

Atividade antimicrobiana e antibiofilme de recursos genéticos endógenos

Madalena Soares^{1,2}, Ana Sofia Dias^{1,3}, Alexandra Camelo¹, Rita Ramos⁴, Ana Silveira¹, Christophe Espírito Santo^{1,4} e Inês Brandão^{1,4}

¹Centro de Apoio Tecnológico Agro-Alimentar (CATAA), Castelo Branco, Portugal; ²Universidade da Beira Interior (UBI), Covilhã, Portugal; ³Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias, Instituto Politécnico de Castelo Branco; ⁴University of Coimbra - Center for Functional Ecology Science for People & the Planet, TERRA Associated Laboratory, ⁵Department of Life Sciences, Calçada Martim de Freitas, Coimbra 3000-456, Portugal

Cada vez mais os consumidores tendem a preferir alimentos com “clean labels”, ou seja, alimentos menos processados e livres de substâncias quimicamente sintetizadas. Assim, torna-se importante o desenvolvimento de conservantes e aditivos naturais, para atender às necessidades da população.

Extratos naturais para prevenir e combater agentes patogénicos em alimentos têm sido objeto de estudo enquanto possíveis alternativas eficazes, seguras e naturais para aplicação na indústria alimentar.

As plantas são utilizadas desde a antiguidade quer como forma de condimento quer como medicamentos tradicionais, isto devido à presença de variados compostos bioativos que lhes concedem diversas capacidades benéficas à saúde.

De modo a valorizar os recursos endógenos da região centro, e evitar os desperdícios a eles associados, foram selecionadas algumas plantas com indícios de atividade antimicrobiana (tendo em conta o seu uso tradicional), para se estudar esta mesma atividade, com o objetivo de no futuro desenvolver conservantes naturais.

RECURSOS EM ESTUDO – ALGUNS EXEMPLOS



Figura 1. Algumas das espécies em estudo.

Feijão-frade (*Vigna Unguiculata*): esta leguminosa, neste caso uma variedade proveniente da freguesia da Lardosa “cara verde” (landrace), em Castelo Branco, destaca-se por resistir a condições extremas, como é o caso da seca ou de solos inférteis. É ainda uma cultura fixadora de azoto, contribuindo para o enriquecimento do solo. Estas características tornam o feijão-frade um recurso de interesse para o futuro, devendo ser explorado em diferentes vertentes. Elaboraram-se extratos aquosos e etanólicos de folha, raiz, caule e vagem de feijão-frade e avaliadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme.

Medronheiro (*Arbutus unedo* L): pertence à família das ericáceas, onde se incluem as urzes, os mirtilos, os arandos, entre outras. Existe em quase toda a Europa Meridional em terrenos áridos e siliciosos, em bosques e matagais e é muito comum em Portugal, representando uma relíquia da Laurissilva. O medronheiro é um

arbusto lenhoso com porte médio de entre quatro e cinco metros. Destaca-se pelas folhas persistentes, coriáceas e serrilhadas, flores campanuladas, brancas ou cor-de-rosa, que florescem anualmente entre outubro e fevereiro. Os frutos maduros são muito redondos e vermelhos, com saliências piramidais que se assemelham a morangos, daí o nome adotado na língua inglesa: *strawberry tree*. O medronho colhe-se habitualmente no fim do outono. O medronho contém arbutina, metilarbutina e outras hidroquinonas (um princípio amargo) e taninos. Este fruto possui características adstringentes e propriedades antissépticas. As folhas constituem ainda uma fonte considerável de fitoquímicos com propriedades bioativas. Elaboraram-se extratos aquosos e etanólicos de folha de medronheiro e extratos metanólicos de medronho e avaliadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme.

Castanheiro europeu (*Castanea sativa* Mill.): pertence à família das Fagáceas, a mesma dos carvalhos, e é cultivado há séculos na região mediterrânica. O castanheiro é uma espécie monóica, a mesma árvore possui flores femininas e masculinas, mas é auto-estéril, sendo indispensável a fecundação cruzada. As folhas são caducas e ligeiramente serreadas. Portugal é um dos maiores produtores de castanha na Europa, sendo as variedades mais cultivadas a Judia e Longal. Para além do mercado em fresco, grande parte da produção é utilizada para na indústria alimentar, por exemplo, para obtenção de frutos congelados ou embalados prontos a consumir, puré de castanha, farinha, entre outros. Nestes processos, vários subprodutos são gerados como é o caso da casca e pele da castanha, que têm sido associados à presença de compostos fenólicos. Elaboraram-se extratos aquosos e etanólicos da pele de castanha Martainha (origem: Sabugal) e da folha de castanheiro e avaliadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme.

Norça (*Bryonia dioica* Jacq.): é uma erva trepadeira perene, da família *Cucurbitaceae*, com raízes tuberosas que ocorre na Europa, norte da África e oeste da Ásia. Tem caules compridos, de onde brotam folhas espinhentas e ásperas, e gravinhas espirais. O género *Bryonia* caracteriza-se pela presença de cucurbitacinas citotóxicas, que apesar de tornarem a planta tóxica em elevadas quantidades, concedem-lhe capacidades benéficas à saúde, nomeadamente no tratamento de tosse, gripe, bronquite e pneumonia, e ainda no alívio de dores musculares e articulares. A planta contém flavonoides, flavonas, alcaloides, saponinas, terpenos e ácidos gordos. Elaboraram-se extratos aquosos da folha e avaliadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme.

Oliveira (*Olea europaea*): pertence à família das Oleáceas, e é uma árvore perene característica da região mediterrânica. Tem um tronco sulcado, pequenas folhas elípticas e coriáceas, verde-escuras na face superior e prateadas na face inferior, flores brancas de onde nasce o fruto verde, que matura para preto. Portugal é o oitavo maior produtor mundial de azeite e quarto na União Europeia, sendo as oliveiras amplamente cultivadas em todo o país, principalmente no interior. No entanto, durante os processos de colheita da azeitona e produção de azeite, surgem alguns subprodutos, como as folhas e os ramos da árvore, que se tornam resíduos agrícolas, e cuja queima é prejudicial ao ambiente e uma forma de poluição.

As folhas contêm polifenóis, como oleuropeína, hidroxitirosol e verbascosídeo, triterpenos, flavonoides, chalconas. Para além disso têm propriedades antioxidantes e efeitos benéficos no tratamento de algumas doenças como infeções e doenças cardiovasculares. Elaboraram-se extratos aquosos, etanólicos e metanólicos da folha de oliveira e avaliadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme.

Sabugueiro (*Sambucus nigra*): pertence à família das Adoxáceas, e é um arbusto de folha caduca nativo da Europa. A planta tem caules múltiplos com folhas opostas e flores brancas organizadas em cachos achatados que se desenvolvem em bagas verdes, que amadurecem para castanho-avermelhado ou preto. Cresce em ambientes húmidas, sejam bosques, áreas abertas ou junto a rios e lagos, podendo também ser cultivada.

O sabugueiro apresenta benefícios para a saúde incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas. As folhas têm ação anti-inflamatória, diurética e repelente contra insetos. É uma planta rica

em antocianinas, razão pela qual é utilizada como corante na indústria alimentar, flavonoides, monoterpenos e ácidos fenólicos. Elaboraram-se extratos aquosos da folha de sabugueiro e avaliadas as atividades antimicrobiana e antibiofilme.

EXTRATOS

Um extrato é uma solução concentrada obtida a partir de matéria-prima vegetal, constituída pelos compostos ativos da mesma e por um solvente. Antes de proceder à extração, as amostras necessitam de ser preparadas para tal:

Lavagem
Com água da torneira e água estéril



Secagem
À temperatura ambiente ao abrigo da luz, micro-ondas, desidratador



Trituração
Bimby, moinho



Figura 2. Preparação das amostras para extração

AQUOSOS

- Homogeneizar a amostra em água
- Ferver durante 5 minutos (A)
- Filtrar com compressa estéril
- Filtrar com filtro de seringa
- Deixar em agitação durante 24h à temperatura ambiente (B)
- Filtrar com compressa estéril
- Filtrar com filtro de seringa
- Ferver durante 30 minutos (C)
- Filtrar com compressa estéril
- Evaporar o solvente a 40°C
- Colocar em banho de ultrassons durante 45 minutos (D)
- Deixar em agitação overnight a 37°C (E)
- Liofilizar (F)
- Evaporar o solvente a 40°C (G)
- Liofilizar (H)
- Evaporar o solvente a 40°C
- Filtrar com compressa estéril

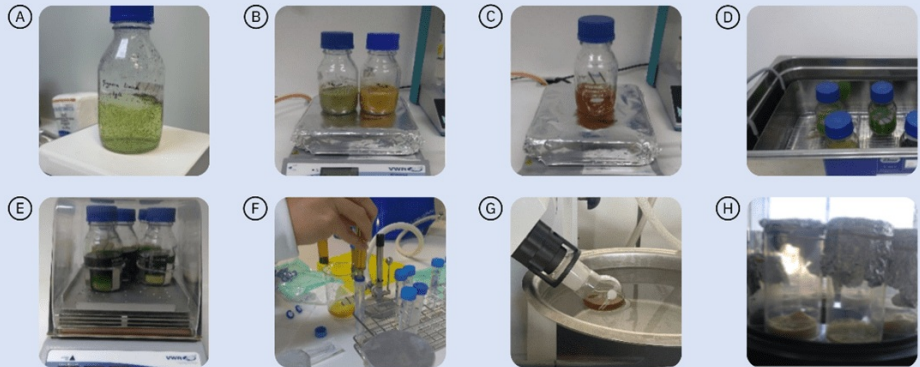


Figura 3. Métodos de elaboração dos extratos aquosos

ETANÓLICOS

- Homogeneizar a amostra em etanol, ou numa mistura de etanol/água
- Colocar em banho de ultrassons durante 45 (A)
- Deixar em agitação overnight à 37°C (B)
- Filtrar com compressa estéril
- Evaporar o solvente a 40°C
- Manter em repouso durante 72h com agitação diária (C)
- Filtrar com compressa estéril
- Evaporar o solvente a 40°C

METANÓLICOS

- Homogeneizar a amostra em etanol, ou numa mistura de etanol/água
- Centrifugar
- Evaporar o solvente a 40°C (D)
- Filtrar com filtro de seringa
- Manter em repouso durante 72h com agitação diária (E)
- Filtrar com compressa estéril
- Evaporar o solvente a 40°C

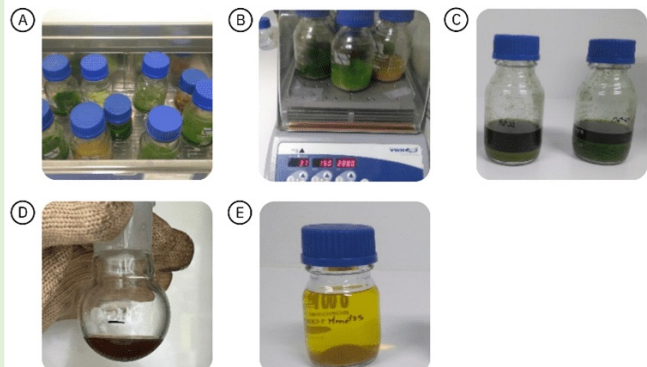


Figura 4. Métodos de elaboração dos extratos alcoólicos

No final da elaboração dos extratos, estes são dissolvidos em água no caso dos extratos aquosos, e em DMSO no caso dos extratos alcoólicos, de modo a obter a concentração final a testar.

TESTAGEM DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para determinar a atividade antimicrobiana dos extratos, procede-se à elaboração de testes de difusão em disco. Para tal foram selecionados três microrganismos de deterioração alimentar: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O teste consiste em inocular o microrganismo numa placa de agar, onde serão colocados discos embebidos em três concentrações diferentes de extrato (E1, E2, E3). Espera-se observar a formação de halos de inibição, indicativos da atividade antimicrobiana do extrato testado.

A **concentração mínima inibitória** é ainda determinada para cada caso. Com meio de cultura são feitas diluições sucessivas de extrato, onde é adicionado o microrganismo em fase exponencial de crescimento, de modo a poder determinar a partir de que concentração o extrato tem efeito inibitório (será o poço/tubo onde não se observa turvação).

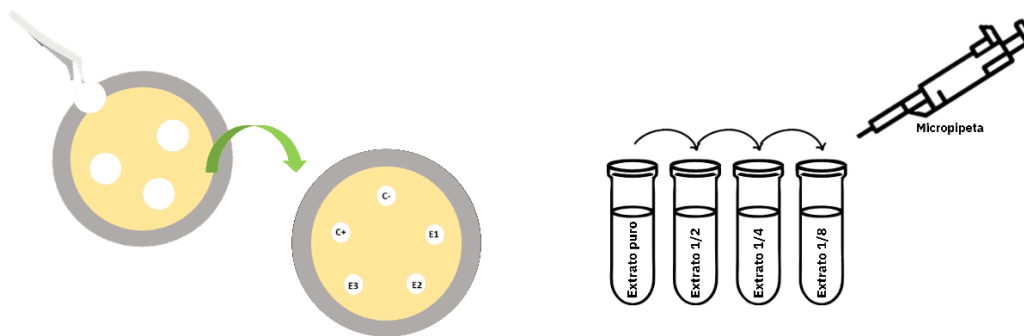
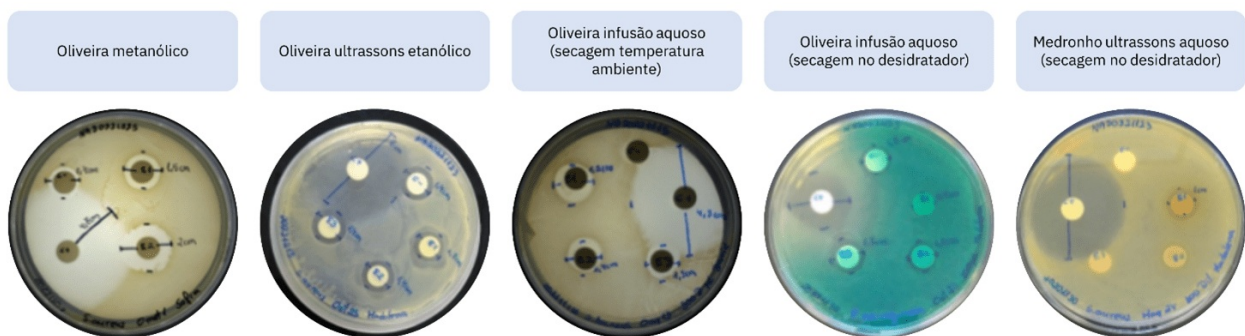
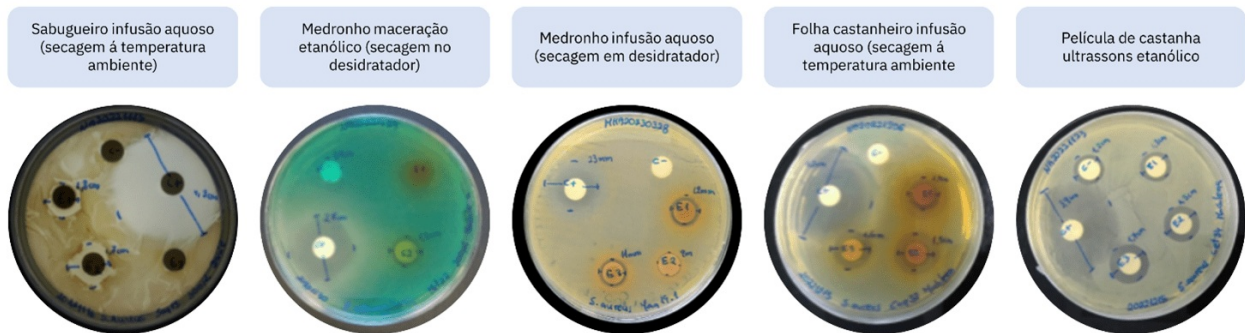
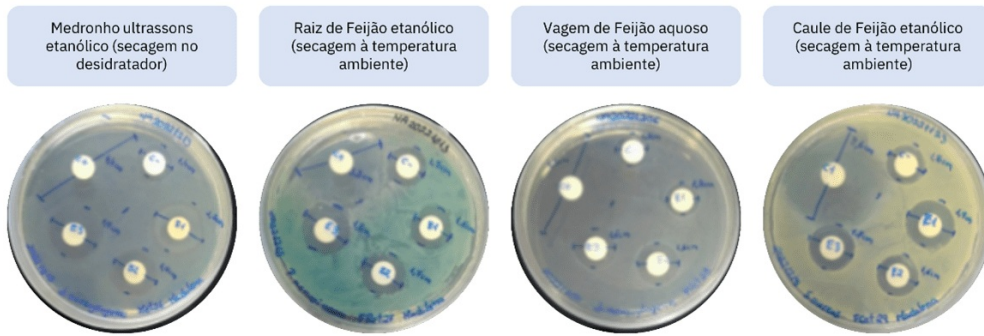


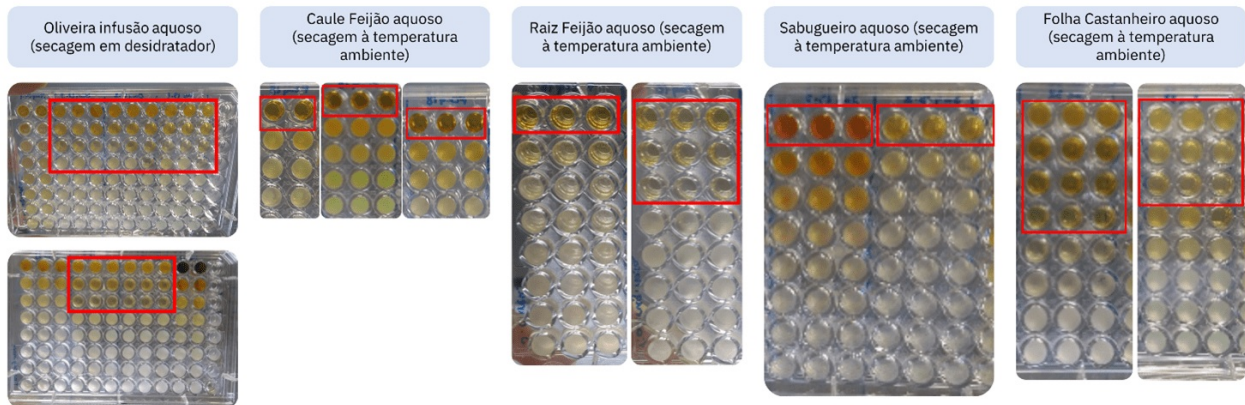
Figura 5. Exemplo de esquema dos métodos de testagem antimicrobiana

Alguns exemplos das primeiras placas obtidas para cada recurso são, de seguida, apresentados:





Alguns exemplos de concentrações mínimas inibitórias:



TESTAGEM DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME

Para determinar a atividade antibiofilme dos extratos são elaborados dois testes. Um teste de formação de biofilme em microplaca, e um teste de dispersão de biofilme. São utilizados os mesmos microorganismos anteriormente mencionados, e os extratos com atividade antimicrobiana.

No teste de formação de biofilme, é colocado meio de cultura inoculado e extrato numa placa de 96 poços, de modo a permitir a formação do biofilme. Após 24h, o biofilme é lavado com PBS, fixado com metanol, e por fim colorado com violeta de cristal. Após algumas horas de secagem, os biofilmes são dissolvidos com ácido acético, e a percentagem de formação/inibição destes é determinada através da medição das absorvâncias de cada poço.

Nos poços onde foi colocado o extrato, se a densidade ótica for inferior à dos poços de controlo, indicando uma inibição da formação do biofilme.

Relativamente ao teste de dispersão de biofilme, este difere do anteriormente descrito na medida que os extratos são colocados 24h após incubação do microrganismo.

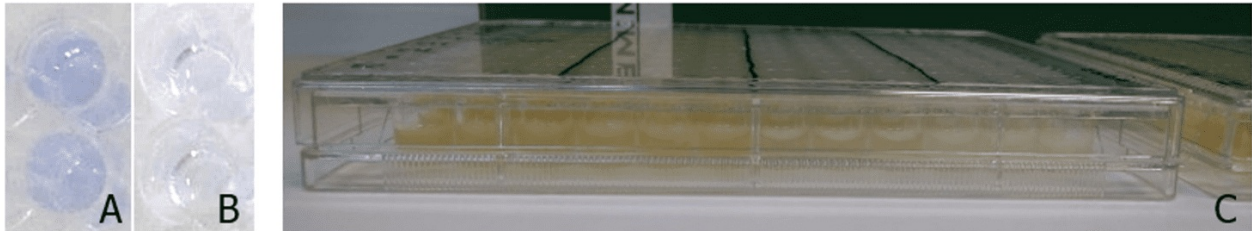


Figura 8. Resultado de um teste de atividade antibiofilme. A. Controlo; B. Extrato; C. Biofilmes antes da coloração.

A ATIVIDADE “Caracterização do potencial de inovação dos recursos genéticos endógenos naturais: compostos com atividades antimicrobiana e anti-biofilme”

Alguns dos recursos selecionados já têm atividade antimicrobiana estudada para a sua espécie, no entanto não foram encontrados estudos para as variedades produzidas na zona centro. Os primeiros resultados já indicam uma possível capacidade antimicrobiana dos recursos em causa, por exemplo, em relação aos extratos etanólicos de raiz de feijão frade, entre outros.

A segunda fase consiste em determinar as **concentrações mínimas inibitórias dos extratos**. Por fim, pretende-se determinar quais os compostos bioativos presentes nos extratos responsáveis por estas atividades, por exemplo, através de uma análise cromatográfica HPLC.

BIBLIOGRAFIA

- Agatonovic-Kustrin S, Gegechkori V, Morton DW, Tucci J, Mohammed EUR, Ku H. 2022. The bioprofiling of antibacterials in olive leaf extracts via thin layer chromatography-effect directed analysis (TLC-EDA). *J Pharm Biomed Anal*: 219:114916. doi: 10.1016/j.jpba.2022.114916.
- Alviano DS, Alviano CS. 2009. Plant extracts: search for new alternatives to treat microbial diseases. *Curr Pharm Biotechnol*. 10(1):106-21. doi: 10.2174/138920109787048607.
- Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*.: 6(2):71-79. doi: 10.1016/j.jpba.2015.11.005.
- Benarba B, Meddah B, Aoues A. 2012. *Bryonia dioica* aqueous extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway in BL41 Burkitt's lymphoma cells. *J Ethnopharmacol*: 141(1):510-6. doi: 10.1016/j.jep.2012.02.052.
- Borjan D, Leitgeb M, Knez Ž, Hrnčič MK. 2020. Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules*: 25(24):5946. doi: 10.3390/molecules25245946.
- Bouyahya, A., El Moussaoui, N., Abrini, J., Bakri, Y., & Dakka, N. 2016. Determination of Phenolic Contents, Antioxidant and Antibacterial Activities of Strawberry Tree (*Arbutus unedo* L.) Leaf Extracts. *Biotechnology Journal International*, 14(3), 1–10. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2016/26488>.
- Chevallier, A. 1996. *The Encyclopedia of Medicinal Plants*.
- Dhouioui M, Boulila A, Jemli M, Schiets F, Casabianca H, Zina MS. 2016. Fatty Acids Composition and Antibacterial Activity of *Aristolochia longa* L. and *Bryonia dioica* Jacq. Growing Wild in Tunisia. *J Oleo Sci*.: 65(8):655-61. doi: 10.5650/jos.ess16001.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*..

49(11):1749-55. doi: 10.1086/647952.

Ferreira SS, Silva A, & Nunes FM. 2020. *Sambucus nigra* L. Fruits and Flowers: Chemical Composition and Related Bioactivities. Food Reviews International: 38: 1237 - 1265. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1788578>.

Ferreira-Santos P, Badim H, Salvador ÂC, Silvestre AJD, Santos SAO, Rocha SM, Sousa AM, Pereira MO, Wilson CP, Rocha CMR, Teixeira JA, Botelho CM. 2021. Chemical Characterization of *Sambucus nigra* L. Flowers Aqueous Extract and Its Biological Implications. Biomolecules: 11(8):1222. doi: 10.3390/biom11081222.

Gomes F, Dias MI, Lima Â, Barros L, Rodrigues ME, Ferreira ICFR, Henriques M. *Satureja montana* L. and *Origanum majorana* L. 2020. Decoctions: Antimicrobial Activity, Mode of Action and Phenolic Characterization. Antibiotics (Basel):9(6):294. doi: 10.3390/antibiotics9060294.

Launert, E. 1981. Edible and medicinal plants.

Liu D, He XQ, Wu DT, Li HB, Feng YB, Zou L, and Gan RY. 2022. Elderberry (*Sambucus nigra* L.): Bioactive Compounds, Health Functions, and Applications. Journal of Agricultural and Food Chemistry: 70 (14): 4202-4220. doi: 10.1021/acs.jafc.2c00010.

Lust, J. 2014. The Herb Book – The Most Complete Catalog of Herbs Ever Published.

Miralrio A, Espinoza Vázquez A. 2020. Plant Extracts as Green Corrosion Inhibitors for Different Metal Surfaces and Corrosive Media: A Review. Processes: 8(8):942. doi: 0.3390/pr8080942.

Motti R, Paura B, Cozzolino A, Falco B. 2022. Edible Flowers Used in Some Countries of the Mediterranean Basin: An Ethnobotanical Overview. Plants (Basel): 11(23):3272. doi: 10.3390/plants11233272.

Mwambete KD. 2009. The in vitro antimicrobial activity of fruit and leaf crude extracts of *Momordica charantia*: a Tanzania medicinal plant. Afr Health Sci.:9(1):34-9. PMID: 20842240; PMCID: PMC2932517.

Nascimento, K. D. O. D., Paes, S. D. N. D., & Augusta, I. M.. 2018. A Review 'Clean Labeling': Applications of Natural Ingredients in Bakery Products. Journal of Food and Nutrition Research, 6(5), 285-294. doi: 10.12691/jfnr-6-5-2

Negi PS. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. Int J Food Microbiol.: 156(1):7-17. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006.

Pereira AP, Ferreira IC, Marcelino F, Valentão P, Andrade PB, Seabra R, Estevinho L, Bento A, Pereira JA. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. Molecules:12(5):1153-62. doi: 10.3390/12051153.

Pieroni A. 2000. Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. J Ethnopharmacol:70(3):235-73. doi: 10.1016/s0378-8741(99)00207-x.

Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Ethnopharmacol: 118(3):418-28. doi: 10.1016/j.jep.2008.05.005.

Rafael M, Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. 2011. Topical anti-inflammatory plant species: Bioactivity of *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera periclymenum* fruits. Industrial Crops and Products, 34(3): 1447-1454. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.021>.

Roselló-Soto E, Koubaa M, Moubarik A, Lopes RP, Saraiva JA, Boussetta N, Grimi N, Barba FJ. 2015. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds, Trends in Food Science & Technology, 45(2): 296-310. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.003>.

Sherief DI, Fathi MS, Abou El Fadl RK. 2021. Antimicrobial properties, compressive strength and fluoride release capacity of essential oil-modified glass ionomer cements-an *in vitro* study. Clin Oral Investig: 25(4):1879-1888. doi: 10.1007/s00784-020-03493-0.

Silva V, Falco V, Dias MI, Barros L, Silva A, Capita R, Alonso-Calleja C, Amaral JS, Igrejas G, C F R Ferreira I, Poeta P. 2020. Evaluation of the Phenolic Profile of *Castanea sativa* Mill. By-Products and Their Antioxidant and Antimicrobial Activity against Multiresistant Bacteria. Antioxidants (Basel): 9(1):87. doi: 10.3390/antiox9010087.