sistema Distribuído de Informação que Integra Dados Primários de Coleções Científicas (SpeciesLink).

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 bomba de vácuo (Primatec 132) para remoção dos solventes e obtenção do extrato bruto.

2.3 Fracionamento Químico

Os extratos etanólicos de *C. prunifera* 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. prunifera* em: hexano (FHX), 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

O padrão de suscetibilidade aos extratos de *C. prunifera* de cada isolado foi determinado pelo método de difusão em disco de acordo com Bauer *et al.* (1966) em

placas de ágar Mueller-Hinton (MH, Kasvi). As suspensões de bactérias de teste padronizadas (equivalente ao padrão 0,5 de McFarland $1,0 \times 10^8$ UFC/ml) foram inoculadas uniformemente em toda a superfície de ágar MH usando swabs estéreis. Discos de papel de filtro de 6 mm (KAJ-LAB) com as diferentes frações separadamente, nas concentrações: 1,0, 2,5, 5,0, 10, 25, 50 e 100 mg/mL foram colocados nas placas inoculadas após o disco ser embebido com 15 μ l dos extratos diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Foi utilizado como controle positivo discos de antibióticos de ciprofloxacina (CIP: 5 μ g), e como controle negativo DMSO a 10%.

As placas foram incubadas invertidas em estufa microbiológica (36 ± 1 °C por 24 h). Todos os testes foram realizados em três réplicas. 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; SOYINGBE; MONGALO; MAKHAFOLA, 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. A proporção de DMSO utilizada foi inferior a 5%, o que é considerado não tóxico para cepas bacterianas (KOCISIS; HARKAWAY; SNYDER, 1975).

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 μ L de BHI previamente inoculado nos poços da placa de microdiluição, em seguida, 100 μ L do extrato e frações foram adicionados aos poços da linha A, homogeneizou-se e retirou-se 100 μ L de cada poço da linha A para a linha B e, assim sucessivamente, até os poços da linha G, do qual foi retirado 100 μ L e descartados. Assim, foram realizadas sete diluições obtendo-se concentrações variando de 4000 a 62,5 μ g/mL. Após 24 h de incubação, foram adicionados 20 μ L de resazurina (0,01%) e após 1 h de reação, as leituras foram realizadas.

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).

2.5 Análise Fitoquímica

A prospecção fitoquímica de metabólitos secundários no extrato etanólico e frações de *C. prunifera* 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, 150µL de cloreto férrico (FeCl₃, 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 realizada 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.

Na identificação dos 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. 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). Homogeneizando-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 foram inseridos no Microsoft Excel para computar estatísticas descritivas da 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) para dois grupos foram analisados pelo teste paramétrico T Student para amostras independentes, e para os dados que não atenderam esses pressupostos, foram analisados pelo Teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os dados com três ou mais grupos que atenderam os pressupostos de normalidade e homogeneidade foram analisados pela análise de variância Two-Way ANOVA. Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1 Triagem Fitoquímica

A prospecção fitoquímica das classes de metabólitos secundários da folha e casca do caule de *C. prunifera* são mostradas na Tabela 1.

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

Compostos	<i>C. prunifera</i> (Folhas)					<i>C. prunifera</i> (Casca do caule)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Taninos hidrolisáveis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos condensados	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Fenóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Esteroides livres	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Triterpenóides pentacíclicos livres	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Saponina	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
Alcaloide	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+

Reação: presente (+); ausente (-); 1 - Fração Bruta; 2 - Fração Hexânica; 3: Fração clorofórmica; 4: Fração Acetato de Etila; 5: Fração Hidrometanólica.

Fonte: Os autores, 2022.

Os taninos hidrolisáveis e fenóis não estavam presentes em nenhuma parte desta espécie sob essa condição de extração. Os taninos condensados estavam presentes em quase todas as frações de *C. prunifera*, exceto na FCl das folhas e Fhex da casca do caule. Os flavonoides estavam presentes na FBr, FAc e FHi de ambas as partes do espécime, exceto nas FHex e FCl.

Os esteroides livres ocorrem somente na FBr das folhas e na FHex e FCl da casca do caule, enquanto que os triterpenóides pentacíclicos livres estavam presentes somente na FHex das folhas e FBr, FAce e FHi da casca do caule. *As saponinas estavam presentes somente na FHex e na FAce das folhas, e na FCl da casca do caule, enquanto os alcaloides estavam presentes na FBr e FHi das folhas e FBr, FCl e FHi da casca do caule de C. prunifera.*

3.2 Atividade Antimicrobiana

Os resultados da atividade antibacteriana do extrato bruto e frações das folhas de *C. prunifera* são mostrados na Tabela 2. Através do método de difusão em disco, os extratos tiveram baixa atividade antimicrobiana somente nas frações FBr e FHi das folhas e FCl e FAce da casca do caule de *C. prunifera* com halos de inibição variando de $7,0\pm 1,73$ a $9,33\pm 0,58$ mm. Os extratos não inibiram o crescimento microbiano de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Em termos de zona de inibição *S. aureus* foi o mais sensível apresentando halos de $9,33\pm 0,58$ mm na FBr das folhas na concentração de 100 mg/mL. Os resultados mostram atividade da FBr das folhas contra *K. pneumoniae* na concentração de 100 mg/mL, enquanto que *S. aureus* apresentou atividade a partir da concentração de 50 mg/mL ($8,33\pm 0,58$ mm).

A FHi das folhas apresentou atividade na concentração de 50 e 100 mg/mL ($7,67\pm 0,58$ e $8,67\pm 0,58$ mm) contra *S. aureus* e a 100 mg/mL ($7,0\pm 1,73$ mm) contra *K. pneumoniae*. A FCl na concentração de 100 mg/mL da casca do caule foi a única fração capaz de inibir o crescimento de *K. pneumoniae* ($8,3\pm 3,23$ mm), enquanto que a FAce na concentração de 100 mg/mL foi capaz de inibir somente *S. aureus* ($8,0\pm 1,00$ mm), mostrando menor atividade na casca do caule de *C. prunifera*. Não foi observado concentrações menores capazes de inibir o crescimento microbiano dessas mesmas frações pelo método de difusão em disco.

Tabela 2. Atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações das folhas e da casca do caule de *C. prunifera*.

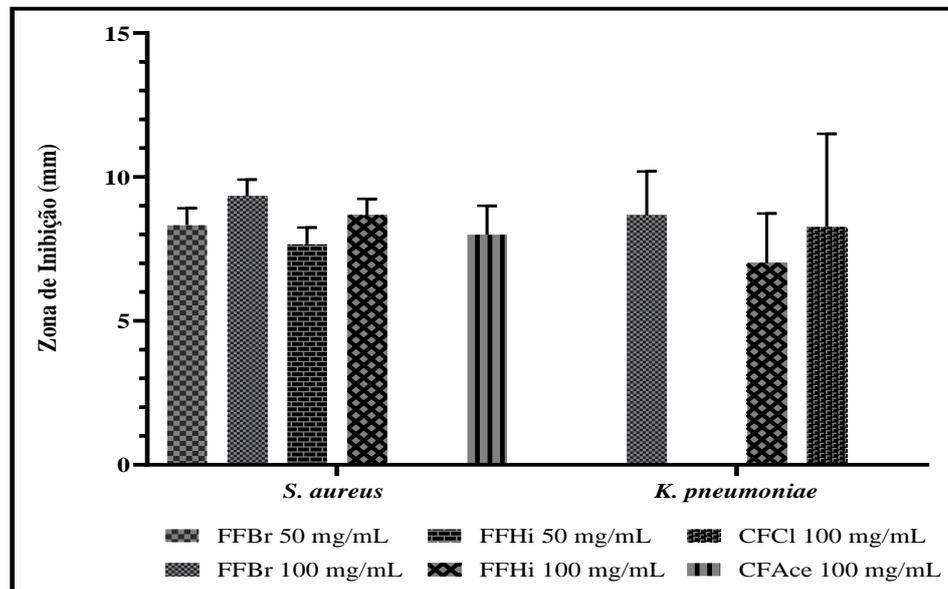
Fração	<i>S. a.</i>		<i>K. p.</i>		<i>E. c.</i>		<i>P. a.</i>					
	ATCC 25923		ATCC 13883		ATCC 25922		ATCC 27853					
	CI	ZI	C+	CI	ZI	C+	CI	ZI	C+	CI	ZI	C+
FFBr	50	8,33±0,58	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
	100	9,33±0,58	28	100	8,67±1,53	32	-	-	33	-	-	27
FFHex	-	-	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
FFCl	-	-	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
FFAce	-	-	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
FFHi	50	7,67±0,58	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
	100	8,67±0,58	28	100	7,0±1,73	32	-	-	33	-	-	27
CFBr	-	-	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
CFHex	-	-	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
CFCl	-	-	28	100	8,3±3,23	32	-	-	33	-	-	27
CFAce	100	8,0±1,00	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
CFHi	-	-	28	-	-	32	-	-	33	-	-	27
Dados estatísticos								p-valor ¹ = 0,094*				
								p-valor ² = 0,898*				

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão dos ensaios em três réplicas. *p*-valor¹: Teste U de Mann-Whitney; *p*-valor²: Teste T Student; F: Folha; C: Casca; FBr: Fração Bruta; FHex: Fração Hexânica; FCl: Fração Clorofórmica; FAce: Fração Acetato de Etila; FHi: Fração Hidrometanólica; CI: Concentração Inibitória (mg/mL); C+: Ciprofloxacina; -: Não ativo; *S. a.*: *Staphylococcus aureus*; *K. p.*: *Klebsiella pneumoniae*; *E. c.*: *Escherichia coli*; *P. a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; *: não significativo. Fonte: Os autores, 2022.

Em comparação entre as frações das folhas que tiveram resposta, o teste de Mann-Whitney mostra que não há diferença estatisticamente significativa entre a FBr e FHi ($p=0,094$). Com relação as frações da casca do caule, o teste T Student mostra que não há diferença estatisticamente significativa entre a FCl e FAce ($p=0,898$) de *C. prunifera*.

A Figura 1 mostra uma análise comparativa entre os extratos e frações das folhas e da casca do caule de *C. prunifera*. O teste Two-Way ANOVA mostra que não há diferença estatisticamente significativa ($p=0,399$).

Figura 1. Análise comparativa dos halos de inibição entre os extratos das folhas e casca do caule de *C. prunifera* contra bactérias de importância clínica em saúde pública. *p*-valor: Two-Way ANOVA; C: Casca; F: Folhas; FBr: Fração Bruta; FCl: Fração Clorofórmica; F Ace: Fração Acetato de Etila; FHi: Fração Hidrometanólica; *: Não significativo.



Fonte: Os autores, 2022.

3.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os valores de CIM (expressos em $\mu\text{g/mL}$) dos extratos de *C. prunifera* obtidos a partir de testes antibacterianos usando o método de microdiluição em caldo são apresentados na Tabela 3. Ao contrário do método de difusão em disco, a atividade antibacteriana mais potente foi exibida contra *K. pneumoniae* na FBr e F Ace da casca do caule a $125 \mu\text{g/mL}$, seguido da FBr das folhas a $250 \mu\text{g/mL}$ e FHex e F Ace a $500 \mu\text{g/mL}$. Curiosamente a cepa de *S. aureus* se mostrou mais resistente aos testes, apresentando, respectivamente, resposta somente a $2000 \mu\text{g/mL}$ na FBr e F Ace da casca do caule e FBr das folhas e a $4000 \mu\text{g/mL}$ na FCl e F Ace da casca do caule. Assim como pelo método de difusão em disco, as cepas *P. aeruginosa* e *E. coli* se mostraram resistentes aos extratos de *C. prunifera*, em que a F Ace foi a única fração capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* a $2000 \mu\text{g/mL}$. A *E. coli* não apresentou sensibilidade a nenhuma das frações teste.

Tabela 3. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos e frações da casca do caule e folhas de *C. prunifera* frente as bactérias ATCC.

Bactérias	Extratos CIM (µg/mL)									
	<i>C. prunifera</i> (Casca)					<i>C. prunifera</i> (Folha)				
	FBr	FHex	FCl	FAce	FHi	FBr	FHex	FCl	FAce	FHi
<i>K. p.</i>	125	-	2000	125	1000	250	500	1000	500	4000
<i>P. a.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	2000	-
<i>S. a.</i>	2000	-	-	2000	-	2000	-	4000	4000	-
<i>E. c.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FHex: Fração Hexânica; FCl: Fração Clorofórmica; FAce: Fração Acetato de Etila; FHi: Fração Hidrometanólica; CIM: Concentração Inibitória Mínima; µg/mL: microgramas por mL; NA = não ativo;

K. p.: *Klebsiella pneumoniae*; *P. a.*: *Pseudomonas aeruginosa*; *S. a.*: *Staphylococcus aureus*; *E. c.*: *Escherichia coli*.

Fonte: Os autores, 2022.

4. DISCUSSÃO

Nos ensaios antibacterianos, as frações que apresentaram CIMs ≥ 1.000 µg/mL contra as cepas testadas indicam atividades baixas a moderadas. De fato, CIMs ≥ 1.024 µg/mL não apresentam efeitos clinicamente relevantes contra determinada bactéria, pois concentrações acima disso requerem uma alta dose do produto natural para atingir essa concentração em níveis plasmáticos (HOLETZ, *et al.*, 2002; HOUGHTON *et al.*, 2007). As CIMs são referidas como o padrão-ouro para determinar a suscetibilidade dos organismos aos antimicrobianos. Um valor CIM mais baixo indica a necessidade de menos quantidade de droga para inibir o crescimento de organismos.

Nesse contexto, o estudo mostra que as cepas apresentaram resistência a maior parte dos extratos de *C. prunifera*, apresentando atividade inibitória em poucas frações contra *S. aureus* e *K. pneumoniae* pelo método de difusão em disco, e atividade inibitória moderada a fraca contra *K. pneumoniae* (CIM, 100–1000 µg/mL) pelo método de microdiluição em caldo. No presente estudo, os extratos de *C. prunifera* contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* apresentaram inatividade pelo método de microdiluição em caldo, considerando valores de CIM acima de 1.000 µg/mL.

Existem poucos estudos que retratam atividade antimicrobiana de *C. prunifera*, pois o foco das investigações está no seu pó cerífero, especialmente contra fungos. Andrade *et al.* (2018) demonstraram que a cera de *C. prunifera* tem atividade antifúngica contra os dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *Microsporum canis*. Cruz *et al.* (2002) demonstraram que os compostos como a quitinase e uma β -1,3-glucanase extraída da cera de *C. prunifera* tipo B, apresentaram ação fungicida contra fitopatógenos. Ribeiro Junio *et al.* (2022) apresentaram resultados semelhantes, onde a presença dessas proteínas separadas inibiu o desenvolvimento inicial dos fungos *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum*.

Quando se trata da família Arecaceae, existem muitos estudos de atividade antimicrobiana com o padrão de suscetibilidade semelhante de *C. prunifera* contra as cepas aqui testadas. Como os estudos realizados por Nonato *et al.* (2018) com os frutos de *Mauritia flexuosa* L. f. (Buriti), De Souza *et al.* (2022) com os frutos de *Mauritiella armata* (Buritiana), De Oliveira *et al.* (2016) com as folhas de *M. flexuosa* (Buriti), *Acrocomia aculeata* (Macaúba) e *Attalea speciosa* (Babaçu) e Jobim *et al.* (2014) com a polpa e casca de *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) que observaram inatividade dos extratos contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

No entanto, Azam *et al.* (2016) mostram atividade dos extratos das folhas de *Caryota urens* (Palmeira Rabo-de-Peixe) contra organismos Gram-positivos e Gram-negativos, entre eles *E. coli* e *P. aeruginosa*. A síntese verde de nanopartículas usando fonte vegetal da árvore *Cocous nucifera* (Coqueiro) também exibiu atividade antibacteriana contra *P. aeruginosa* e assim como no presente estudo, contra *K. pneumoniae* (MARISELVAM *et al.*, 2014).

É importante ressaltar, que nos estudos citados, as análises fitoquímicas identificaram a presença de compostos fenólicos (taninos) e flavonoides (JOBIM *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; NONATO *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2022). Esses foram os compostos majoritários em nossas análises, demonstrando que esses metabólitos secundários são comuns em membros da família Arecaceae.

Estudos anteriores sugerem que compostos fenólicos e flavonóides (ácido gálico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, quercetina, rutina e catequina) em plantas possuem forte atividade antimicrobiana (DELLAVALLE *et al.*, 2011; ANANTH *et al.*, 2013). As estruturas desses metabólitos facilitam sua ação contra diversos patógenos, pois formam complexos com proteínas extracelulares e solúveis, causando ruptura de membranas e inibição enzimática (NONATO *et al.*, 2018). No entanto, nas evidências analisadas (JOBIM *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; NONATO *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2022) e no presente estudo esses compostos não exibiram atividade contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (CIM ausente ou >1000 µg/mL).

Apesar disso, na microdiliuição em caldo observou-se que a maior parte das frações foram capazes de inibir de forma efetiva a *K. pneumoniae*. Segundo Andrade *et al.* (2018) a presença de compostos fenólicos e flavonoides pode ser responsável pelo efeito antimicrobiano da cera de *C. prunifera* observado. Como esses foram os compostos principais em nossas análises, acredita-se que tenha relação com a atividade antibacteriana observada (valores de CIM de 100 a 1000 µg/mL). Além disso, a atividade

inibitória não foi observada em todas as frações, o que pode estar relacionada com à polaridade entre os solventes utilizados para o fracionamento químico, que refletem na permeabilidade através da membrana das partes da planta, aumentando ou diminuindo o número de compostos extraídos (HABTOM; GEBREHIWOT, 2019).

As cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* foram resistentes aos extratos da casca e folhas de *C. prunifera*. Essa resposta se baseia na estrutura dessas bactérias, microrganismos Gram-negativas tendem a ser mais resistentes aos princípios bioativos dos vegetais, especialmente devido à complexidade da dupla membrana que limita a difusão de compostos bioativos (JOSHI, 2018).

Os resultados mostram que os extratos de *C. prunifera* podem ser fontes potenciais de agentes naturais contra *K. pneumoniae*. A presença de compostos fenólicos e flavonoides pode ser responsável pelo efeito antibacteriano dos extratos. No entanto, considerando que os estudos foram realizados com extratos brutos e frações, é difícil identificar quais compostos exercem a atividade antibacteriana. No caso de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, dependendo do composto ou de sua quantidade, não foi capaz de inibir de forma efetiva esses patógenos. Nesse caso, apenas o isolamento dos constituintes químicos nos extratos possibilitaria a elucidação dos compostos químicos, concentração e se de forma isolada existe a presença de atividade antimicrobiana efetiva. Além disso, permitiria identificar os compostos que foram efetivos contra *K. pneumoniae*.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos nesse trabalho demonstraram que as frações FBr, FAc e FHi da casca do caule e a FBr, FHex, FCl e FAc das folhas obtidas de *C. prunifera*, apresentaram atividade antimicrobiana moderada a fraca contra *K. pneumoniae*, indicando que esta planta tem potencial para ser utilizada no desenvolvimento de alternativas terapêuticas contra esse patógeno, especialmente a FBr e FAc da casca do caule, por apresentaram valores de CIM mais baixos.

A análise fitoquímica mostrou a presença principalmente de compostos fenólicos (taninos) e flavonoides, que podem ser responsáveis por suas propriedades farmacológicas *in vitro*. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para elucidar as propriedades químicas e biológicas de *C. prunifera* como fonte potencial de novos compostos bioativos.

O estudo realizado apresentou importantes limitações quanto a obtenção do extrato bruto e frações. Para a casca do caule o rendimento de *C. prunifera* foi muito

baixo, onde exigiu uma grande quantidade de material vegetal para obter o extrato bruto para as análises e partição líquido-líquido. Para ambas as partes do espécime, mesmo que existisse uma grande quantidade do extrato bruto, o rendimento de algumas frações durante o fracionamento químico era muito baixo, no qual exigiu maior quantidade de extrato vegetal para obter frações suficientes para os testes, requerendo mais tempo e recursos.

Outras investigações sobre sua ação farmacológica são recomendadas para esclarecer sua ação em resultados *in vivo*, pois ainda existe a possibilidade de os compostos ativos serem degradados ou metabolizados dentro do sistema vivo. Além disso, maior ênfase deve ser dada à pesquisa sobre avaliações de risco de toxicidade dessa espécie.

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.

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- ANANTH, D. A. *et al.* Constituintes químicos, potencial antioxidante e antimicrobiano in vitro de *Caryota urens* L. **Free Radicals and Antioxidants**, v.3, p.107-112, 2013.
- ANDRADE, L. B. S. *et al.* Antioxidant and antifungal activity of carnauba wax powder extracts. **Industrial Crops And Products**, v. 125, p. 220-227, 2018.
- AZAM, S. *et al.* In Vitro Anti-Oxidant and Anti-Microbial Potentiality Investigation of Different Fractions of *Caryota urens* Leaves. **Biomedicines**, v. 4, n. 3, p. 1-10, 2016.
- BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American journal of clinical pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. **Caderno de boas práticas para o extrativismo sustentável orgânico da carnaúba**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. 45p.
- RASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: MS, 2016. 190p.
- CAVALCANTI, S. L. L. **Caracterização Do Óleo De Carnaúba Para Uso Como Biolubrificante**. 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2014.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition**. 10^a ed. Wayne: Clinical And Laboratory Standards Institute, 2015. v. 35.
- CRUZ, M. A. L. *et al.* Identification and partial characterization of a chitinase and a β -1,3-glucanase from *Copernicia cerifera* wax. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p.11-16, 2002.
- DE FREITAS, C. A. S. *et al.* Carnauba wax uses in food - A review. **Food Chemistry**, v. 291, p.38-48, 2019.
- DE OLIVEIRA, A. I. T. *et al.* Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Palm Leaf Extracts from Babaçu (*Attalea speciosa*), Buriti (*Mauritia flexuosa*), and Macaúba (*Acrocomia aculeata*). **The Scientific World Journal**, v. 2016, p. 1-5, 2016.
- DE SOUSA, R. F. *et al.* Etnoecologia e etnobotânica da palmeira carnaúba no semiárido brasileiro. **Cerne**, v. 21, n. 4, p.587-594, 2015.
- DE SOUZA, F. G. *et al.* Characterization of Buritirana (*Mauritiella armata*) Fruits from the Brazilian Cerrado: Biometric and Physicochemical Attributes, Chemical Composition and Antioxidant and Antibacterial Potential. **Foods**, v. 11, n. 6, p.1-16, 2022.

DELLAVALLE, P. D. *et al.* Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. **Chilean Journal Of Agricultural Research**, v. 71, n. 2, p. 231-239, 2011.

HABTOM, S.; GEBREHIWOT, S. In vitro Antimicrobial Activities of Crude Extracts of *Vernonia amygdalina* and *Croton macrostachyus* against Some Bacterial and Fungal Test Pathogens. **The Journal Of Phytopharmacology**, v. 8, n. 2, p.57-62, 2019.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p.1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J. *et al.* Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal Of Ethnopharmacology**, v.110, n.3, p.391-400, 2007.

JOBIM, M. L. *et al.* Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. **Microbiological Research**, v. 169, n. 4, p.314-323, 2014.

JOSHI, R. K. Role of natural products against microorganisms. **American Journal of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 1, p.1-5, 2018.

KLOSS, L. C. *et al.* Identificação de classes de metabólitos secundários do extrato etanólico DE *Piper umbellatum* L. (PIPERACEAE). **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 3, n. 2, p.118-128, 2016.

KOCSIS, J.J.; HARKAWAY, S.; SNYDER, R. Biological Effects Of The Metabolites Of Dimethyl Sulfoxide. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 243, n. 1, p. 104-109, 1975.

MARISELVAM, R. *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles from the extract of the inflorescence of *Cocos nucifera* (Family: arecaceae) for enhanced antibacterial activity. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 129, p. 537-541, 2014.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 150 p.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p.481-511, 2016.

NONATO, C. F. A. *et al.* Chemical analysis and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of fruit fractions of *Mauritia flexuosa* L. f. (Arecaceae). **Peerj**, v. 6, 1-21, 2018.

RIBEIRO JUNIO, E. J. M. *et al.* Chemistry, Biological Activities, and Uses of Carnauba Wax. In: MURTHY, H. N. **Gums, Resins and Latexes of Plant Origin**. Berlin: Springer, 2022. p.1-23.

SILVA, A. M. *et al.* Bromatological analysis, phytochemical and antioxidant potential of carnauba (*Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore) fruit. **African Journal of Food Science**, v. 11, n. 11, p.353-361, 2017.

SOYINGBE, O.S.; MONGALO, N.I.; MAKHAFOLA, T.J. 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 Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, p.1-10, 2018.

UCHÔA, V. T. *et al.* Free radical scavenging ability of *Ximenia americana* L. stem bark and leaf extracts. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 2, p.91-96, 2016.