

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

JAINÉ SALIENA DOS SANTOS CASTELLI

**EXTRATOS ORGÂNICOS DAS FOLHAS DE *Eugenia involucrata* DC
E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2022

JAINE SALIENA DOS SANTOS CASTELLI

**EXTRATOS ORGÂNICOS DAS FOLHAS DE *Eugenia involucrata* DC
E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

**ORGANIC EXTRACTS FROM THE LEAVES OF *Eugenia involucrata*
DC AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sirlei Dias Teixeira

PATO BRANCO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



TERMO DE APROVAÇÃO

EXTRATOS ORGÂNICOS DAS FOLHAS DE *Eugenia involucrata* DC E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

por

JAINÉ SALIENA DOS SANTOS CASTELLI

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado(a) em 30 de junho de 2022 às 16 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Sirlei Dias Teixeira
Prof.(a) Orientador(a)

Mário Antônio Alves da Cunha
Membro titular

Vanderlei Aparecido de Lima
Membro titular

Nota: O Documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo 23064.027687/2022•03 e documento 2795450.

Dedico este trabalho aos meus pais, por
sempre acreditarem em mim e por me dar
forças para continuar.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiro lugar a Deus por ter me ofertado a vida e seus desafios.

Aos meus pais, Roselei e Wilson, que mesmo distantes, sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial até nos momentos mais difíceis, de modo que às vezes nem eu mesma acreditava.

Ao meu noivo, Leonardo, por todo apoio e companheirismo nessa reta final.

A minha amiga Gabriela, que é um exemplo de persistência e dedicação, que sempre me apoiou e me ensinou a seguir em frente.

A orientadora deste trabalho, Prof^a. Dr^a. Sirlei Dias Teixeira, pela paciência, por suas sugestões no trabalho, pelos seus conhecimentos compartilhados e também por sua simplicidade, carisma e humildade ao lidar com seus alunos.

A todos os professores que de alguma maneira foram importantes na minha trajetória acadêmica direta ou indiretamente, que repassaram sempre suas experiências técnicas, científicas e também humanas.

A Empresa Júnior Quarks e a todos que de alguma maneira fizeram parte dela. Pois, diversos conhecimentos adquiridos ao longo da vida acadêmica veio desta entidade, pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como profissional.

A UTFPR por ofertar todas as condições necessárias durante o período de graduação.

Aos meus colegas da universidade, que convivi bastante nesses anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que foram fundamentais nessa etapa.

“Se eu soubesse antes o que sei agora,
erraria tudo exatamente igual.” –
Humberto Gessinger

RESUMO

CASTELLI, Jaine Saliene Dos Santos. **Extratos Orgânicos Das Folhas de *Eugenia involucrata* DC e Atividade Antimicrobiana**. 2022. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Industrial) • Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2022.

A *Eugenia involucrata* DC pertence à família Myrtaceae, conhecida popularmente no Brasil como cerejeira, cerejeira do mato, cerejeira do rio grande. É encontrada predominantemente no Sul, como Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, mas também possui ocorrências em outros estados como em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo. Essa planta possui algumas propriedades, como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antidiarreica entre outras. Este trabalho teve como objetivo, a obtenção de extratos das folhas da *E. involucrata*, utilizando solventes em gradiente de polaridade, éter de petróleo, diclorometano, etanol e água destilada, até o esgotamento do vegetal, e assim testar esses extratos frente a bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis*, Gram-negativas *S. enterica*, *Typhimurium* e *E. coli*, pela metodologia de difusão em disco e após determinar a concentração inibitória mínima. Os extratos apresentaram os seguintes rendimentos: éter de petróleo 2,66%, diclorometano 5,61%, etanol 12,01% e água destilada 8,24%. Os testes de difusão em disco apresentaram halos de inibição para os extratos de etanol e água frente as quatro bactérias testadas, os extratos de éter de petróleo e diclorometano não apresentaram halos de inibição. A concentração inibitória mínima (CIM), etanol para *E. coli* apresentou boa atividade (CIM <100 µg mL⁻¹) e moderada (CIM 500-100 µg mL⁻¹) para *S. aureus* e *B. subtilis*, *S. enterica* e *Typhimurium*. Extrato de água apresentou frente as quatro cepas microbianas atividade moderada (CIM 500-100 µg mL⁻¹).

Palavras-chave: Extratos. Cerejeira. Bactérias. Etanol. Água.

ABSTRACT

CASTELLI, Jaine Saliene Dos Santos. Organic Extracts From the Leaves of *Eugenia involucrata* DC and Antimicrobial Activity. 2022. Total number of sheets. Completion of course work (Bachelor of Industrial Chemistry) • Federal Technology University • Parana. Pato Branco, 2022.

Eugenia involucrata DC belongs to the Myrtaceae family, popularly known in Brazil as cerejeira, cerejeira do mato, cerejeira do rio grande. It is found predominantly in the South, such as Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul, but also has occurrences in other states such as São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais and Espírito Santo. This plant has some properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antidiarrheal, among others. The objective of this work was to obtain extracts from the leaves of *E. involucrata*, using solvents in polarity gradient, petroleum ether, dichloromethane, ethanol and distilled water, until the plant was exhausted, and thus test these extracts against Gram bacteria. •positive *S. aureus* and *B. subtilis*, Gram-negative *S. enterica* Typhimurium and *E. coli*, by disk diffusion methodology and after determining the minimum inhibitory concentration. The extracts showed the following yields: petroleum ether 2.66%, dichloromethane 5.61%, ethanol 12.01% and distilled water 8.24%. The disk diffusion tests showed inhibition halos for the ethanol and water extracts against the four bacteria tested, the petroleum ether and dichloromethane extracts did not show inhibition halos. The minimum inhibitory concentration (MIC), ethanol for *E. coli* showed good (MIC <100 µg mL⁻¹) and moderate (MIC 500•100 µg mL⁻¹) activity for *S. aureus* and *B. subtilis* *S. enterica* Typhimurium. Water extract showed moderate activity against the four microbial strains (MIC 500•100 µg mL⁻¹).

Keywords: Extracts. Cherry tree. Bacteria. Ethanol. Water

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa de ocorrências E. involucrata	17
Figura 2 • Eugenia involucrata DC	18
Figura 3 • Percolador	21
Figura 4 • Rotor	22
Figura 5 • Soxhlet	23
Figura 6 – Folhassecas	25
Figura 7 • Pó	25
Figura 9 • Evaporador rotativo.	26
Figura 8 • Extração.	26
Figura 10 • Esquema para determinação de difusão em disco	29
Figura 11 • Esquema para determinação de concentração inibitória mínima.	30
Figura 12 • Halos de inibição frente às cepas testadas para extratos de etanol e água.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 • Metabólitos encontrados na <i>E. involucrata</i> .	19
Tabela 2 • Média \pm desvio padrão (D.P.) do diâmetro dos halos de inibição obtidos na análise de difusão em disco frente às quatro cepas bacterianas testadas em relação aos quatro extratos EP: éter de petróleo, ED: diclorometano, ET: etanol, e EAD: água destilada.	35
Tabela 3 • Média \pm desvio padrão (D.P.) das zonas de inibição obtidos na análise de difusão em disco referente aos extratos EP: éter de petróleo, ED: diclorometano, ET: etanol, e EAD: água destilada. Antimicrobiano padrão clorexidina.	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA

CIM: Concentração inibitória mínima

E.: *Eugenia*

EAD: Extrato de água destilada

ED: Extrato de diclorometano

E. involucrata: *Eugenia involucrata* DC

EP: Extrato de éter de petróleo

ET: Extrato de etanol

MV: Matriz vegetal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Geral	14
2.2 Específicos	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 Produtos naturais	15
3.2 Família Myrtaceae	16
3.2.1 Cerejeira (<i>E. involucrata</i> DC)	17
3.3 Extratos vegetais	20
3.3.1 Maceração	20
3.3.2 Percolação	21
3.3.3 Turbo Extração	22
3.3.4 Infusão	22
3.3.5 Decocção	23
3.3.6 Soxhlet	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Coleta e identificação do material vegetal	24
4.2 Obtenção dos extratos vegetais	24
4.3 Atividade antimicrobiana	26
4.3.1 Antimicrobianos	26
4.3.2 Microrganismos utilizados	27
4.3.3 Suspensão bacteriana	27
4.3.4 Método de difusão em disco	27
4.3.5 Concentração inibitória mínima (CIM)	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Extrações	31
5.2 Atividade antimicrobiana	32
5.2.1 Difusão em disco	32
5.2.1 Concentração inibitória mínima	35
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais é uma das práticas medicinais mais utilizadas pela humanidade, o uso para tratamento de doenças é tão antigo quanto a humanidade (VIEGAS et al., 2006). Com o desenvolvimento da química orgânica, os produtos naturais começaram a ganhar maior atenção nos estudos desenvolvidos, de modo que as plantas passaram a ser a primeira fonte de substâncias para desenvolvimento de medicamentos. A Organização Mundial da Saúde estima que da população mundial, cerca de 85% das pessoas utilizam de maneira direta ou indireta, produtos naturais como fonte de medicamento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Em vista disso, as plantas são importantes fontes de compostos bioativos, pois elas produzem metabólitos essenciais com diversificada utilização, estrutura química e propriedades biológicas, assim, a busca por extração desses metabólitos se faz muito importante para o avanço industrial. Alguns estudos já visam extrair e avaliar o potencial biológico de produtos naturais utilizados na medicina popular, com certo poder antimicrobiano, como óleos essenciais e extratos (FILHO; ZANCHET, 2020).

Nesse sentido, o Brasil possui a maior flora do mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), atrelado à enorme diversidade, na qual se encontra a família Myrtaceae, que apresenta grande destaque, em função da diversidade de gêneros e devido ao interesse em suas propriedades medicinais, como atividade antibacteriana e antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória entre outras (LORENZI, 1992).

A cerejeira (*E. involucrata* DC), pertencente à família Myrtaceae é uma planta do gênero *Eugenia* tão pouco estudada, nativa do sul Brasil, suas folhas utilizadas popularmente em tratamentos para diarreia e má digestão, seus frutos não são muito estudados, além disso, são pouco comercializadas. Com foco na contribuição para mais estudos referentes à cerejeira, esse trabalho visa a obtenção de extratos presentes nas folhas e a determinação da atividade antimicrobiana dos mesmos.

2 OBJETIVOS

1 GERAL

Obter extratos das folhas da *E. involucrata*, utilizando solventes orgânicos em gradiente de polaridade e avaliar atividade microbiológica.

2 ESPECÍFICOS

Extrair compostos bioativos presentes nas folhas da cerejeira com solventes em gradiente de polaridade.

Realizar atividade antimicrobiana dos extratos por meio do método de difusão em disco.

Determinar concentração inibitória mínima dos extratos que apresentaram halos de inibição.

REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRODUTOS NATURAIS

Devido a enorme quantidade de espécies vegetativas na natureza, os produtos naturais estão inseridos no cotidiano humano desde tempos antigos até os dias atuais, mas antigamente eles não possuíam fundamentação científica como se conhece hoje. Os produtos naturais possuem papel importante na sociedade, são benéficos à saúde humana se utilizados da maneira adequada, e cada vez mais a indústria vem investindo em estudos sobre metabólitos provenientes da biossíntese de organismos vivos – os produtos naturais (VIEGAS et al., 2006).

Há relatos da utilização de plantas medicinais no Brasil, desde a época dos índios, na medicina popular brasileira e até na atualidade, por conta do fácil acesso e baixo custo. Folhas, ervas e frutos são consumidos de modo a aliviar alguns desconfortos. Esse uso, trouxe o interesse pela pesquisa desses recursos naturais, impactando positivamente no avanço da medicina, indústria alimentícia, farmacêutica e de cosmético (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Através dos estudos desenvolvidos no decorrer dos anos, observou-se que na célula das plantas ocorrem diversas reações metabólicas, essas reações elaboram alguns compostos orgânicos que vêm de seus metabolismos e são denominados metabólitos primários e secundários (VIEGAS et al., 2006).

Os compostos denominados metabólitos primários são os carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas, são considerados como compostos essenciais para a crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das plantas, produzidos a partir de moléculas mais simples, havendo a necessidade da presença de fotossíntese para a sua produção (CUNHA et al., 2016).

Já os metabólitos secundários, atualmente denominados metabólitos especializados, são compostos micromoleculares que conferem vantagens às plantas, pois durante o processo evolutivo as plantas foram desenvolvendo algumas defesas de modo a sobreviverem, por conta disso elas apresentam rotas biossintéticas específicas e a sua produção está ligada com o meio em que o organismo vivo se encontra como as características do ar, da água e do solo, e

também as suas características individuais conforme cada espécie. Os metabólitos secundários normalmente são moléculas pertencentes as classes dos terpenos, compostos fenólicos, alcaloides e derivados de ácidos graxos (CUNHA et al., 2016; SIMÕES, 2017).

Os terpenos são moléculas facilmente encontrados em óleos essenciais e são conhecidos por suas características antimicrobianas (FELIPE; BICAS, 2017). Os flavonoides atraem polinizadores e propagadores de sementes, sendo responsáveis pela pigmentação de frutas, sementes, flores e folhas. Além disso, ajudam na defesa da planta contra microrganismos. Os alcaloides são nitrogenados, podem apresentar atividade antifúngica, antibacteriana e citotóxica (FILHO; ZANCHET, 2020; GOBBONETO; LOPES, 2007).

Nesse sentido, o Brasil, em função de sua extensão territorial e localização geográfica, possui uma das maiores biodiversidades do mundo, contando com grande variedade de espécies vegetativas. Cerca de 20% do total mundial de organismos vegetativos e animais terrestres se encontram no país (BARBOSA, 2014). Sendo que mais de 350 mil espécies vegetativas já foram catalogadas ao nível mundial, de modo que 304 mil destas espécies foram caracterizadas como angiospermas, as quais são denominadas árvores frutíferas por possuírem como característica principal a produção de flores e frutos (BARBOSA, 2014; SIMÕES, 2017).

1 FAMÍLIA MYRTACEAE

Da grande maioria das angiospermas nativas do Brasil, a família Myrtaceae é popularmente conhecida por agregar diversas espécies nativas. Esta família vem ganhando muita atenção por conta da grande variedade de espécies pertencentes a ela, já foram catalogados cerca de 23 gêneros e 1031 espécies no Brasil (D'ALMEIDA, 2019; SOARES, 2017).

Esta família é considerada de grande importância para a biodiversidade, encontrada em regiões tropicais e subtropicais, principalmente na América do Sul, Sudeste da Ásia e Austrália (ORELLANA et al., 2020). Algumas espécies da família Myrtaceae possuem importância econômica em função do uso na medicina popular, e por seus frutos serem ricos em vitaminas e compostos bioativos. As porções mais

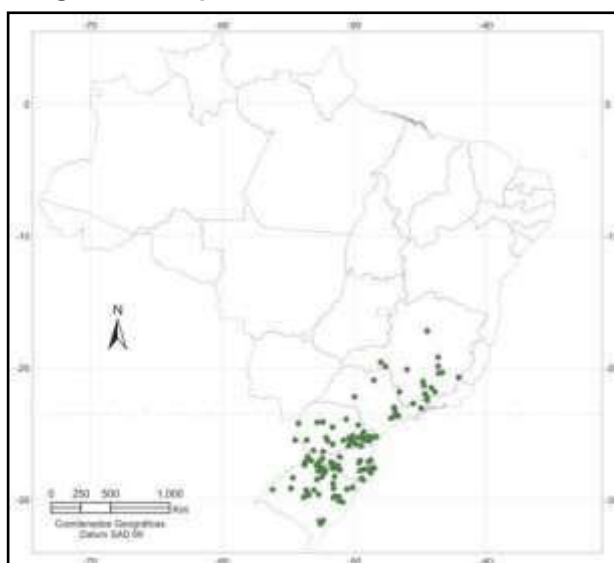
utilizadas dessa família são os frutos, folhas e cascas, pois são ricas em vitaminas e por possuírem compostos fenólicos (TOLEDO et al., 2021). Magina cita que os gêneros de maior importância da família são *Psidium* (goiabeira e araçá), *Martiera* (cambucá), *Campomanesia* (guabiroba), e *Eugenia* (cerejeira e pitanga) (MAGINA, 2008).

Dentre a família Myrtaceae, o gênero *Eugenia* possui abundância em espécies, por esse motivo é largamente empregada na medicina popular (VELOSO, 2016). Do gênero *Eugenia*, as espécies mais populares são a cerejeira (*E. involucrata*), a pitangueira (*E. uniflora*) e a cagaita (*E. dysenterica*), elas possuem valor terapêutico, há relatos da utilização das folhas para preparo de chás. Além disso, possuem valor comercial agregado, atribuído aos frutos (BÜNGER et al., 2016; SILVEIRA; HARTHMAN, 2010). Desse gênero, já foram identificados metabólitos com potencial antimicrobiano, antioxidante, antifúngico, antiviral e anti-inflamatório (VELOSO, 2016).

1.1 Cerejeira (*E. involucrata* DC)

A cerejeira (*E. involucrata* DC), é uma árvore nativa da região Sul do Brasil, mas também ocorre na região Sudeste, conforme apresentado na (CARVALHO, 2009).

Figura 1 – Mapa de ocorrências *E. involucrata*



Fonte: (CARVALHO, 2009)



a) Árvore



b) Tronco



c) Fruto



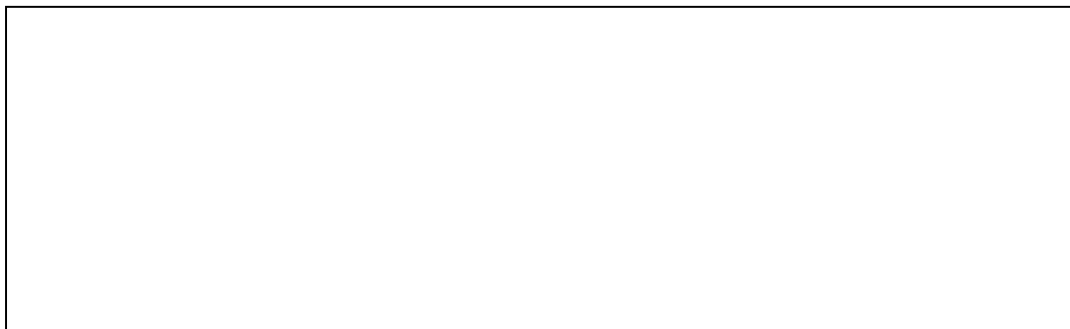
d) Folha

onhecida
popularm

ente como cerejeira, cerejeira do mato ou cerejeira do rio grande (• a), é uma árvore considerada ornamental, que necessita de exposição solar e de solo e ar úmidos. Sua altura varia de 5 a 15 metros, o tronco apresenta coloração verde, com tons de

Figura 2 • Eugenia involucrata DC

marrom (• b), o diâmetro pode variar entre 30 a 40 centímetros e pode ser empregado na produção de ferramentas agrícolas em função da sua resistência (LORENZI, 1992).



Fonte: Autoria própria (2021) e LORENZI (1992) adaptado.

Os frutos (• c) nascem nas extremidades dos galhos e a coloração pode variar de vermelho mais claro até tons de vermelho mais escuros, ele pode conter de 1 a 5 sementes, podendo ser consumido in natura ou empregado na produção de geleias, licores, doces e sucos (LORENZI, 1992; SOARES, 2017).

As folhas (• d) possuem coloração verdes e brilhosas, são empregadas na medicina popular na forma de chá por possuir ação digestiva e antidiarreica. A cerejeira floresce entre os meses de setembro e novembro juntamente com as novas folhas, a frutificação ocorre entre outubro e dezembro (DAMETTO, 2014).

Não há muitos estudos correlacionados com a cerejeira, mas Infante *et al.*, (2016) relatam que a folha de *E. involucrata* é a parte da planta que possui grande concentração de compostos fenólicos, sendo observado a presença do ácido gálico nos frutos e sementes. Estudo realizado por Girardelo (2019), demonstrou que o extrato da semente da cerejeira apresentou potencial antitumoral para células do

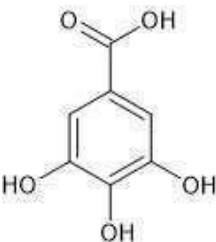
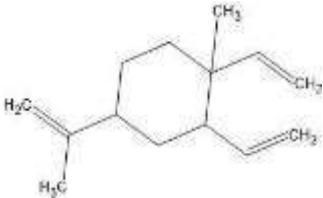
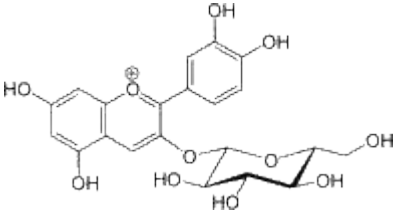
câncer de pâncreas. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que nos extratos do fruto, a antocianina majoritária foi a cianidina•3•O•glicosídeo.

Outro estudo, realizado por Dametto (2014), foi encontrado nos extratos das folhas da cerejeira, a cianidina•3•O•glicosídeo e também a delphinidina•3•O•glicosídeo.

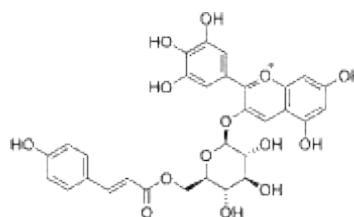
Foi apresentado por Barzotto (2019) a identificação por cromatografia, do composto majoritário, β -elemeno, presente no óleo essencial das folhas da cerejeira, obtido por arraste de vapor. Além disso, o mesmo estudo, mas por diferente técnica de obtenção do óleo essencial (CO₂ supercrítico), demonstrou atividade antioxidante de $93,82 \pm 1,35\%$.

Toledo *et al.*, (2021) apresentou em seu estudo que os extratos etanólicos e metanólicos demonstraram potencial antioxidante acima de 90%, além disso esses extratos apresentaram potencial antimicrobiano frente à *Candida albicans*. O extrato aquoso das folhas mostrou características alelopáticas (SAUSEN, 2009).

Tabela 1 • Metabólitos encontrados na *E. involucrata*.

Nº	Metabólito	Estrutura	Referência
1	Ácido gálico		Infante et al. (2016)
2	β -Elemeno		Barzotto, (2019); Soares, (2017)
3	cianidina•3•O•glicosídeo		Girardelo (2019); Dametto (2014)

4 delfinidina•
3•O•
glicosideo



Dametto
(2014)

2 EXTRATOS VEGETAIS

Extratos são produtos obtidos por meio de uma matriz de origem vegetal, animal ou microbiana, os quais são extraídos com alguns solventes, de modo a retirar da matriz os compostos de interesse (ANVISA, 2007).

Assim, a fitoquímica utilizando-se de diferentes métodos, visa extrair, isolar, purificar e identificar os metabólitos presentes nas matrizes vegetais. Nesse sentido, extração consiste em retirar de maneira seletiva e completa, substâncias ou parcelas de substâncias contidas em uma matriz vegetal, utilizando um líquido ou mistura de líquidos extratores para assim obter uma solução extrativa (SIMÕES, 2017).

Dessa forma, algumas condições podem influenciar na obtenção dos extratos, como no rendimento e na qualidade dos compostos de interesse. Tais condições estão atreladas à categoria do solvente, propriedades da matriz vegetal, temperatura, agitação, pressão e tempo (FONSÊCA, 2005).

A metodologia a ser empregada na extração pode variar conforme a finalidade do extrato, em que os métodos mais utilizados são a frio, nos quais não há elevação de temperatura durante da extração, sendo a maceração, percolação e turbo extração. E os métodos a quente, nos quais há aumento de temperatura, sendo a infusão e Soxhlet. As extrações também são classificadas como extração parcial e extração exaustiva, sendo que na parcial não há esgotamento da matéria-prima, e na exaustiva a extração ocorre até o esgotamento da matriz vegetal. As metodologias também podem ser adaptadas, isso irá depender do conhecimento acerca da matéria prima (FONSÊCA, 2005; MARIOT; BARBIERI, 2006).

2.1 Maceração

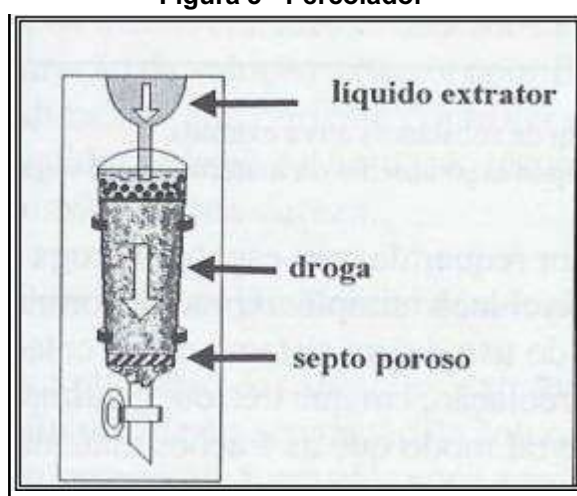
A maceração é uma metodologia não exaustiva, na qual a matriz vegetal fica em um ambiente fechado, em contato direto com o líquido extrator, podendo estar sob agitação ou não. Esse método pode durar dias ou horas e não há renovação do líquido extrator, não conduzindo ao esgotamento da matéria-prima, sendo considerada uma extração não exaustiva.

Alguns fatores que podem influenciar na eficiência desse método estão atrelados ao material vegetal, como a natureza do mesmo, o tamanho das partículas, umidade, entre outros. Os líquidos extratores podem influenciar na seletividade e quantidade, além dos fatores ligados ao sistema como por exemplo, a proporção matriz: líquido, temperatura, agitação e tempo (FONSÊCA, 2005; SIMÕES, 2017).

2.2 Percolação

Na percolação a extração é exaustiva, na qual se faz necessário a utilização de um percolador (), que é um recipiente cônico ou cilíndrico, dentro do percolador há um disco perfurado onde a matéria vegetal é depositada. Nessa técnica, a matriz vegetal deve ser moída e acondicionada no disco do percolador, de modo que passe o solvente extrator, o intuito do disco é reter as partículas da matéria-prima vegetal.

Figura 3 • Percolador



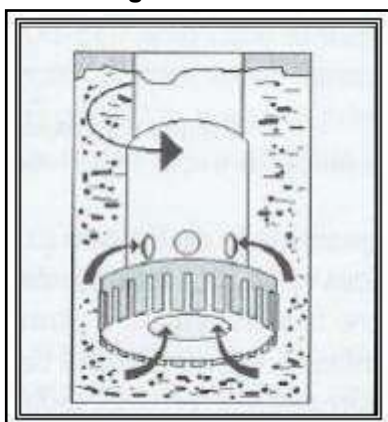
Fonte: (SIMÕES, 2017)

A percolação difere da maceração por ser uma operação dinâmica, a qual é indicada na extração de substâncias farmacologicamente ativas, que se fazem presentes em pequenas quantidades ou pouco solúveis (SIMÕES, 2017).

2.3 Turbo Extração

Essa técnica também pode ser denominada de turbólise ou turbolização, ela é caracterizada como exaustiva, a frio. É baseada na redução de tamanho das partículas da matriz vegetal durante a extração, de modo que ao aplicar forças de cisalhamento são gerados espaços entre o extrator e um rotor com velocidade de 5000 a 20000 rpm.

Figura 4 • Rotor



Fonte: (SIMÕES, 2017)

Ao reduzir o tamanho das partículas, ocorre o rompimento das células, as quais proporcionam a dissolução das substâncias presentes na matriz vegetal, de modo que o tempo de extração resulta em minutos, ocorrendo o quase esgotamento da matriz. Dessa forma, como resultado, tem-se a rapidez, simplicidade e versatilidade do método, o qual permite a fácil utilização em processos de pequena e média escala (FONSÊCA, 2005; SIMÕES, 2017).

2.4 Infusão

É uma técnica conhecida popularmente como preparação de chás e é caracterizada como uma técnica não exaustiva, sendo um procedimento simples e

de baixo custo. É uma extração a quente no qual o líquido extrator é água, quando a água atinge a temperatura de ebulição, a matriz vegetal é submersa nela e o recipiente é tampado por um determinado tempo. Após, o sistema é destampando e assim finaliza-se a extração (FONSÊCA, 2005; SIMÕES, 2017).

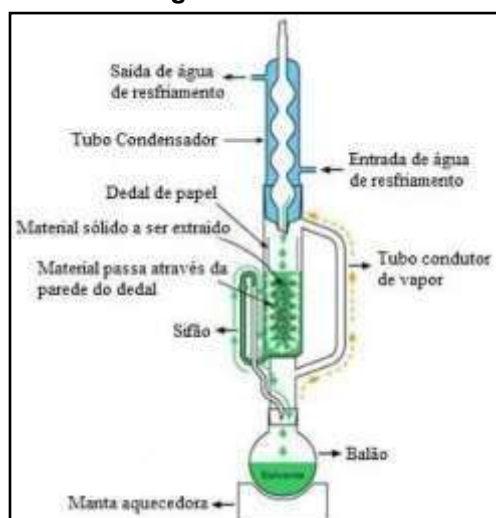
2.5 Decocção

Arelada à técnica de infusão, há a decocção, na qual a matriz é submersa em um líquido extrator no seu ponto de ebulição, por um tempo de 20 à 30 minutos, porém é uma técnica não muito utilizada por conta da possibilidade de alteração das substâncias ativas devido ao longo tempo (FONSÊCA, 2005; SIMÕES, 2017).

2.6 Soxhlet

Essa técnica é exaustiva, é realizada em um sistema fechado a quente, a qual utiliza líquidos extratores voláteis. Utiliza-se vidrarias como balão de destilação, aparelho de Soxhlet e condensador. A matriz é acondicionada no aparelho de Soxhlet e o líquido extrator no balão de destilação o qual é aquecido.

Figura 5 • Soxhlet



Fonte: (COSTA et al., 2017)

Quando o líquido extrator chega na coluna de condensação, o mesmo se liquefaz e verte sobre a matriz vegetal que está acondicionada no Soxhlet, e assim os compostos que serão extraídos vão se dissolvendo no líquido extrator quente.

Quando o local que há a matriz fica preenchida, ele é esvaziado através de um sifão que se localiza na lateral do aparelho, assim o líquido extrator retorna ao balão de destilação para completar o ciclo e assim seguir o procedimento (DAMETTO, 2014; FONSÊCA, 2005; SIMÕES, 2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas da *E. involucrata* foram coletadas na zona rural do município de Marmeleiro – Paraná, com localização geográfica de latitude 26°20'43.0S e longitude 53°05'36.6W, a coleta das folhas para obtenção dos extratos foi realizada no dia 13 de junho de 2021 às 17 horas. Uma excisata do material botânico foi coletada e depositada no herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná *campus* Pato Branco (UTFPR).

4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

As folhas coletadas foram previamente selecionadas e lavadas com água corrente, após submetidas à secagem em estufa com circulação de ar à temperatura constante de 45 °C por 24 horas. Após a conclusão da secagem (), as folhas foram trituradas em um liquidificador industrial de alta rotação (JL•Colombo) até obtenção de um pó fino, a fim de aumentar a superfície de contato entre o material vegetal seco e o solvente extrator. Em seguida, foi pesado, obtendo-se a massa de 303,6 gramas e armazenado em frasco de vidro (). O frasco foi acondicionado em um dessecador a fim de evitar que o pó ficasse úmido até a utilização.



Fonte: Autoria própria 2021

Assim, os extratos vegetais foram preparados seguindo a metodologia proposta por Pandini *et al.*, (2015) com algumas alterações. Foram utilizados quatro solventes de polaridades diferentes, sendo eles: éter de petróleo, diclorometano, etanol e água destilada. Com proporção utilizada de material vegetal seco: solvente 1:4 (v/s), a extração foi exaustiva a frio, não havendo elevação de temperatura e a extração ocorreu até o esgotamento da matriz vegetal.

Inicialmente pesou-se aproximadamente 100 gramas do material vegetal seco, acondicionado em erlenmeyer de 500 mL, posteriormente foi adicionado cerca de 400 mL do primeiro solvente extrator, o erlenmeyer foi fechado com auxílio de papel alumínio () e submetido a agitação no shaker (Marq Labor CFW 08) à 200 rpm por 48 horas. Passado esse tempo, a mistura sólido•líquido foi filtrada com auxílio de um funil de buchner, kitasato e bomba de vácuo, a fim de separar o líquido do material vegetal para submeter o material à extração novamente. Após filtração, foi adicionado novamente o solvente extrator ao material vegetal o qual foi submetido as mesmas condições de extração. A solução filtrada, foi concentrada em evaporador rotativo (TE•211) (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) à 39 °C à 9 rpm.

Figura 8 • Extração.



Figura 9 • Evaporador rotativo.



Fonte: Autoria própria 2021

Cada solvente foi renovado 3 vezes, após passar o período de renovação de cada solvente, os solventes foram trocados, iniciando por éter de petróleo P.A., após

diclorometano P.A., etanol 92,8% e por fim água destilada, as extrações ocorreram em um período de 24 dias. Os extratos foram identificados como E1, E2 e E3.

Os extratos permaneceram na capela por 7 dias para finalizar a evaporação do restante do solvente, após os mesmos foram tampados com auxílio de papel alumínio e acondicionados na geladeira até serem liofilizados. Foram então liofilizados e armazenados à 4 °C para evitar que ocorresse degradação dos metabólitos. Após, foram pesados e cálculos do rendimento foram feitos de acordo com a equação:

$$\text{Porcentagem (\%)} = \frac{\text{massa do extrato (g)}}{\text{massa vegetal seca moída (g)}} \cdot 100$$

5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.1 Antimicrobianos

Os agentes antimicrobianos são substâncias capazes de inibir o crescimento ou ocasionar a destruição de microrganismos (protozoários, fungos, algas e bactérias). Uma das classificações para os agentes antimicrobianos são bactericidas que ocasionam a morte dos microrganismos, ou bacteriostáticos que promovem a inibição do crescimento microbiano (ANVISA, 2008).

Entre os microrganismos, as bactérias são seres unicelulares, pois são formadas por uma única célula e procariontes por possuírem o material genético disperso no citoplasma (MELO *et al.* 2012). Elas se diferenciam entre si por conta da sua morfologia, composição química e atividades bioquímicas e nutricionais, além disso, são classificadas como Gram•positivas e Gram•negativas, esses grupos se diferenciam em função da composição e estrutura da parede celular. As positivas possuem a parede bacteriana espessa e formada por peptidoglicano, já as negativas possuem duas paredes sendo a externa e a peptidoglicano, mas são mais finas (MOREIRA; CARVALHO; FROTA, 2015).

Para determinação das atividades antimicrobianas, os métodos utilizados foram difusão em disco e concentração inibitória mínima (CIM). Difusão em disco baseia-se na testagem de microrganismos contra substâncias biologicamente ativas em meio de cultura sólida, observando se há ausência ou presença de halos de

inibição, com um gradiente de concentração da substância avaliada, relacionado à concentração inibitória mínima (CIM). A concentração inibitória mínima (CIM), corresponde à menor diluição em que é verificada a ausência do crescimento microbiano (HOLETZ et al., 2002).

As técnicas utilizadas seguiram o protocolo padrão CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), documento M02•A11 (Padrões de desempenho para testes em discos de susceptibilidade antimicrobiana), M7•A6 (Metodologia do Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico), houveram algumas alterações durante os procedimentos.

5.2 Microrganismos utilizados

Os extratos foram testados contra as cepas de bactérias Gram•positivas *Staphylococcus aureus* (SA) ATCC 25923 e *Bacillus subtilis* (BC) ATCC 19659 e Gram•negativas *Salmonella enterica Typhimurium* (ST) ATCC 0028 e *Escherichia coli* (EC) ATCC 25922. Essas bactérias são provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC).

5.3 Suspensão bacteriana

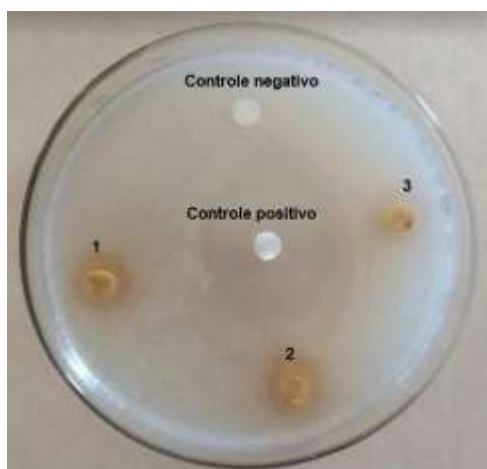
Preparou-se caldo BHI (Brain Heart Infusion) de acordo com o fabricante, para ativação das bactérias. O caldo foi depositado em tubos de ensaio para as bactérias serem inoculadas, em seguida, estas foram incubadas por 24h à temperatura de 36 °C. Depois da ativação, as cepas foram repicadas em tubos de ensaio, os quais possuíam solução salina (NaCl) estéril na concentração 0,9% até atingir turbidez comparáveis com a solução padrão de BaSO₄ da escala McFarland de concentração 0,5 (1,5x10⁸ UFC mL⁻¹).

Os materiais utilizados para todas as metodologias descritas nos procedimentos de análises microbiológicas foram esterilizados em autoclave, além disso, os procedimentos foram realizados em meio estéril.

5.4 Método de difusão em disco

Os ensaios de difusão em disco foram realizados de acordo com CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2003,2008) e Oliveira (2016), com modificações. Nesse sentido, preparou-se ágar Muller Hinton de acordo com o fabricante, após foram depositados em placas de Petri. Foram inoculadas as placas de Petri por superfície (spread plate), o qual foi adicionado 100 uL da suspensão bacteriana previamente padronizada em escala MacFarland 0,5. Após, foram adicionadas nas placas de Petri (inoculada com cada microrganismos a ser testado), discos de papel com 5 mm de diâmetro. Assim, impregnou-se com 10 µL de cada extrato os discos de papel filtro, os quais foram pressionados levemente contra as placas para que ficassem em contato por completo com o ágar inoculado. Para controle positivo, foi utilizado a clorexidina como antimicrobiano, a qual foi preparada pesando-se 0,001 g, após foi adicionado 10 µL de DMSO e 990 µL de solução salina estéril 0,9% e obteve-se concentração final de 1mg mL⁻¹. Como controle negativo foi utilizado solução salina estéril 0,9%. Foram adicionados 10 µL dos controles nos discos de papel e foram inseridos nas placas de Petri juntamente com os discos embebidos com os extratos, a demonstra o teste nas placas. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 h à temperatura de 36 °C, passado esse período, realizou-se a medição dos halos de inibição, os quais foram produzidos em triplicata e o resultado final corresponde à média aritmética do tamanho do raio dos halos de inibição.

Figura 10 • Esquema para determinação de difusão em disco



Fonte: Autoria própria 2021

Para a solubilização dos extratos foi seguido a metodologia proposta por Ostrosky et al., (2008), desse modo as amostras dos quatro extratos foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) PA.

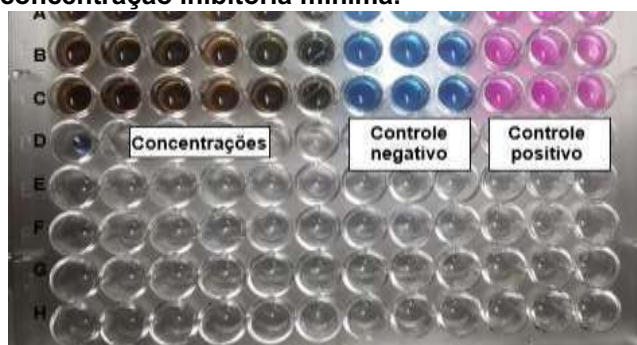
5.5 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de microdiluição seguiram a metodologia proposta nos protocolos M27•A3 e M7•A6 e os autores Oliveira (2018), Ostrosky *et al.*, (2008) e Oliveira (2016). Assim, partiu-se dos extratos que apresentaram halos de inibição na metodologia de difusão em disco.

Inicialmente, realizou-se diluição seriada para os extratos de etanol (1018, 509, 254,5, 127,25, 63,62, 31,81) $\mu\text{g mL}^{-1}$ e de água (1030, 515, 257,5, 128,75, 64,37, 32,18) $\mu\text{g mL}^{-1}$. Utilizou-se placas com 96 orifícios, com 12 colunas numeradas de 1 a 12 e 8 linhas nomeadas de A até H. Todos os orifícios das placas que foram utilizados receberam 40 μL das concentrações dos extratos de etanol e água, 50 μL de caldo Muller Hinton, 10 μL de solução suspensa com as bactérias, na ordem de maior concentração para menor, iniciando do orifício 1 até o 6, seguindo esta ordem de adição a fim de evitar possíveis contaminações.

Também foram depositados nas placas, antimicrobiano para controle positivo, a clorexidina 1mg mL^{-1} e para controle negativo, solução salina estéril 0,9% juntamente com o caldo (50 μL) e a suspensão bacteriana (10 μL). Depois desse procedimento, as placas foram incubadas por 24 h à temperatura de 36 °C. Após esse período, foi adicionado em cada poço 20 μL de solução aquosa de resazurina 0,001% m mL^{-1} de coloração azul•violeta como indicador e realizado leitura das placas depois de 2 horas, sendo que, a coloração azul indicava a ocorrência de morte ou inativação dos microrganismos e a coloração rosa indica inibição. A demonstra o esquema das placas do teste de CIM.

Figura 11 • Esquema para determinação de concentração inibitória mínima.



Fonte: Aatoria própria 2021.

Para as linhas A, B e C, foram depositadas as seguintes concentrações dos extratos na coluna 1 para etanol 1018 e água 1030. Coluna 2, etanol 509 e água 515. Na 3, 254 etanol e 257,5 água. Linha 4 etanol 127,25 e água 128,75. Coluna 5 etanol 63,62 e água 64,37. Por fim, na 6 31,81 etanol e 32,18 água. Após, foram depositados nas colunas 7, 8 e 9 controle negativo e nas 10, 11 e 12 o controle positivo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÕES

Antes de realizar uma extração, é importante considerar alguns fatores que podem interferir no rendimento, como a característica do material vegetal, o solvente extrator e a metodologia de extração (SIMÕES, 2017). A granulometria do material pode possibilitar ou impossibilitar a extração de alguns compostos. Quanto menor o tamanho das partículas, maior a superfície de contato entre o material vegetal e o solvente extrator tornando a extração mais eficiente. A escolha do solvente também influencia no rendimento dos extratos, por conta da polaridade, seletividade e solubilidade (FONSÊCA, 2005).

Quando não há um conhecimento direcionado sobre os compostos da matriz vegetal que será extraída, é necessário submeter o material a uma extração contínua com solventes em gradiente de polaridade (crescente), para obter extratos com compostos também em gradiente (SIMÕES, 2017).

Obteve-se os seguintes rendimentos dos extratos de *E. involucrata* DC com os solventes em gradiente de polaridade (de apolar até polar): éter de petróleo 2,66%, diclorometano 5,61%, etanol 12,01% e água destilada 8,24%. Resultados próximos aos obtidos por Toledo (2018), o qual realizou extrações das folhas da *E. involucrata* através de uma metodologia semelhante a este trabalho, e obteve para diclorometano 6,31%, etanol 19,42% e água 9,84% e para o hexano, solvente de polaridade semelhante ao do éter de petróleo, o autor obteve 6,35% de rendimento.

É perceptível que ao aumentar a polaridade do solvente o rendimento também aumenta, isso pode estar correlacionado com o fato de os compostos que estão presentes nas folhas da cerejeira, possuírem características polares, visto que o éter de petróleo tem a capacidade em extrair maior quantidade de compostos apolares e que pelo seu rendimento pode-se afirmar que os compostos apolares estão presentes em pouca quantidade nas folhas. O diclorometano tem a capacidade de extrair substâncias lipofílicas, óleos fixos, ceras e agliconas (SIMÕES, 2017). Já o etanol é um dos solventes mais utilizados por ter a capacidade de extrair diversos compostos de interesse, por ser uma molécula que possui característica anfifílica, ou seja, capacidade de extrair moléculas polares e

apolares, podendo extrair compostos como ceras, agliconas, sesquiterpenos, fitosteróis, hidrocarbonetos não voláteis, hidrocarbonetos de baixa massa molar, sais orgânicos, polissacarídeos e compostos fenólicos (SIMÕES, 2017). Em relação à água, solvente polar, há vários relatos na literatura, como os extratos aquosos das espécies *Eugenia*, de onde foram isolados e identificados terpenos (INFANTE et al., 2016), taninos (VECHI, 2015), polifenóis (TOLEDO et al., 2020), flavonoides e catequinas, além de apresentarem atividades antimicrobiana e alelopática (SAUSEN, 2009).

Vechi, (2015) preparou extratos da folha da cerejeira coletadas em diferentes épocas do ano, com metanol, por maceração e obteve rendimento de 5,63% no mês de janeiro, 3,75% em julho e de 3,19% em dezembro. Essa diferença está atrelada à produção dos metabólitos produzidos pela planta de acordo com cada época do ano, a escolha da técnica de extração e o solvente extrator utilizado.

6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

6.1 Difusão em disco

O teste biológico de difusão em disco é uma metodologia simples e confiável, sendo uma das metodologias mais utilizadas nos laboratórios de microbiologia. Consiste na difusão do antimicrobiano na superfície ágar, por meio de um disco de papel impregnado com o antimicrobiano em concentrações fixas e alocado na placa Petri contendo ágar inoculado. Os diâmetros que são denominados de halos de inibição de crescimento ao redor dos discos, demonstram a sensibilidade do microrganismo à amostra. Assim, os halos de inibição são medidos e podem ser correlacionados com a concentração inibitória mínima (CIM), sendo que, o tamanho dos halos é inversamente proporcional à CIM (ANVISA, 2008).

Quando não há presença de crescimento microbiano ao redor do disco, significa que a amostra estudada tem capacidade de inibir o crescimento dos microrganismos, sendo que, a atividade antibacteriana é diretamente proporcional ao diâmetro do halo de inibição formado (ANVISA, 2008).

Após os ensaios de difusão em disco, foi evidenciado que dos quatro extratos testados para as quatro cepas microbianas, apenas os extratos etanólico e

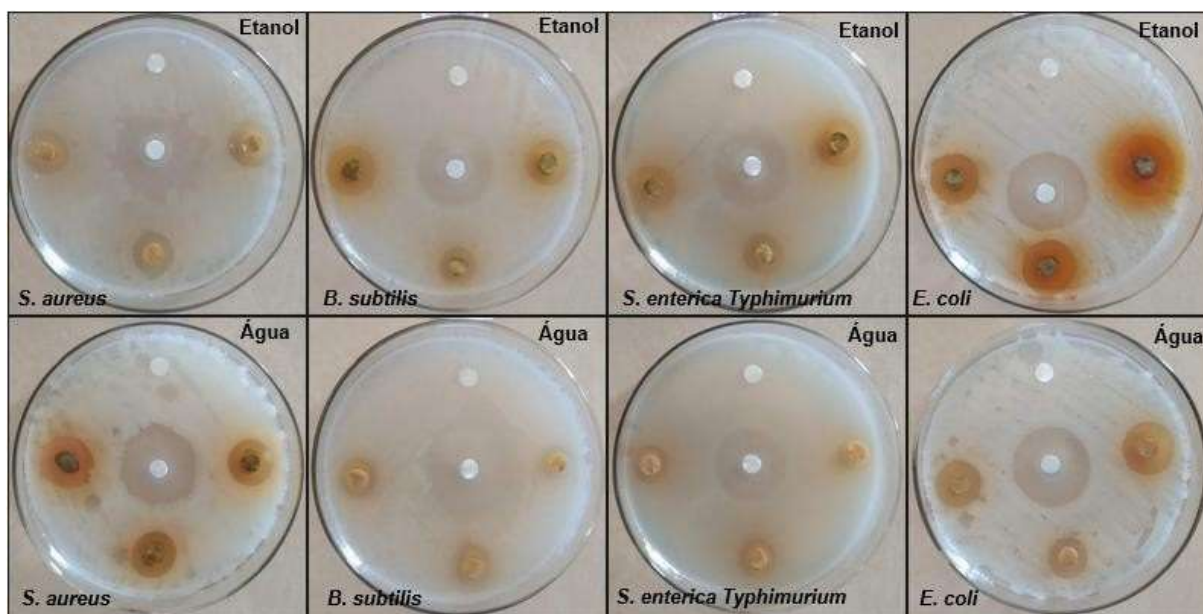
aquoso apresentaram halos de inibição, sendo que, ambos apresentaram potencial atividade antimicrobiana frente as quatro cepas testadas. Os extratos de éter de petróleo e diclorometano não foram capazes de inibir o crescimento bacteriano das bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. enterica Typhimurium* e *E. Coli*.

A não formação dos halos de inibição nos testes com os extratos que não inibiram o crescimento (éter de petróleo e diclorometano), pode estar relacionada com a composição dos compostos bioativos dos mesmos. A presença dos grupos que têm capacidade de inibir o crescimento pode ser relativamente baixa, não sendo o suficiente para inibir o crescimento microbiano. Dos extratos de éter de petróleo e diclorometano, os únicos halos de inibição que se formaram foram do controle positivo, o antibiótico clorexidina, sendo, portanto, um indicativo de que as cepas estavam ativas. Os extratos de etanol e água apresentaram rendimento maior que os demais, e, portanto, possivelmente maior concentração e/ou variedade de metabólitos ativos, conferindo-lhes maior capacidade de inibição do crescimento microbiano.

Os tamanhos dos halos variaram de acordo com cada microrganismo testado, nas diferentes concentrações das amostras de diferentes solventes. Os maiores valores de halos de inibição foram detectados para o extrato etanólico, relatados a seguir por ordem crescente de tamanho. Para *E. coli*, com diâmetro de 19,5 mm na zona 3, para *S. aureus* com 18,00 mm na zona 1, para *S. enterica Typhimurium* halo de 16,5 mm na zona 3 e para *B. subtilis* 15,5 mm na zona 1. Para o extrato aquoso, o maior halo de inibição foi para *S. Aureus* com 16,0 mm na zona 3, seguido da *E. Coli* com 15,5 mm, para *B. subtilis* zona 2 com 14,0 mm e para *S. enterica Typhimurium* zona 2 com 13,0 mm.

Na Figura 12 é possível observar as placas utilizadas no método de difusão em disco e os halos de inibição com as respectivas triplicatas, e também na **Tabela 2** é demonstrado a média, além do desvio padrão do diâmetro dos halos de cada zona de inibição. Na **Tabela 3** é apresentado a média e o desvio padrão das triplicatas e também apresentado a média do antimicrobiano padrão.

Figura 12 • Halos de inibição frente às cepas testadas para extratos de etanol e água.



Fonte: Autoria própria 2021

Tabela 2 • Média \pm desvio padrão (D.P.) do diâmetro dos halos de inibição obtidos na análise de difusão em disco frente às quatro cepas bacterianas testadas em relação aos quatro extratos EP: éter de petróleo, ED: diclorometano, ET: etanol, e EAD: água destilada.

Extrato	Halo de inibição em mm	Cepas Microbianas			
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. enterica Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
EP	1	•	•	•	•
	2	•	•	•	•
	3	•	•	•	•
ED	1	•	•	•	•
	2	•	•	•	•
	3	•	•	•	•
ET	1	18,0 \pm 1,4	15,5 \pm 0,7	14,5 \pm 0,7	16,0 \pm 0,0
	2	12,0 \pm 1,4	13,0 \pm 0,0	13,5 \pm 0,7	17,5 \pm 0,7
	3	16,0 \pm 0,0	14,5 \pm 0,7	16,5 \pm 0,7	19,5 \pm 0,7
EAD	1	14,5 \pm 0,7	13,5 \pm 0,7	11,5 \pm 0,7	14,5 \pm 0,7
	2	15,5 \pm 0,7	14,0 \pm 1,4	13,0 \pm 0,0	13,0 \pm 1,4
	3	16,0 \pm 0,0	11,5 \pm 0,7	11,5 \pm 0,7	15,5 \pm 0,7

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3 • Média \pm desvio padrão (D.P.) das zonas de inibição obtidos na análise de difusão em disco referente aos extratos EP: éter de petróleo, ED: diclorometano, ET: etanol, e EAD: água destilada. Antimicrobiano padrão clorexidina.

	Cepas Microbianas				
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. enterica Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	
EP	•	•	•	•	
ED	•	•	•	•	
ET	15,3 \pm 3,1	14,3 \pm 1,3	14,8 \pm 1,5	17,7 \pm 1,8	
EAD	15,3 \pm 0,8	13,0 \pm 1,3	12 \pm 1,3	14,3 \pm 1,3	
Clorexidina	28,4 \pm 3,8	25 \pm 4,7	24,4 \pm 4,8	22,8 \pm 2,3	

Fonte: Autoria própria.

O extrato etanólico apresentou halo de inibição para *S. aureus*, em comparação com a literatura, Sato *et al.*, 2018, também relataram a formação de halo de inibição para essa mesma bactéria, testando frente ao extrato etanólico das folhas da *E. involucrata* nas concentrações de 3, 6 e 12 mg mL⁻¹, a diferença em relação a esse trabalho, foi que para o extrato com o solvente diclorometano também evidenciaram halo de inibição.

Toledo, (2018) realizou um estudo utilizando os extratos das folhas da *E. involucrata*, para *B. subtilis* apresentou CIM para extrato diclorometano e etanólico de 6,25 mg mL⁻¹, para extrato aquoso de 100 mg mL⁻¹, o que corrobora para os halos encontrados frente a esse patógeno, nos extratos etanólico e aquoso.

Apesar de os trabalhos associando fitoquímica à microbiologia, utilizando a cerejeira serem escassos, é importante ressaltar que outras espécies do gênero também já apresentaram ação contra microrganismos como por exemplo, a *E. calycina* Cambess para *B. subtilis* (SOUSA *et al.*, 2015). Extratos hidroalcólicos das folhas da *E. uniflora*, apresentaram halos de inibição para *S. aureus* (LAZZAROTTO• FIGUEIRÓ *et al.*, 2021). Extratos etanólicos da *E. caryophyllata* foram eficazes contra *S. enterica Typhimurium* (CHESCA *et al.*, 2017).

5.2.1 Concentração inibitória mínima

Para efeito de confirmação dos resultados do teste de difusão em disco, a seguir são demonstrados os ensaios de determinação de concentração inibitória mínima (CIM), realizado pela metodologia de microdiluição em caldo dos extratos que apresentaram halos de inibição.

A concentração inibitória mínima (CIM) é a última concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. Holetz *et al.*, (2002) relatam que para extratos vegetais resultados acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indicam que não há inibição para o crescimento microbiano, resultados entre 1000•500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostram que a atividade é fraca, já os resultados entre 500•100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ condiz com atividade moderada, e atividade abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ corresponde com boa atividade antimicrobiana.

Os extratos de etanol e água testados frente as quatro bactérias apresentaram atividade antimicrobiana de moderada a boa, sendo que, as prospecções do extrato de etanol foram melhor em comparação com o de água, essa observação já havia sido perceptível no teste de disco difusão, pois os diâmetros dos halos de inibição foram maiores.

Nesse sentindo, o maior halo de inibição foi do extrato etanólico testado para *E. Coli*, apresentando boa concentração inibitória mínima, com valor de 63,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Ao comparar os dois extratos (etanólico e aquoso), frente a *S. aureus* é evidente que os mesmos apresentaram CIM parecida, e isso também condiz com o teste de difusão em disco em que o tamanho de seus halos de inibição ficaram com média de tamanhos iguais, ambos com 15,3 mm. Dessa forma, apresentaram concentração inibitória mínima moderada.

Para os microrganismos *B. subtilis* e *S. enterica Typhimurium* os extratos de etanol e água apresentaram atividade inibitória moderada também.

Na tabela estão demonstrados os valores de concentração inibitória mínima frente as bactérias testadas.

Tabela 4 • Valor de concentração inibitória mínima em $\mu\text{g mL}^{-1}$ dos extratos ET: etanol e EAD: água destilada..

Extrato	Concentração inibitória mínima $\mu\text{g mL}^{-1}$			
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. enterica Typhimurium</i>	<i>E. coli</i>
ET	127,25	127,25	127,25	63,62
EAD	128,75	257,50	257,50	128,75

Fonte: Autoria própria

Toledo, (2018) em estudo realizado apresenta que, para o extrato etanólico das folhas da cerejeira, apresentou atividade boa (CIM <100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para os

patógenos *S. aureus* e *B. subtilis*, diferente deste estudo, que apresentou atividade moderada (CIM 127, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 127.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

O extrato aquoso do autor, apresentou atividade fraca (CIM 1000•500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) frente a *S. aureus* e *B. subtilis*, em comparação, este trabalho apresentou atividade moderada (CIM 128,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 257,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Ainda segundo o mesmo autor, para *S. enterica Typhimurium*, o extrato etanólico apresentou boa atividade (CIM <100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), neste trabalho, a atividade apresentada foi considerada moderada (CIM 127,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para o extrato aquoso atividade fraca (CIM 1000•500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), neste trabalho a concentração condiz com a do autor.

Para *E. coli*, o extrato etanólico, segundo o mesmo relato, apresentou atividade moderada (CIM 500•100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em comparação, este trabalho apresentou boa atividade (CIM 63,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e o extrato aquoso apresentou fraca atividade (CIM 1000•500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o autor e neste trabalho moderada (CIM 128,75 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estas variações podem estar atreladas às condições climáticas, época da colheita das folhas e metodologia de extração.

Vechi, (2015) em seu estudo, utilizando o extrato bruto metanólico das folhas da cerejeira coletadas em diferentes épocas do ano, relatou atividade moderada para *S. aureus* e atividade fraca para *E. coli*, o mesmo não apresentou atividade contra *B. subtilis*.

Vicente (2020), em seu trabalho apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S.aureus* para a *E. klotzschiana*. Os extratos da *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana*, *Eugenia umbeliflora* foram testadas frente a *S. aureus*, *E. coli* e se mostraram ativas (MAGINA, 2008).

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que existe atividade antimicrobiana detectável nos extratos etanoico e aquoso contra as quatro cepas bacterianas, o etanoico demonstrou melhor potencial e além disso, melhor rendimento. Os extratos de éter de petróleo e diclorometano não apresentaram inibição e isso pode ter sido influenciado pela época de coleta das folhas, influência de condições climáticas sobre a composição química desses extratos.

Foi perceptível nesse estudo que o método de difusão em disco se mostrou efetivo, por ser um método simples, é confiável e econômico para determinação antimicrobiana preliminar. Assim, foi possível confirmar seu potencial na concentração inibitória mínima, em que o extrato de etanol frente a *E. coli* apresentou boa atividade antimicrobiana. Resumidamente, os dois extratos que demonstraram potencial antimicrobiano, ficaram com atividade moderada.

É importante aplicar outra metodologia para extração com solventes apolar e média polaridade (éter de petróleo e diclorometano) para possibilitar uma melhor extração e aumentar o rendimento, aumentando possivelmente a concentração de metabólitos, e dessa forma, testá-los em cepas bacterianas e de leveduras.

Esse estudo fundamenta os estudos sobre a cerejeira que são escassos comparados com outras espécies do gênero, a qual tem grande potencial em relação as demais do gênero, como antibiótico, anti-inflamatório e antioxidante, possibilitando a agregação de valor a essa espécie.

REFERÊNCIAS

ANVISA. **RESOLUÇÃO • RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007**, 2007. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2007/rdc0002_15_01_2007.html>.

ANVISA. **Uso racional de antimicrobianos e a resistência microbiana**. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos5.htm>

BARBOSA, R. P. Recursos Naturais e Biodiversidade: Preservação e Conservação dos Ecossistemas. In: **SARAIVA** (Ed.). . 1. ed. [s.l: s.n.]. p. 29–32.

BARZOTTO, I. L. M. Otimização de extratos de *Eugenia involucrata* DC. [s.l: s.n.].

BÜNGER, M. D. O. et al. The evolutionary history of *Eugenia* sect. *Phyllocalyx* (Myrtaceae) corroborates historically stable areas in the southern Atlantic forests. **Annals of Botany**, v. 118, n. 7, p. 1209–1223, 1 dez. 2016.

CARVALHO, P. E. R. Cerejeira *Eugenia involucrata*. **Embrapa**, jul. 2009.

CHESCA, A. C. et al. Estudo comparativo da atividade antibacteriana do extrato de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) extraído por via etanólica e metanólica. dez. 2017.

COSTA, K. Á. et al. Estudo do processo de lixiviação controlada da escória de aciaria em extrator soxhlet visando emprego em pavimentos. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, n. 2, 1 jun. 2017.

CUNHA, A. L. et al. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175, 1 maio 2016.

D'ALMEIDA, W. O. Morfoanatomia de folha e caule, caracterização química e atividade biológica de óleo essencial de *Eugenia involucrata* DC.: Uma abordagem interdisciplinar. [s.l.] **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, 15 maio 2019.

DAMETTO, A. C. Estudo químico e avaliação de atividades biológicas de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia involucrata* (Myrtaceae). [s.l.] **Universidade Estadual Paulista** (UNESP), 24 abr. 2014.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. v. 39, p. 120–130, maio 2017.

FILHO, V. C.; ZANCHET, C. C. C. **Fitoterapia Avançada: Uma abordagem química, biológica e nutricional**. Porto Alegre: [s.n.].

FONSÊCA, S. G. DA C. Farmacotécnica de Fitoterápicos. 2005.

GIRARDELO, J. R. Potencial antioxidante e antitumoral dos frutos e sementes de *Eugenia involucrata* DC. (Cerejeira-do-rio-grande) e dos frutos de diferentes genótipos de *rubus* spp. (amoreira preta). [s.l.: s.n.].

GOBBO•NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, mar. 2007.

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

INFANTE, J. et al. Antioxidant and Anti•Inflammatory Activities of Unexplored Brazilian Native Fruits. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0152974, 1 abr. 2016.

LAZZAROTTO•FIGUEIRÓ, J. et al. Antioxidant activity, antibacterial and inhibitory effect of intestinal disaccharidases of extracts obtained from eugenia uniflora L. Seeds. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, p. 291–300, 2021.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. [s.l: s.n.]. v. 1

MAGINA, M. D. A. Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero eugenia. [s.l.] Florianópolis, SC, 2008.

MARIOT, M. P.; BARBIERI, ; Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss. e M. aquifolium Mart.*). [s.l: s.n.].

MELO, V. V. DE; DUARTE, I. DE P.; QUEIROZ, A. **Guia Antimicrobianos**. 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. **Ministério da saúde**, v. 1, p. 11–13, 2006.

MOREIRA, J. L. B.; CARVALHO, C. B. M. DE; FROTA, C. C. Visualização bacteriana e colorações. 2015.

OLIVEIRA, Cledes Terezinha de. **Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *BaccharisoreophilaMalme***. 2016. 58p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2016.

ORELLANA, J. T. et al. Seasonality and the Relationships Between Reproductive and Leaf Phenophases In Myrtaceae Using Field and Herbarium Data. **Floresta e Ambiente**, v. 28, n. 1, p. 20200035, 2020.

OSTROSKY, E. A. et al. **Methods for evaluation of the antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of plant extracts** *Revista Brasileira de Farmacognosia* Sociedade Brasileira de Farmacognosia, , 2008.

PANDINI, J. A. et al. **Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss.** v. 9, n. 3, p. 48–55, 17 jan. 2015.

SATO, T. S. et al. Proposal of a formulation containing leaves extract of *Eugenia involucrata*. **Revista Fitos**, v. 12, n. 1, p. 68–82, 5 abr. 2018.

SAUSEN, T. L. **Avaliação da atividade alelopática do extrato aquoso de folhas de *Eugenia involucrata* DC. e *Acca sellowiana* (O. Berg) Burret.**

SILVEIRA, M. J.; Harthman, v. C. Anatomia foliar de *eugenia involucrata* dc. *E e. Bracteata* (Myrtaceae). **Revista de Botânica•Journal of Botany INSULA**, v. 39, p. 2178–4574, 2010.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento.** Porto Alegre: [s.n.].

SOARES, J. C. J. **Avaliação da seletividade da extração com CO₂ supercrítico das folhas de *Eugenia involucrata* (cerejeira-do-mato) da floresta ombrófila mista de Santa Catarina.** p. 118, 2017.

SOUSA, R. M. F. et al. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. **Industrial Crops and Products**, v. 65, p. 71–78, 1 mar. 2015.

TOLEDO, A. G. **Composição química e atividades biológicas das folhas de *Eugenia involucrata* DC.** [s.l.] Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 5 mar. 2018.

TOLEDO, A. G. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of leaves of *Eugenia involucrata* DC. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, p. 568–577, 1 mar. 2020.

TOLEDO, A. G. et al. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical prospection of *Eugenia involucrata* DC. leaf extracts. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, 28 jun. 2021.

VECHI, G. **Potencial biológico e composição química das folhas de *Eugenia involucrata* DC. (cerejinha do mato).** p. 80, jul. 2015.

VELOSO, J. H. **O gênero *Eugenia*: da química à farmacologia**Aleph. [s.l.] Universidade Estadual Paulista (UNESP), 29 jan. 2016.

VICENTE, E. O. **Atividade antimicrobiana de extratos de folhas, caules e raízes de *Eugenia klotzschiana* O. Berg (Myrtaceae).** 2020.

VIEGAS, C. et al. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna** quim. Nova. [s.l: s.n.].