

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE POLPA E CASCA DO FRUTO DE *ENDOUPLEURA* *UCHI* (HUBER) CUATREC.

ANTIMICROBIAN AND ANTIOXIDATING ACTIVITY OF *ENDOUPLEURA UCHI* (HUBER) CUATREC. FRUIT PULP AND SHELL

Charline Soares dos Santos Rolim¹
charlinerolim@gmail.com

Me. Régis Tribuzy de Oliveira²
educacaofisica.regis@gmail.com

Prof. Orientador Dr. Carlos Victor Lamarão
victorlamarao@yahoo.com.br

Prof. Coorientador Dr. Leonardo do Nascimento Rolim
leonardorolim@yahoo.com.br
Universidade Federal do Amazonas

RESUMO: O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de polpa e casca do fruto de uxi. As amostras foram coletadas na cidade de Parintins - AM. Ao pesquisar a atividade antimicrobiana, as concentrações estudadas não apresentaram inibição do desenvolvimento microbiano, assim como para a atividade antioxidante, onde através dos extratos em DMSO, não houve inibição satisfatória do radical livre pelos métodos DPPH, ABTS e para compostos fenólicos totais. O estudo servirá como base para refinamentos direcionados ao estudo dessa temática.

Palavras-chave: Alimentos nutraceuticos. Frutos amazônicos. Sensibilidade microbiana.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of uxi fruit pulp and rind. The samples were collected in the city of Parintins - AM. When investigating the antimicrobial activity, the studied concentrations did not show inhibition of microbial development, as well as the antioxidant activity, where through DMSO

extracts, there was no satisfactory inhibition of free radical by DPPH, ABTS methods and for total phenolic compounds. The study will serve as a basis for refinements directed to the study of this theme.

Keywords: Nutraceutical foods. Amazon fruits. Microbial sensitivity.

1 INTRODUÇÃO

Endopleura uchi é uma espécie nativa da Amazônia Brasileira e está praticamente dispersa em todos os estados da região, com maior distribuição e frequência nos estados do Pará e Amazonas (TACON, 2012). Existem várias denominações comuns para a espécie, tais como uxi, uxi-liso, uxi verdadeiro, uxi-amarelo, uxi-pucu, pururu e cumate. O fruto é muito apreciado pelos habitantes da região, devido ao seu sabor e aroma

peculiares, assim como pelo seu potencial medicinal (MAGALHÃES et al., 2007).

A casca da árvore de uxi é empregada com finalidade terapêutica, principalmente pelos habitantes da região, sendo amplamente comercializada em feiras e mercados. Ela é popularmente utilizada na forma de chá, atuando como potente anti-inflamatório (REVILLA, 2002), além de ser indicado para o tratamento de artrite, reumatismo, colesterol alto e diabetes (CORRÊA, 1984). Luna et al. (2003) determinaram a presença de bergenina, um composto cuja ação anti-inflamatória é conhecida, no extrato bruto do caule de *Endopleura uchi* (CAVALCANTI, 1991; REVILLA, 2002).

A bergenina é um C-glicosídeo do 4-O-metil ácido gálico, encontrada tanto no fruto como nas cascas da árvore de *Endopleura uchi* (MAGALHÃES et al., 2007; NUNOMURA et al., 2009). Outra atividade importante conferida à bergenina é a antimicrobiana e antioxidante, pois se mostrou bastante eficiente na inibição de crescimento de microrganismos, principalmente leveduras do gênero *Candida* (SILVA et al., 2009).

Diante do bioma rico em biodiversidade que é a Amazônia e da grande aceitação e importância local do *Endopleura uchi*, esse estudo objetivou avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante de polpa e casca do fruto.

2 METODOLOGIA

Os ensaios foram realizados em triplicata. Os frutos verde-maduros foram comprados no município de Parintins – AM, sendo acondicionados em sacas de polietileno e transportados para Manaus. Em seguida, foram levados para o Laboratório de Tecnologia de Produtos Agrícolas da Universidade Federal do Amazonas, onde foram realizadas as avaliações.

O material obtido foi selecionado, sanitizado, os frutos foram despulpados, separando a casca. Em seguida, foram secadas polpa e casca em estufa a 105 °C até atingir peso constante, sendo triturados, até obtenção de uma amostra com granulação fina (IAL, 2008).

Para atividade antimicrobiana foram utilizados os métodos de microdiluição em caldo, com base na metodologia de Santurio et al. (2007), com modificações, e as metodologias de difusão em ágar por realizadas conforme recomendações do CLSI (2009a). Foi utilizado como controle positivo o antimicrobiano cloranfenicol (CLSI, 2009b).

As bactérias usadas foram *Enterobacter* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* sp. e *Klebsiella* sp. Previamente à realização dos experimentos, as amostras bacterianas foram recuperadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 36 °C por 18 horas. Para a determinação da atividade antimicrobiana mínima, as amostras foram

distribuídas em placa para cultivo celular de 24 poços, com 1 mL de BHI, para as bactérias. Todos os poços receberam 1 mL de caldo BHI e 100 μ L do mix de bactérias, tendo como variável a concentração de polpa e casca de uxi diluídos separadamente em água peptonada nas concentrações: água peptonada pura (sem adição de amostra); 12,5%; 25% e 50% de amostra. O grupo controle recebeu água peptonada acrescida de antibiótico cloranfenicol 0,1%. A incubação foi a 36°C por 24 horas.

Para a atividade antioxidante, as amostras foram secas a 70 °C em estufa. Para a obtenção do extrato, pesou-se em tubos Eppendorf 1 mg da amostra seca de polpa e casca de uxi e 1 mg de ácido gálico para controle positivo. Em cada tubo foi adicionado 1 mL de solvente DMSO (dimetilsulfóxido) obtendo-se concentração final de 1 mg/mL. Os tubos foram inseridos em equipamento de ultrassom (*Unique ultracleaner 1400*) durante 15 minutos, após, seguiram para centrifuga (*Eppendorf centrifuge 5804 R*) a 14000 rpm por 1 minuto para separar o sobrenadante. Os extratos foram analisados pelos métodos de ABTS, DPPH, e fenólicos totais.

Para o ensaio de ABTS utilizou-se uma microplaca de 96 poços (placa de Elisa). Com micropipeta retirou-se alíquotas de extrato sobrenadante. As alíquotas foram distribuídas de modo que em cada fileira correspondente às amostras resultasse na mistura de 30 μ L

de extrato e 270 μ L de água; 30 μ L de extrato e 270 μ L de ABTS; 30 μ L de etanol e 270 μ L de água destilada para o branco. As misturas foram homogeneizadas e a microplaca seguiu para incubação durante 15 minutos para a realização da leitura de absorbância em espectrofotômetro de placas a 630 nm e realização do cálculo para obter a porcentagem de atividade antioxidante de cada amostra. Só foram consideradas as amostras que apresentaram atividade acima de 50% de atividade antioxidante.

Foi usado o método do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) (RUFINO, 2007) onde foram distribuídas alíquotas de extrato solubilizado de modo que cada fileira correspondente às amostras resultasse na mistura de 30 μ L de extrato e 270 μ L de DPPH, para o branco foram usados 30 μ L de extrato e 270 μ L de etanol 96°, o padrão negativo foi preparado com 30 μ L de DMSO e 270 μ L de DPPH e o padrão positivo com 30 μ L de ácido gálico e 270 μ L de DPPH. A microplaca seguiu para incubação durante 30 minutos para posterior realização de leitura em espectrofotômetro de microplacas a 492 nm.

A concentração de fenóis totais foi quantificada por espectrofotometria, por meio da reação de oxirredução com reagente de Folin-Ciocalteu a 10%, o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis. Foram utilizados 10 μ L de extrato solubilizado e 50 μ L de Folin 10%

para a primeira leitura em espectrofotômetro a 620 nm, após 8 minutos de incubação. Para a segunda leitura, fez-se a adição de 240 µL de Carbonato de Sódio a 94% com período de incubação de 3 minutos. Como padrão foi utilizado ácido gálico 1 mg/mL.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente ao acaso no esquema fatorial, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e foi aplicado o teste de Tukey para comparação múltipla entre as médias, ao nível de significância de 5%, usando o software SisVar 5.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios antimicrobianos para as diferentes concentrações de *E. uchi* contra os microrganismos testados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima analisada das amostras e o controle positivo contendo cloranfenicol a 0,1%.

Microrganismos	Concentrações para polpa e casca (%)*				Controle positivo
	0	12,5	25	50	
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+
<i>Salmonella</i> sp.	-	-	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	+
<i>Klebsiella</i> sp.	-	-	-	-	+

*As amostras foram testadas separadamente para cada concentração avaliada, obtendo o mesmo resultado.

Fonte: Autores, 2020.

Os resultados observados no método de poços mostraram não haver atividade antimicrobiana para as bactérias estudadas, nas diluições realizadas com a polpa e casca do fruto, quando comparados ao controle, onde se pode observar inibição total do desenvolvimento microbiano com a adição do antibiótico Cloranfenicol. Dessa forma, estatisticamente, os resultados não apresentaram diferença estatística significativa a um nível de confiança de 5% entre as concentrações analisadas.

Silva et al. (2009), ao estudarem a atividade antimicrobiana de bergenina isolada da casca da árvore de *E. uchi*, obtiveram resultado satisfatório para leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. guilliermondi* com concentração mínima inibitória (CIM) de 4,9, 4,9, e 9,8 mg/mL, respectivamente. Foi observada uma atividade moderada da bergenina contra os fungos filamentosos *A. flavus*, *A. niger*, e *A. nidulans* com CIM de 625.0, 156.3 e 312.5 mg/mL, respectivamente, o que auxilia na compreensão do uso tradicional do chá de *E. uchi* contra infecções urinárias. Contra bactérias, contudo, como mostrado neste estudo, não ocorreu inibição pelo uso dos extratos, sugerindo a estrita ação antifúngica para *E. uchi*.

Tacon (2012) ao estudar atividade antimicrobiana de uxi, selecionou quatro amostras para serem testadas, sendo o extrato liofilizado, o extrato seco por *spray dryer* sem nenhum aditivo e dois extratos de obtidos por secagem, obteve êxito com todas as amostras estudadas, onde mostraram inibição no crescimento sobre os diferentes gêneros de *Candida* avaliados. Duas das cepas estudadas mostraram-se bastante sensíveis, uma vez que concentrações baixas foram capazes de inibir seu crescimento. Todos os extratos avaliados mostraram-se eficientes na inibição do crescimento das leveduras. Também foi avaliada a capacidade de matar as leveduras, onde o autor obteve resultado positivo para uma das cepas utilizadas nos diferentes extratos estudados.

Com os dados de absorvância obtidos através da leitura da microplaca no espectrofotômetro, obtiveram-se os valores da atividade antioxidante em porcentagem da amostra e suas repetições, expresso o valor médio na tabela 2.

Tabela 2 - Resultado percentual da inibição do radical DPPH a partir do extrato DMSO de *Endopleura uchi*.

Amostra	Inibição DPPH (%) ^{1*}
Polpa	4,23 ± 1,52 ^a
Casca	16,32 ± 3,43 ^b
Padrão positivo	88,62 ± 0,09 ^c

¹ Média ± desvio padrão. Valores expressos em µg/mL.

*Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas pelo teste Tukey (p<0,05).

Fonte: Autores, 2020.

A análise estatística (Tukey, p<0,05) confirma o que pode ser visualizado ao observar a tabela: há clara distinção entre os valores apresentados pela polpa, casca e padrão. A capacidade de sequestrar 50 % dos radicais livres no DPPH (% CS₅₀) do extrato de *Endopleura uchi* mostrou valor médio baixo. Pode-se observar que o valor obtido para casca é superior ao encontrado na polpa. Muniz (2013) realizou estudo com diferentes extratos para casca da árvore, galhos e folhas do uxizeiro e obteve valores que variaram entre 10,5 e 24,2 µg/mL. Contudo, os valores médios encontrados neste estudo foram maiores que os achados por Tacon (2012) (2,76 µg/mL).

É possível que a temperatura tenha influenciado nesse aspecto, pois se sabe que a elevação desse fator abiótico pode propiciar degradação de algumas classes químicas de substâncias e assim fazer com que haja diminuição da atividade antioxidante. Outra possibilidade é a influência indireta da temperatura na ação antioxidante, pois dependendo das substâncias contidas no material pode ocorrer atividade cruzada ou haver sinergismo entre diferentes compostos. Ao comprometer um deles, poderia resultar em uma cascata redutiva, comprometendo

a atividade antioxidante de maneira geral (TACON, 2012).

O método ABTS apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis. Outros trabalhos têm utilizado o método em vários tipos de frutos como camu-camu, açaí, maracujá, e alimentos como molho de soja, vinhos e cervejas, além de amostras biológicas (LIMA, 2008; SUCUPIRA et al., 2012). Neste estudo, porém o método ABTS não evidenciou atividade antioxidante por parte do extrato de uxi. Os dados de absorbância obtidos através da leitura da microplaca no espectrofotômetro estão expressos na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados percentuais de atividade antioxidante pelo método ABTS a partir dos extratos DMSO de *Endopleura uchi*.

Amostra	Inibição ABTS(%) ^{1*}
Polpa	-11,53 ± 1,43 ^a
Casca	18,53 ± 3,06 ^b
Padrão positivo	99,65 ± 0,07 ^c

¹ Média ± desvio padrão. Valores expressos em µg/mL.

*Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas pelo teste Tukey (p<0,05).

Fonte: Autores, 2020.

Assim como no teste DPPH, a análise estatística em ABTS também revela diferença significativa entre os valores de casca, polpa e padrão. Diferentemente do DPPH, o método ABTS baseia-se na geração do ABTS⁺ de cor azul

esverdeado, por meio da reação de ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (LIMA, 2008).

Acredita-se que este valor negativo de porcentagem de atividade antioxidante (%) esteja relacionado às substâncias lipídicas presentes no extrato. De acordo com Kuskoski et al. (2005), as metodologias utilizando o sequestro dos radicais DPPH e ABTS medem a atividade de compostos de natureza hidrofílica. Esse fato pode ter contribuído para o resultado negativo da polpa pelo método ABTS, uma vez que apresenta um teor maior de substâncias hidrofóbicas presentes no extrato. Estudos deverão ser desenvolvidos para o isolamento dos constituintes químicos do extrato.

Uma vez que a presença de compostos fenólicos na amostra geralmente pode explicar sua atividade antioxidante, o método de Folin-Ciocalteu pode avaliar tais concentrações no extrato em DMSO de *Endopleura uchi* a partir da polpa e casca do fruto desidratados em estufa a 70 °C. A obtenção dos dados das absorbâncias das soluções padrão de ácido gálico em função da concentração permitiu observar que a amostra utilizada não apresenta valor significativo para compostos fenólicos, observado na Tabela 4.

Tabela 4 - Teor de compostos fenólicos totais presente na amostra de *Endopleura uchi* a partir de extrato DMSO.

Amostra	Fenólicos totais (%) ^{1*}
Polpa	0,63 ± 0,17 ^a
Casca	0,80 ± 0,14 ^a
Padrão positivo	100 ± 0,42 ^b

¹ Média ± desvio padrão. Valores expressos em µg/mL.

*Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas pelo teste Tukey (p<0,05).

Fonte: Autores, 2020.

Nesta avaliação a análise pelo teste Tukey (p<0,05) apontou similaridade entre os valores de casca e polpa, não evidenciando diferença estatística entre eles. A distinção, nesse caso, é percebida apenas quando estes atributos são comparados ao padrão.

Os compostos fenólicos são os maiores responsáveis pela atividade antioxidante em frutos. Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, em baixas concentrações, sejam capazes de impedir, retardar ou prevenir a auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável (ZULETA et al., 2009).

Os resultados obtidos demonstram que através do método utilizado para extração não se mostrou eficiente, resultando em baixa concentração deste

composto. Ao se comparar os três métodos utilizados, o que apresentou melhor eficiência para polpa foi o DPPH e para casca do fruto foi o ABTS.

Na pesquisa realizada por Tacon (2012), foram obtidos resultados mais satisfatórios para compostos fenólicos com diferentes extratos de polpa de uxi, variando de 23 a 47%. Já nos estudos realizados por Machado (2015), a polpa do fruto maduro apresentou uma taxa de inibição em ácido gálico de 2%. Mesmo sendo um valor baixo, obteve um resultado maior que o apresentado neste estudo.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo confirmou que *E. uchi*, em extrato bruto, não apresentou atividade antimicrobiana em bactérias, sugerindo futuros testes com compostos mais refinados do fruto. Além disso, fazem-se necessários estudos acerca da atividade antioxidante, utilizando-se diferentes extratos refinados, uma vez que uxi, segundo a literatura, apresenta em sua composição a bergenina, que é um composto conhecido pela atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAVALCANTE, P. B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 279, 1991.

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards**

Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test**; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009a.

CLSI, **Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bactéria That Grow Aerobically**; Approved Standard- Eighth Edition. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009b.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4ª ed., São Paulo, 1020 pp. 2008.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; TRANCOSO, A. M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**. [Tese] São Paulo: USP, 2008.

LUNA, J.S.; SILVA, T.M. da; BENTO, E. de S.; SANT'ANA, A.E.G. **Isolamento e identificação estrutural dos constituintes químicos de *Endopleura uchi* (Humiriaceae)**. Disponível em: <<http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/0597-1/>>. Acesso em: 24/10/2019.

MACHADO, P. S. **Caracterização do uxi (*Endopleura uchi*) em três estádios de desenvolvimento**. [Dissertação] Lavras: UFLA, 2015.

MAGALHAES, L.A.M. et al. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). **Rev. Acta. Amaz.** vol.37, n.3, p. 447-450. Manaus, 2007.

MUNIZ, M. P. **Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Endopleura uchi* Huber Cuatrecasas**. [Dissertação] Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

NUNOMURA, R. et al. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti- inflammatory activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1060-1064, 2009.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética amazônica**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2002. 532p.

SANTURIO, M.J. et al. Atividade

antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.803- 808, 2007.

SILVA, S.L. et al. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 1, p. 187-191, 2009.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-9, 2012.

TACON, L. A. **Estudo da extração e secagem por spray dryer das cascas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. Humiriaceae.** [Dissertação] Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

ZULETA, A.; ESTEVE, M.J.; FRÍGOLA, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v.114, p. 310-316, 2009.