

Análise da ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Baccharis dracunculifolia* liofilizado em bactérias da classe Gram-positivas

Naiara Caroline Aparecido dos Santos ¹, Breno Gabriel da Silva ², Yana Miranda Borges ³, Talita Evelin Nabarrete Tristão de Moraes ⁴, Patrícia Stülp ⁵, Lucas Ferrari Pereira ⁶, Edinéia Bonin ⁷

1 Introdução

Atualmente, diversas pesquisas estão direcionando seus estudos para obter compostos que venham substituir os compostos sintéticos e antibióticos. Os extratos vegetais com ação antimicrobiana tem-se apresentado como uma alternativa para o combate dos microrganismos, devido à resistência destes a múltiplas drogas. Dessa maneira tem-se realizado buscas contínuas de novos produtos com propriedades antimicrobianas que sejam eficazes e econômicos para combater a resistência de microrganismos patogênicos (Rao, Chen e McClements, 2019).

Os vegetais são capazes de produzir substâncias antioxidantes, antimicrobianas, anti-inflamatórias entre outras atividades biológicas, por meio de sua atividade metabólica secundária, tais como as antraquinonas, flavonóides, terpenóides, alcalóides e taninos, estas substâncias são utilizadas como mecanismo de defesa contra ação de microrganismos (Juneja et al., 2012).

O modo de ação dos agentes antimicrobianos é estabelecido de diversas maneiras, podendo ocorrer uma reação com a membrana celular causando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares; inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais, incluindo as envolvidas no processo de produção de energia e síntese de componentes estruturais; destruição ou inativação funcional do material genético, uma vez que os agentes antimicrobianos podem interferir em diferentes níveis na síntese de ácidos nucleicos (ALENCAR, 2007).

Os agentes antimicrobianos podem influenciar nas diversas atividades da célula bacteriana, inibindo seu crescimento ou causando a morte do microrganismo (Chouhan, Sharma, e Guleria, 2017). Entre todos os novos compostos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) ou outras entidades equivalentes de outros países, 28% delas são totalmente de origem direta de produtos naturais e 39% são derivados destes produtos. Assim, 67% de todos os novos compostos aprovados são de fontes naturais ou derivadas de fontes naturais (CABRAL, 2008).

Pensando em compostos naturais, surge o interesse em verificar a ação antimicrobiana da planta brasileira do grupo *Asteraceae*, *Baccharis dracunculifolia*, rica em compostos antioxidantes caracterizada pela presença de triterpenos, diterpenos, principalmente dos tipos clerodano e lábdano, além de substâncias fenólicas como flavonoides e derivados dos

¹PBE-UEM. e-mail: naicaroline2@gmail.com

²PBE-UEM. e-mail: omatematico.breno@gmail.com

³PBE-UEM. e-mail: borges.yana@gmail.com

⁴PBE-UEM. e-mail: talita_evel@hotmail.com

⁵PBE-UEM. e-mail: patriciastulp2@gmail.com

⁶PBE-UEM. e-mail: luccaspereira@outlook.com

⁷PPC-UEM. e-mail: bonin_in@hotmail.com

ácidos diterpênicos e ácidos p-cumáricos prenilados, ácido cinâmico e cafeico, nerolidol, espatulenol, artemisina C (Belini et al., 2016).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Baccharis dracunculifolia* liofilizado contra as cepas de duas bactérias Gram-positivas, bem como verificar se há diferença entre os níveis de concentrações inibitórias mínima (MIC) do extrato utilizado e qual (ou quais) se diferem significativamente para essas bactérias, apropriando-se de métodos não paramétricos, como: teste de Kruskal-Wallis (conhecido também como ANOVA *by ranks test*) e o teste *post-hoc* de Dunn, respectivamente.

2 Metodologia

2.1 Materiais

Os microrganismos testados nos ensaios incluem as bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, cultivados em Caldo Mueller Hinton (CMH) (Difco) a 37°C. Antes de cada experimento os microrganismos foram cultivados nos respectivos caldos a 37 °C durante 24h. Para os testes, a densidade celular foi padronizada em tubos estéril contendo salina 0.85% e a turvação padronizada em escala *MacFarland* 0.5, que corresponde a $1.5 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$.

A determinação dos valores da Concentração Mínima Inibitória (MIC) para os extratos foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando o meio de cultura Caldo Mueller-Hinton para bactérias. Foram utilizadas placas de 96 poços como recomendado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2012), sendo distribuídos 100µl de CMH em cada poço, em seguida sendo acrescentado 100µl dos extratos brutos diluídos em concentração de 2000µg/ml (para obter diluições seriadas iniciando de 1000µg/ml a 1.90µg/ml), homogeneizando e transferindo 100µl para o poço seguinte até o último poço, desprezado 100µl.

As suspensões microbianas foram padronizadas em salina 0.85% e diluídas 1 : 10 sendo acrescentados 5µl do inóculo em cada poço da placa, sendo deixado uma coluna para controle positivo sem extrato e contendo a bactéria e outra coluna para controle negativo contendo apenas o caldo. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. A MIC foi determinada como a última concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Após 24 horas de incubação realizou-se o teste bactericida (concentração bactericida mínima - MBC) dos poços que ocorreu a MIC, semeou-se 20 µl em placas de MHA, incubou-se novamente por 24h e realizou-se a contagem logarítmica *UFC/ml*. Os testes foram realizados em triplicatas.

2.2 Métodos

Para avaliar os dados optou-se por um procedimento não paramétrico, uma vez que os mesmos não apresentaram características de alguma distribuição de probabilidade conhecida. Desta forma, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis que não coloca nenhuma restrição sobre a comparação, enquanto que a análise de variância (ANOVA) depende da hipótese de que todas as populações em confronto são independentes e normalmente distribuídas.

A estatística do teste Kruskal-Wallis é dada por:

$$H = (N - 1) \frac{\sum_{i=1}^g n_i (\bar{r}_i - \bar{r})^2}{\sum_{i=1}^g \sum_{j=1}^{n_i} (r_{ij} - \bar{r})^2},$$

no qual se a estatística não for significativa, então, não há evidências de dominância estocástica entre as amostras. Entretanto, se o teste for significativo, então, ao menos uma amostra domina estocasticamente outra amostra.

Por conseguinte, utilizou-se o método de *Dunn* (teste *post-hoc*) para comparação entre os grupos quando constatada diferença significativa na análise. Todas as análises foram realizadas por meio do *software* R (R Core Team, 2018), considerando-se um nível de significância de 5% ($p - \text{valor} < 0.05$).

3 Resultados

Inicialmente realizou-se uma análise descritiva dos dados, em que o menor valor de $\log(UFC)/mL$ ocorre na concentração $4\mu g/mL$ tanto para a bactéria *Bacillus subtilis* quanto para a *Staphylococcus aureus* ($1.7440\mu g/mL$ e $1.5540\mu g/mL$, respectivamente), ou seja, em ambas as bactérias a maior redução em $\log(UFC)/mL$, exceto a eliminação total, ocorre na concentração $4\mu g/mL$. Para as concentrações superiores a esta, observa-se que houve a eliminação total das bactérias (Figura 1).

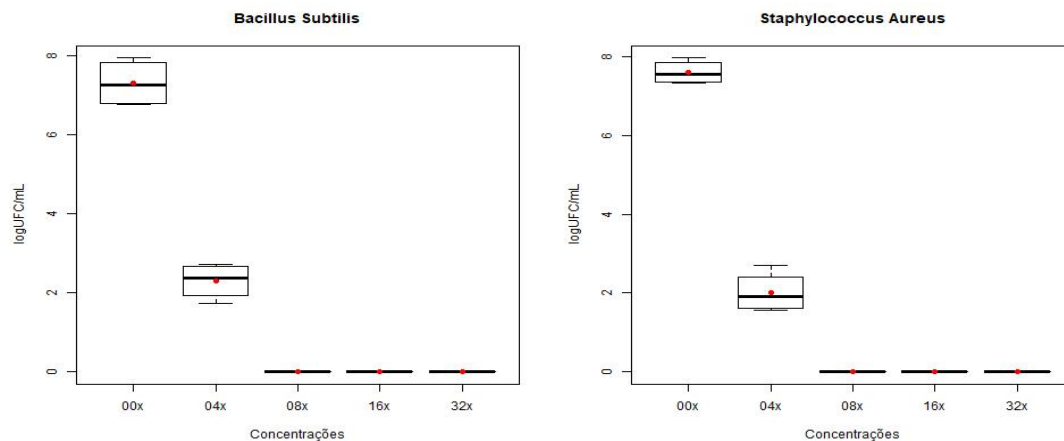


Figura 1: Boxplots das bactérias *Bacillus Subtilis* e *Staphylococcus Aureus* por níveis de concentração, respectivamente.

A ação antimicrobiana foi avaliada com diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico nas bactérias *Bacillus Subtilis* e *Staphylococcus Aureus*. Para ambas espécies, apenas na concentração $4\mu g/mL$ não tiveram efeito de inativação total das bactérias.

Constatou-se, por meio do teste de Kruskal-Wallis, a existência de diferença entre os níveis de concentrações utilizados para as duas bactérias, $p - \text{valor} = 0.0209$ e 0.0199 (Tabela 1), ou seja, há evidências amostrais de que os níveis de concentrações do extrato hidroalcoólico afetam na redução do $\log(UFC)/mL$.

Tabela 1: Resultado dos testes de *Kruskal-Wallis* e *post-hoc* de *Dunn*.

Bactérias	Teste de	Teste <i>post-hoc</i>		
	Kruskal-Wallis	de <i>Dunn</i>		
	p-valor	Comparação	Dif. Médias	p-valor
<i>Bacillus Subtilis</i>	0.0209	$0\mu g/mL - 4\mu g/mL$	5.0160	0.0105
<i>Staphylococcus Aureus</i>	0.0199	$0\mu g/mL - 4\mu g/mL$	5.5825	0.0100

Ainda, reduções significativas ($p - \text{valor} < 0.05$) nas contagens bacterianas em comparação com o grupo controle (bactéria sem o extrato) foram observadas, por meio do teste *post-hoc* de Dunn, com os outros tratamentos para ambas bactérias. Tais reduções variaram de aproximadamente 5 a 7 $\log(UFC)/mL$ (Figura 2).

Desta forma, o extrato hidroalcoólico de *Baccharis dracunculifolia* liofilizado demonstrou uma atividade antimicrobiana alta contra as bactérias Gram-positivas. Observando essa ação, esta planta passa a ter interesse comercial, uma vez que já é utilizada para fornecer material às abelhas na produção da própolis verde, composto que apresenta inúmeras propriedades terapêuticas e biológicas, destacando a atividade antioxidante antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória (MARCHESAN et al., 2006).

Portanto, ao confirmar neste trabalho a atividade de inibição de crescimento das bactérias *in vitro*, este extrato de hidroalcoólico de *Baccharis dracunculifolia* liofilizado, apresenta um potencial grande para ser utilizado na elaboração de rações para animais não ruminantes, bem como estudos mais detalhados devem ser propostos para aplicação na elaboração de medicamentos.

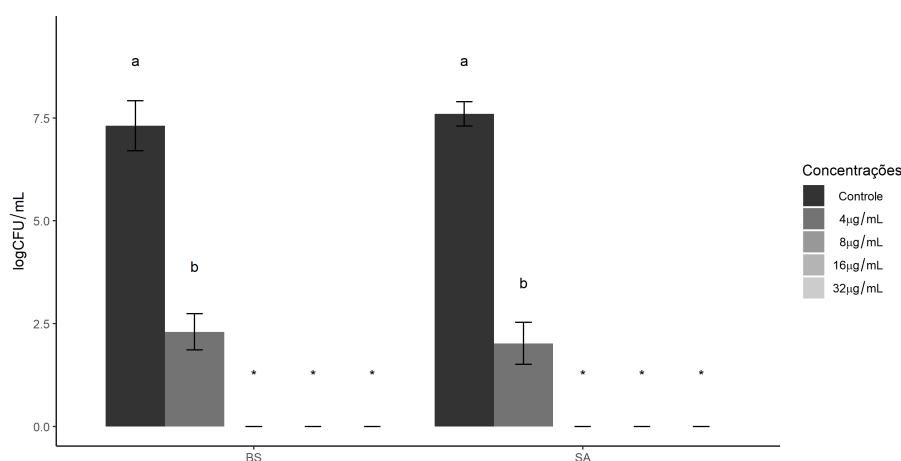


Figura 2: Comparação das concentrações utilizadas nas bactérias *Bacillus Subtilis* e *Staphylococcus Aureus* independentemente.

4 Conclusões

Este estudo evidenciou a eficácia do extrato em suas concentrações mais altas, nas quais foram capazes de inibir efetivamente o crescimento das bactérias Gram positivas. Mostrando uma alta sensibilidade das bactérias *Bacillus Subtilis* e *Staphylococcus Aureus* ao extrato.

Agradecimentos

Agradecimentos à CAPES pelo apoio financeiro.

Referencias Bibliográficas

- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; CASTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. 2007. *Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis*. Journal of Ethnopharmacology, Lausanne. (2)113, 278-283.
- BELINI, C.M., MARQUES, M.O.M., FIGUEIRA, G.M., BAJAY, M.M., CAMPOS, J.B., VIANA, J.P.G., PINHEIRO, J.B., ZUCCHI, M. I., 2016. *Characterization of microsatellite markers for Baccharis dracunculifolia (Asteraceae)*. Applications in Plant Sciences, 4(3), 1500093.
- CABRAL, I. S. R. *Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira*. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- CHOUHAN, S., SHARMA, K., GULERIA, S. 2017. *Antimicrobial Activity of some Essential Oils-Present Status and Future Perspectives*. Medicines (Basel). 4(3):58.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. Ninth edition*. (CLSI document M07- A9), 2012.
- JUNEJA, V.K., DWIVEDI, H.P., YAN, X. 2012. *Novel Natural Food Antimicrobials*. Annual Review of Food Science and Technology. 3:381?403.
- KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. (1 de dezembro de 1952). *Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis*. Journal of the American Statistical Association. 47 (260): 583?621. ISSN 0162-1459. doi: 10.1080/01621459.1952.10483441
- RAO, J., CHEN, B., McCLEMENTS, D.J. 2019. *Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action*. Annual Review of Food Science and Technology. 10:3.1?3.23.
- R CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.