

POTENCIAL *IN VITRO* DE EXTRATOS AQUOSOS DE ORA-PRO-NOBIS

AUTOR

LOPES, André Vinícius Castelucci

Discente do Curso de Nutrição – UNILAGO

CATTELAN, Marília Gonçalves

Docente do Curso de Nutrição- UNILAGO

RESUMO

Este trabalho analisou a capacidade antimicrobiana do extrato da *Pereskia aculeata*, conhecida popularmente como “Ora-pro-nobis”, sobre dois micro-organismos contaminantes de alimentos, a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O teste foi feito com extrato da ora-pro-nobis em diferentes concentrações: 25%,50%,75% e puro (100%); a diluição foi feita com água estéril. A avaliação do efeito *in vitro* de extratos aquosos de *Ora-pro-nobis* sobre o desenvolvimento microbiano foi efetuada por meio da técnica de diluição em ágar por disco. A pesquisa mostrou que o extrato não produziu nenhum efeito significativo com a bactéria *Escherichia coli*. Porém, quando *Staphylococcus aureus* foi exposta aos extratos, seu desenvolvimento foi favorecido, evidenciando um efeito sinérgico.

PALAVRAS - CHAVE

Ora-pro-nóbis. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*.

1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com o objetivo de descobrir compostos com atividade comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos e com menor impacto ambiental (BONA *et al.*, 2014).

O Brasil é um país com uma vasta biodiversidade de plantas onde são encontrados ricos nutrientes e minerais. As hortaliças não convencionais são alternativas alimentar a uma opção de atividade agropecuária, podendo gerar trabalho, emprego e renda, além de serem plantas com excelente valor nutricional, de fácil cultivo e baixo custo (DIAS; DURIGAN; GUIMARÃES, 2018).

A Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) é uma planta pertencente à família Cactácea, originária das Américas e com cultivo desde a Flórida (EUA) até o território brasileiro. A planta possui diversos nomes populares, dentre os quais se encontram: trepadeira limão e carne de pobre (MARTINEVSKI *et al.*, 2013). As folhas de Ora-pro-nobis são comestíveis, podendo ser usadas em várias preparações, como farinhas, saladas, refogados, tortas e massas alimentícias, além do preparo de pratos típicos. Essa potencialidade aplicada às comunidades menos assistidas socioeconomicamente se consagram como uma estratégia para a segurança alimentar, que é uma das bases da agroecologia (DIAS; DURIGAN; GUIMARÃES, 2018).

A ora-pro-nobis possui alto potencial de utilização, porém é cultivada de forma marginal pelos produtores rurais, principalmente em virtude do aumento do consumo de alimentos industrializados (KINUPP, 2006). Uma das características marcantes desta planta é o teor de proteína presente em suas folhas, podendo chegar a cerca de 25%, em matéria seca, da qual 85% encontra-se em forma digestível, fator de destaque para o consumo na alimentação. Além disso, ela pode ser utilizada no tratamento de processos inflamatórios e na recuperação da pele em decorrência de queimaduras (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Estudos afirmam que alguns extratos de plantas possuem efeito antimicrobiano; porém, não são explorados em sua totalidade. Um desses casos é o da Ora-pro-nobis. Pimenta e colaboradores (2020) afirmaram que o extrato provido da planta *Pereskia aculeata* possui potencial antimicrobiano. O teste foi positivo tanto contra bactérias (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) quanto para fungos das espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium expansum* e *Penicillium citrinum* (PIMENTA, 2020). Estudo conduzido por Garcia *et al.* (2019) também confirmou atividade antimicrobiana de extratos de Ora-pro-nobis sobre bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*), sugerindo um amplo espectro de ação do composto. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de extratos aquosos das folhas de ora-pro-nobis sobre o desenvolvimento de duas cepas bacterianas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Atividade biológica de ora-pro-nobis

Em estudo desenvolvido em 2016, Rodrigues relata que extratos aquosos e/ou alcoólicos de folhas, caules e raízes de ora-pro-nobis têm sido testados quanto aos potenciais efeitos biológicos, dentre os quais antimicrobiano, antitumoral, anti-inflamatório, antioxidante e cicatrizante. Os autores, na mesma pesquisa,

estudaram os efeitos antioxidantes e antimicrobianos da planta, notando que amostras obtidas de extratos das folhas apresentaram atividade antioxidante, e que o extrato aquoso resultante por agitação a 95° C foi o que apresentou maior atividade pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS^{•+}, além de maior teor de compostos fenólicos e totais quando comparado às demais amostras. Quando avaliado o efeito antimicrobiano, os autores não obtiveram sucesso com as amostras testadas sobre diversas espécies.

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas e direcionadas no descobrimento de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos de plantas e outros produtos naturais, para serem aplicados em produtos farmacêuticos e cosméticos. Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais (BONA *et al.*, 2014).

Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macro diluição e micro diluição. A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para inibir o crescimento do micro-organismo-teste, esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou da Concentração Bactericida Mínima (CBM) de extratos vegetais, tem-se utilizado mais frequentemente o método de micro diluição em caldo (BONA *et al.*, 2014).

2.2. Metodologias para estudo da atividade antimicrobiana

2.2.1 Métodos de difusão

A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de micro-organismos (OSTROSKY *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Teste de difusão em disco

O teste de difusão em ágar por disco consiste na aplicação de uma determinada alíquota da solução do agente antimicrobiano teste em discos de papel de filtro (geralmente de 6 mm de diâmetro). Os discos são inseridos sobre meio de cultura sólido, em placas de Petri, previamente inoculado com cargas microbianas pré-definidas. Após incubação em condições específicas para o desenvolvimento microbiano, a formação de possíveis halos ao redor dos discos é avaliada em função do tamanho (diâmetro), conforme Ostrosky *et al.*, 2008.

2.2.1.2 Difusão em ágar por poço

Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas. Decorrido o período de incubação para o microrganismo empregado, a formação de possíveis zonas é avaliada em função de seu diâmetro (OSTROSKY *et al.*, 2008).

2.2.2 Métodos de diluição

Os métodos de diluição em caldo consideram a relação entre a proporção de crescimento do micro-organismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é feita frente a um padrão biológico de referência. Entende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. O método fornece resultados quantitativos e não é influenciado pela velocidade de crescimento dos micro-organismos. Sua desvantagem é a dificuldade na detecção de contaminação no caso de teste de materiais clínicos. Como controle positivo, utiliza-se o caldo com o quimioterápico padrão com a suspensão padronizada de microrganismo em teste, e como controle negativo o meio de cultura com o solvente usado para dissolução da amostra e a suspensão microbiana (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

2.2.2.1 Macro diluição

A macro diluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL. Por ser laborioso, consumir muito tempo, requerer muito espaço no laboratório e gerar grande quantidade de resíduos é usado pequeno número de réplicas (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

2.2.2.2 Micro diluição

A micro diluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Eloff (1998) utilizou a técnica de diluição em microplacas para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Além da influência do método empregado para o estudo do efeito antimicrobiano, outros fatores devem ser considerados. São eles: meio de cultura, pH, disponibilidade de oxigênio, concentração de inóculo e condições de incubação. Os meios de cultura devem proporcionar um crescimento adequado aos organismos a serem desafiados e não conter substâncias antagônicas à atividade antimicrobiana. O pH deve ser compatível com o crescimento microbiano, com a atividade e a estabilidade das substâncias testadas. Disponibilidade de oxigênio deve existir conforme o metabolismo do micro-organismo desafiante. A padronização da quantidade de inóculo a ser empregada deverá ser estabelecida para cada método desenvolvido. Para bactérias, a incubação deve ser conduzida a 35-37° C e, para fungos, entre 25 e 27° C. No método de diluição, as condições de crescimento dos microrganismos nos tubos devem ser semelhantes, propiciando-se a mesma temperatura e agitação (OSTROSKY *et al.*, 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Cultura microbiana

Escherichia coli e *Staphylococcus aureus* foram mantidos em Ágar Nutriente (NA) a 4°C, e reativadas também em NA a 35°C por 24 horas. A contagem microbiana foi padronizada de acordo com a escala 0,5 de Mc Farland, proporcionando uma concentração de 10⁸ UFC/mL (GONÇALVES-CATTELAN *et al.*, 2013).

Obtenção do extrato aquoso concentrado de *Ora-pro-nobis*

O extrato aquoso de folhas de *Ora-pro-nobis* (*Pereskia aculeata*) foi preparado homogeneizando 10 g de folhas maceradas do vegetal e 90 mL de água destilada estéril. Em seguida, a mistura foi submetida à ebulição por 2 horas, conforme Fazio, Gonçalves e Hoffmann (2009). A amostra foi, então, armazenada em recipientes de vidro estéreis.

Estudo do efeito *in vitro* de extratos aquosos de *Ora-pro-nobis* sobre o desenvolvimento microbiano

A avaliação do efeito *in vitro* de extratos aquosos de *Ora-pro-nobis* sobre o desenvolvimento microbiano foi efetuada por meio da técnica de diluição em ágar por disco. Água destilada estéril foi empregada como diluente, sendo as concentrações de extrato empregadas de 100% (extrato puro), 75%, 50% e 25%. Os testes foram efetuados em quadruplicata, após impregnação dos discos de papel filtro estéreis ($\varnothing = 6$ mm) com 20 μ L de solução teste, cujas concentrações foram empregadas individualmente, conforme Gonçalves-Cattelan *et al.* (2013), com modificações.

Análise dos resultados

O estudo foi conduzido em triplicata, sendo o planejamento inteiramente casualizado. O fator estudado foi a influência da concentração do extrato aquoso de *Ora-pro-nobis* sobre o desenvolvimento bacteriano. A análise estatística foi realizada por meio de uma análise descritiva e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com teste de comparação múltipla de Dunn a 5% de significância. Para tanto, foi empregado o *software* GraphPadInstat®, versão 3.05 (GrapPad Software Inc., La Jolla, EUA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 é possível observar que os extratos aquosos empregados sobre o micro-organismo *Escherichia coli* não produziram nenhum efeito significativo, tanto para a inibição do micro-organismo quanto a sinergia em seu desenvolvimento. Porém, para o micro-organismo *Staphylococcus aureus* o emprego dos extratos aquosos favoreceu o desenvolvimento microbiano, em todas as concentrações de extrato contendo a *Ora-pro-nobis*.

Tabela 1 - Resultados da avaliação do efeito de extratos aquosos de *Ora-pro-nobis* sobre os microrganismos empregados no estudo.

Concentração de Extrato (%)	Halo (mm) – Microrganismo		Média \pm desvio-padrão (mm) para <i>S. aureus</i>
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
25	NS	7; 7; 8; 8	7,5 ^a \pm 0,57
50	NS	8; 8; 10; 10	9 ^a \pm 1,15
75	NS	7; 8; 9; 8	8 ^a \pm 0,81
100	NS	9; 9; 10; 10	9,5 ^a \pm 0,57

Legenda: NS - não significativo. ^{ai} Letras similares na mesma coluna evidenciam que os dados não diferem entre si pelo teste de Dunn a 5% de significância.

Fonte: Elaborada pelos autores (2021).

Pelo teste não-paramétrico empregado (teste de Kruskal –Wallis, *post hoc* teste de Dunn) não foi possível evidenciar diferença estatisticamente significativa entre as concentrações do extrato de Ora-pro-nobis sobre *S. aureus*. Em outras palavras, extratos aquosos do vegetal, nas diferentes proporções estudadas, favorecem de maneira similar o desenvolvimento da bactéria.

Rodrigues (2016), avaliando efeitos antioxidantes e antimicrobianos de extratos de Ora-pro-nobis evidenciou que, quando empregado o método de difusão em ágar por disco para o estudo antimicrobiano, não houve inibição das espécies testadas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Choleraesuis ATCC 10708, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048).

Vargas (2017) estudando o efeito antimicrobiano de extratos (éter de petróleo, diclorometano e etanol) de folhas secas de ora-pro-nobis sobre diversas cepas microbianas, incluindo as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, através da técnica de difusão em ágar por disco, notaram que somente o extrato produzido a partir de éter de petróleo propiciou a inibição de *S. aureus*. Para tanto, as folhas utilizadas na produção do extrato foram colhidas no inverno. Deste modo, a autora presumiu que durante essa estação do ano a planta era capaz de produzir algum componente secundário distinto dos produzidos nas demais estações do ano, o que impactou no efeito antimicrobiano.

Pimenta e colaboradores (2020) evidenciaram que o extrato obtido a partir de *Pereskia aculeata* possuía potencial antimicrobiano. O teste foi positivo tanto para a inibição de bactérias (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) quanto para fungos das espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium expansum* e *Penicillium citrinum*.

Sabe-se que diversos fatores influenciam na composição dos vegetais, incluindo os edafoclimáticos. Deste modo, os tipos e as quantidades de substâncias ativas não são constantes durante todo o ano, o que impacta diretamente nos estudos de potencial antimicrobiano, visto que os metabólitos secundários apresentam papel fundamental para a composição química dos produtos naturais dos vegetais, dos quais decorrem suas propriedades biológicas (CATTELAN *et al.*, 2018).

5. CONCLUSÃO

No sentido oposto ao esperado com o desenvolvimento deste estudo, foi possível verificar que extratos aquosos de ora-pro-nobis, nas concentrações e metodologias empregadas no estudo não foram capazes de inibir o desenvolvimento de *E. coli* e favoreceram a multiplicação de *S. aureus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONA, E. A. M. *et al.* Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.81, n.3, p. 218-225, 2014.

CATTELAN, M. G. *et al.* Combined effects of oregano essential oil and salt on the growth of *Escherichia coli* in salad dressing. **Food Microbiology**, v. 73, p. 305-310, 2018.

DIAS, R. N; DURIGAN, M. F. B; GUIMARÃES, P. V. P. Potencial do uso da *Pereskia aculeata* Mill. Na segurança alimentar em comunidades em situação de risco e vulnerabilidade social. *In: Simpósio Brasileiro de Agropecuária Sustentável*, Viçosa, MG. 2018.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacterial. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FAZIO, M. L. S; GONÇALVES, T. M. V.; HOFFMANN, F. L. Determinação da atividade antibacteriana de romã (*Punica granatum*L.). *Revista Higiene Alimentar*, v.23, n.168/169, p.54-56, 2009.

GARCIA, J. A. A. Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest. *Food Chemistry*, v. 294, p. 302-309, 2019.

GONÇALVES CATTELAN, M. *et al.* Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. **Nutrition & Food Science**, v.43, p.169-174, 2013.

GUIMARÃES, C. C. *et al.* Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Biociências**, v.15, n.12, p.83-89. 2016.

KINUPP, V. F. **Plantas Alimentícias Não-Convencionais da região metropolitana de Porto Alegre – RS**. 2007. 462 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2007.

MARTINEVSKI, C.S; *et al.* Utilização de Bertalha (*Anredera Cordifolia* (TEN.) Steenis) e ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) na elaboração de pães. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, n.3, jul./set. 2013.

OSTROSKY, E. A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p.301-307, 2008.

PIMENTA, P. C. *et al.* Avaliação da capacidade antimicrobiana do óleo essencial de *pereskia aculeata*: interação com microrganismos encontrados em jalecos de profissionais de saúde. **Brazilian Journal of Development**, v.6, p.46-58, 2020. DOI:10.34117/bjdv6n6-514.

RODRIGUES, A. S. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) e sua aplicação em mortadela**. 2016. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 2016.

VARGAS, A. G. de. **Influência da sazonalidade na composição química e nas atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2017.