

---

**Atividade biológica e perfil fitoquímico do extrato aquoso de  
*Chrysobalanus icaco*****Biological activity and phytochemical profile of the aqueous extract of  
*Chrysobalanus icaco***

---

**Matheus de Lima Cavalcanti**ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-9693-4137>

Universidade de Pernambuco – UPE, Brasil

E-mail: [matheus.lcavalcanti@upe.br](mailto:matheus.lcavalcanti@upe.br)**Maria Clara de Sousa Santana**ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7149-5002>

Universidade de Pernambuco – UPE, Brasil

E-mail: [clara.sousa@upe.br](mailto:clara.sousa@upe.br)**Daniel Medeiros Nunes**ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0624-9459>

Universidade de Pernambuco – UPE, Brasil

E-mail: [daniel.medeirosnunes@upe.br](mailto:daniel.medeirosnunes@upe.br)**George Souza Feitoza**ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8534-7334>

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brasil

E-mail: [georgesouza1@hotmail.com](mailto:georgesouza1@hotmail.com)**Maiara Bernardes Marques**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1048-3945>

Universidade de Pernambuco – UPE, Brasil

E-mail: [maiarabernardes.marques@upe.br](mailto:maiarabernardes.marques@upe.br)**Moan Jéfter Fernandes Costa**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7250-5863>

Universidade de Pernambuco – UPE, Brasil

E-mail: [moan.jefter@upe.br](mailto:moan.jefter@upe.br)**Pedro Henrique Sette-de-Souza**ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9119-8435>

Universidade de Pernambuco – UPE, Brasil

E-mail: [pedro.souza@upe.br](mailto:pedro.souza@upe.br)**Priscilla Barbosa Sales de Albuquerque**ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6310-1365>

Universidade de Pernambuco – UPE, Brasil

E-mail: [priscilla.albuquerque@upe.br](mailto:priscilla.albuquerque@upe.br)**Natalie Emanuelle Ribeiro Rodrigues**ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2235-729X>

Universidade de Pernambuco – UPE, Brasil

E-mail: [natalie.rodrigues@upe.br](mailto:natalie.rodrigues@upe.br)

---

## RESUMO

O presente trabalho teve como proposta avaliar a capacidade antioxidante e hemolítica do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco* Linnaeus (EAF*ci*) por meio dos métodos de sequestro de radicais DPPH e ABTS, investigação da capacidade antioxidante total (AAT), atividade bactericida e avaliação da atividade hemolítica em eritrócitos humanos. O extrato reduziu 50% do DPPH inicial, superando o IC<sub>50</sub> nas menores concentrações. A AAT pelo ensaio do fosfomolibdênio demonstrou que a concentração necessária para reduzir 50% do reagente foi semelhante ao ácido ascórbico. Foi possível identificar boa atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical ABTS, bem como ação antimicrobiana. O EAF*ci* não apresentou ação hemolítica nas concentrações testadas. Com base nesses dados podemos concluir que o EAF*ci* não possui citotoxicidade e apresenta atividade antioxidante, despontando como uma alternativa promissora no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** Antioxidante; Eritrócitos humanos; Plantas medicinais; Produtos naturais; Saúde Pública.

---

## ABSTRACT

The purpose of this work was to evaluate the antioxidant and hemolytic capacity of the aqueous extract of the leaves of *Chrysobalanus icaco* Linnaeus (EAF*ci*) by using the DPPH and ABTS radical scavenging methods, by investigating the total antioxidant capacity (AAT), bactericidal activity and the evaluation of the hemolytic activity in human erythrocytes. The extract reduced 50% of the initial DPPH, surpassing the IC<sub>50</sub> in the lowest concentrations. AAT by phosphomolybdenum assay showed that the concentration required to reduce 50% of the reagent was similar to ascorbic acid. It was possible to identify good antioxidant activity by the ABTS radical scavenging method, as well as antimicrobial action. EAF*ci* did not show hemolytic action at the tested concentrations. Based on these data, we can conclude that EAF*ci* does not have cytotoxicity and presents antioxidant activity, depicting as a promising alternative in the treatment of diseases related to oxidative stress.

**Keywords:** Antioxidant; Human erythrocytes; Medicinal plants; Natural products; Public health.

---

## INTRODUÇÃO

A investigação de plantas com potencial medicinal oferece uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, uma vez que a biodiversidade brasileira tem sido uma fonte rica e diversificada de compostos biologicamente ativos (Linhares et al., 2022). Ao longo dos séculos, as civilizações tradicionais têm se beneficiado dos extratos vegetais devido às suas propriedades antioxidantes, hemolíticas e antimicrobianas, e a ciência moderna continua a explorar esse vasto tesouro de recursos naturais (Silva et al., 2016; Sette-de-Souza et al., 2023; Sette-de-Souza et al., 2021; Silva et al., 2018; Macedo-Costa et al., 2014; Macedo-Costa et al., 2017; Sette-de-Souza et al., 2014; Sette-de-Souza et al., 2020a; Sette-de-Souza et al., 2020b).

Essa investigação pode abrir novas portas para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e seguros, bem como fornecer subsídios para a conservação da biodiversidade e o aproveitamento sustentável das plantas com propriedades medicinais (Dutra, 2016). Baseado nisso e na crescente ameaça da resistência bacteriana aos antibióticos tradicionais, a ciência tem procurado suprir uma demanda urgente por novas estratégias no combate às infecções microbianas (Larsson, 2022). Nesse cenário, o estudo de plantas com potencial de atividade antibacteriana tem-se tornado uma área de pesquisa de relevância conhecida (Dutra, 2016). Dentre as inúmeras espécies vegetais estudadas, destaca-se a *Chrysobalanus icaco* Linnaeus, uma planta conhecida por suas propriedades medicinais e potencial terapêutico contra diversas condições patológicas (Barbosa, 2013; Venancio, 2016; White, 2016).

Para além disso, produtos naturais com atividades antioxidantes têm despertado o interesse atual da ciência, pois, nos sistemas biológicos, o estresse oxidativo é consequência de um aumento das quantidades de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em relação às defesas antioxidantes celulares (Andrade et al., 2010). As EROs podem causar diversos efeitos prejudiciais ao organismo, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Barreiros et al., 2006).

A *C. icaco* L. é utilizada na medicina popular de diferentes maneiras para o tratamento de diversas patologias como diabetes, diarreia e inflamação (Oliveira et al., 2014). Estudos farmacológicos do extrato aquoso das folhas demonstraram propriedades

hipoglicemiantes, anti-inflamatórias e auxiliadoras no emagrecimento (White et al., 2016).

Estudos fitoquímicos sobre o extrato aquoso da planta *C. icaco* L. apontam a presença de flavonoides como a mirecetina e a quercetina (Oliveira et al., 2014; Ribeiro et al., 2020). Diversas plantas são ricas em moléculas que contêm núcleos fenólicos, como flavonoides e ácidos fenólicos, além de alcaloides e taninos, substâncias que se destacam como antioxidantes pela sua capacidade de sequestrar radicais livres e exercer atividade antibacteriana (Nascimento Junior, 2016). Assim, na tentativa de encontrar novos vegetais com esse espectro amplo de ação, o objetivo deste estudo foi investigar a capacidade antibacteriana, antioxidante e citotóxica, *in vitro*, do extrato aquoso das folhas de *C. icaco* (EAF*Ci*) com a expectativa futura de que os resultados deste trabalho possam contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas potencialmente efetivas em reduzir o estresse oxidativo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material vegetal**

O material botânico foi coletado no município de Itamaracá (7°46'39,29"S/34°50'4,27"O), estado de Pernambuco, Brasil. Uma amostra da espécie foi identificada pela Dra. Leidiana Lima, e um exemplar de *C. icaco* L. foi depositado no herbário da Universidade Federal Rural de Pernambuco com número de referência 83131. O acesso ao uso da planta para fins de pesquisa foi autorizado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN - nº A7A0B4E).

Para obtenção do extrato aquoso, as folhas foram secas em estufa a 40 °C e trituradas. Em seguida, o pó (50 g) foi submetido à extração em água destilada (1000 mL) a 100 °C durante 15 min. Após este período, o extrato foi filtrado, concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e seco em liofilizador. O protocolo foi repetido até se obter uma quantidade suficiente para realização do protocolo experimental. O extrato aquoso foi denominado EAF*Ci*, armazenado a 4 °C e solubilizado em solução salina nas concentrações desejadas minutos antes da realização dos experimentos.

### **Caracterização fitoquímica**

#### **Cromatografia em Camada Delgada**

A análise do perfil fitoquímico foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). EAFCi foi pesado e ressuspendido em solventes para se obter uma concentração final de 5 mg/mL. O sistema de solventes utilizado foi Hex/AcOEt/MeOH (3:5:2) v/v/v. Após o desenvolvimento do sistema de solventes, as placas foram secas e pulverizadas com os reveladores específicos para a identificação dos compostos metabólicos: Dragendorff's (alcaloides), Liebermann-Burchad (terpenos e esteroides), cloreto de alumínio (flavonoides), cloreto férrico (taninos) e hidróxido de potássio (cumarinas e antraquinonas). Como desenvolvedores universais, anisaldeído e sulfato cérico foram utilizados. Os cromatogramas foram examinados sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e pulverizados com reagente revelador para visualizar os compostos separados.

### **Quantificação de Metabólitos Especializados**

A determinação do teor de polifenóis totais foi realizada pelo método de Chandra e Mejía (2004). Em 1 mL da solução aquosa do extrato adicionou-se 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 1N, e esta mistura permaneceu em repouso por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se 2 mL de uma solução aquosa de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 20% (p/v), e a mistura permaneceu em repouso por mais 10 min. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 757 nm em espectrofotômetro (Shimadzu® UV mini – 1240) contra um branco composto por água destilada, reagente de Folin-Ciocalteu e solução a 20% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A obtenção da curva analítica foi obtida a partir de uma solução padrão de 100 µg/mL de ácido gálico. A concentração de polifenóis foi expressa em micrograma por miligramas de extrato equivalentes de ácido gálico.

A determinação do conteúdo de flavonoides totais seguiu o método de Meda et al. (2005). A 5 mL de cada solução (em metanol) do extrato foi adicionado o mesmo volume de uma solução (em metanol) de AlCl<sub>3</sub> a 2% (p/v). A mistura permaneceu em repouso por 10 min antes da leitura da absorbância a 415 nm contra um branco composto pela solução de AlCl<sub>3</sub>. A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão a 100 µg/mL de quercetina em metanol. A concentração de flavonoides foi expressa em micrograma por miligramas de extrato equivalentes de quercetina.

### **Atividade antioxidante**

#### **Avaliação da Atividade antioxidante pelo método DPPH**

A atividade antioxidante *in vitro* de EAFCi foi avaliada pelo método via doação de hidrogênio usando o radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Todo ensaio

foi avaliado em triplicata e a atividade de inibição foi calculada em porcentagem de redução do DPPH. A substância padrão utilizada foi similar à vitamina C (Trolox®). A porcentagem de inibição (I%) foi calculada pela seguinte equação:  $I\% = [(Ac-As) / (Ac)] \times 100$ , onde Ac é a absorbância do controle e As é a absorbância da amostra (BLOIS, 1958).

### **Avaliação da Atividade antioxidante pelo método ABTS**

A atividade de eliminação de radicais ABTS foi medida de acordo com Re et al. (1999). O radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) foi obtido pela reação de 5 mL de solução de ABTS 7 mM com 88 µL de persulfato de potássio 140 mM. A absorbância das soluções foi tomada a 734 nm. A porcentagem de inibição do radical ABTS foi calculada usando a equação  $\{[(Abs \text{ controle} - Abs \text{ amostra}) / Abs \text{ controle}] \times 100\}$ . O Trolox® foi utilizado como padrão e a capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC) foi expressa em µM trolox / g de extrato.

### **Investigação da Capacidade Antioxidante Total (AAT)**

A capacidade antioxidante total do extrato aquoso das folhas de *C. icaco* foi avaliada pelo método espectrofotométrico através do fosfomolibidênio, determinando a redução de  $Mo^{4+}$  para  $Mo^{5+}$ , com subsequente formação de fosfato de  $Mo^{5+}$ , com absorção máxima em 695 nm (Aguilar; Pineda; Prieto; 2013). O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como substância padrão. A AAT foi expressa em porcentagem através da equação:  $AAT (\%) = [(Ab - Ab \times 100) / (Aa - Ab)]$ , onde AAT é a absorbância na presença do extrato, Ab é absorbância do controle (branco: sem extrato) e Aa é absorbância do ácido ascórbico.

### **Avaliação da Atividade hemolítica em eritrócitos humanos**

As hemácias humanas do sangue periférico foram obtidas de voluntários saudáveis e serviram como modelo para avaliar a atividade hemolítica. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução salina (NaCl 0,9 %, p/v) e centrifugados (2500 rpm /5 min). O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos ressuspensos em solução de NaCl 0,9 % para se obter uma suspensão de eritrócitos a 0,5 % (p/v). Este ensaio foi realizado em tubo de ensaio: foram distribuídos 5 mL da solução de hemácias a 0,5 % (controle negativo) e 4 mL e 975µL de água destilada + 25 µl de hemácias no controle positivo. Em seguida, foi pipetada a amostra no volume correspondente a cada concentração teste (60 µL, 120µL,

240µL, 480µL, 960µL, 1920µL, 3840µL) previamente definida pela fórmula  $C1 \times V1 = C2 \times V2$ . Após incubação por 1 h, a temperatura ambiente, o sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Todo protocolo experimental foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Integrado de Saúde Amaury de Medeiros - CISAM/UPE, sob número de parecer 4.287.742.

### Atividade antimicrobiana

Os micro-organismos utilizados neste estudo foram cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 700610), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Candida albicans* (ATCC MYA-2876). Os microrganismos congelados em glicerol e BHI (Brain Heart Infusion) foram lentamente descongelados até temperatura ambiente e ativados através da adição de 20 µL do pool de microrganismos em 1 mL de caldo BHI, sendo incubado a  $37 \pm 1$  °C durante 24 h. Após esse período, 10 µL do crescimento de cada microrganismo foi semeado por esgotamento em uma placa de Petri contendo ágar BHI, sendo novamente incubado a  $37 \pm 1$  °C durante 24 h.

Para a padronização dos inóculos, seguiu-se o método preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (2017). Em tubos de 5 mL de solução salina estéril a 0,9 %, suspendeu-se UFC (unidades formadoras de colônia). A suspensão microbiana foi, então, ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm ao equivalente a  $10^6$  UFC/mL para *S. mutans* e *E. faecalis*, enquanto para *C. albicans*, o comprimento de onda foi de 530 nm, equivalente a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. Então, para cada cepa estudada, 100 µL das amostras (previamente diluídas em água destilada e ajustadas à concentração final de 2 mg/mL) foram diluídas em série com caldo Mueller Hinton estéril em uma placa de 96 poços. As diluições ocorreram de tal forma que no primeiro poço se teve concentração de 1 mg/mL de cada amostra estudada. Em seguida, dez microlitros do inóculo com cada microrganismo foram adicionados em todos os poços em suas respectivas placas. Os controles positivos e negativos foram feitos, respectivamente, com Digluconato de Clorexidina a 0.12 % (Sigma-Aldrich) para bactérias, Nistatina (Sigma-Aldrich) para fungos, e água destilada. Então, as placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 24 h e o crescimento microbiano foi indicado pela adição de 20 µL da solução aquosa de resazurina a 0,01 % com a posterior incubação a  $37 \pm 1$  °C por 2 h. Micro-organismos viáveis reduzem o corante mudando sua coloração azul para

rosa e a CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da resazurina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Composição fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco*

Foi possível identificar a presença de taninos e flavonoides no EAFCi (Tabela 1). Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com o perfil químico esperado para as espécies da família Chrysobalanaceae (BARBOSA et al., 2006). Além disso, nossos resultados corroboram com os achados de Onilude et al. (2020) e Ribeiro et al. (2020). Eles observaram que um dos principais compostos fitoquímicos presentes no extrato aquoso das folhas da planta é a miricetina, um composto flavonoide e também considerado um importante marcador taxonômico para a espécie (Onilude; Kazeem; Adu; 2020; Ports et al., 2013).

**Tabela 1.** Prospecção fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *C. icaco*.

Classe química	Alcaloides	Flavonoides	Taninos	Triterpenoides	Antraquinona de Cumarina
Procedimentos de extração	Dragendorff	Cloreto de Alumínio/ Sulfato cérico	Cloreto Férrico	Lieberman/ Anisaldeído/ Sulfato cérico	Hidróxido de Potássio
Extrato	-	+	+	-	-

(-) Não detectável; (+) Presente

Ainda acerca dos metabólitos, nosso estudo quantificou polifenóis totais ( $598,86 \pm 10,06 \mu\text{g}/\text{mg}$  Equivalente de Ácido Gálico) e flavonoides ( $58,96 \pm 4,30 \mu\text{g}/\text{mg}$  Equivalente de Quercetina) no extrato estudado. A presença dos compostos mencionados, nas concentrações reportadas, são fatores que podem explicar os efeitos biológicos (antioxidante, fotoprotetor e antimicrobiano) da planta em questão. Nesse sentido, registra-se que o teor dos compostos fenólicos está semelhante ao encontrado em outra



espécie por Sette-de-Souza et al (2020a), enquanto que o teor de flavonoides foi quase o dobro do encontrado pelos autores.

Frutas, grãos e folhas são ricos em flavonoides, substância que faz parte da família dos polifenóis. Esses compostos são conhecidos por seus diversos efeitos fitoquímicos, tais como: capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antifúngica, dentre outras (Rice-Evans, 2001; Ribeiro et. al., 2020).

## **Atividade Antioxidante**

### **Avaliação da Atividade antioxidante pelo método DPPH**

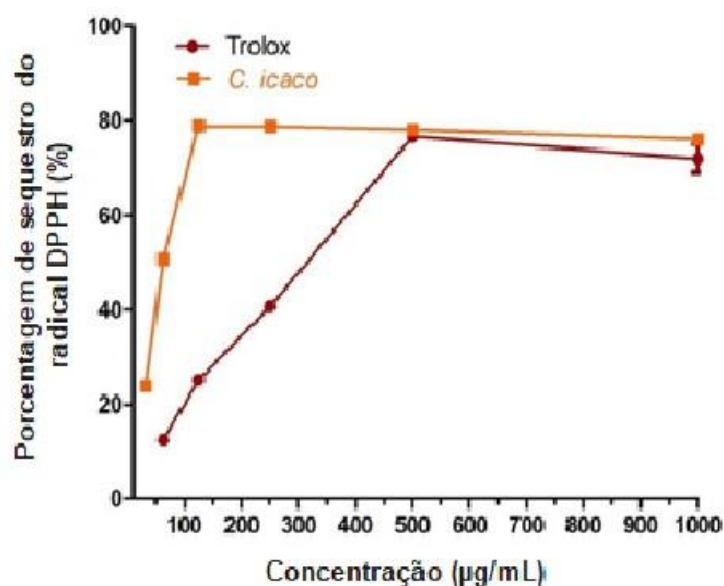
O método baseado no uso do radical livre estável difenilpicrilhidrazil (DPPH) é considerado a base do estudo de uma substância com potencial para atividade antioxidante (Sharma; Bhat, 2008). Ainda, este método tem como objetivo calcular o parâmetro  $IC_{50}$ , que representa a “concentração eficiente”, ou seja, a concentração de um extrato necessária para que ocorra a perda de 50% da atividade do DPPH (Molyneux, 2004). Neste trabalho, uma curva linear foi montada para determinar a porcentagem de inibição (I%) do DPPH como proposto por Blois (1958). A tabela 2 demonstra os resultados da I% do EAFCi testado em concentrações que variaram de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  a 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Onde todas as concentrações foram capazes de sequestrar radicais DPPH com I% superior a 20 %. Ainda, a porcentagem de sequestro do radical DPPH foi similar ou até superior nas menores doses quando comparado ao controle positivo. O gráfico 1, por sua vez, reporta a comparação entre I% das diferentes concentrações de EAFCi testadas e o controle positivo Trolox®; neste caso, a concentração efetiva de amostras necessárias para reduzir em 50% o DPPH inicial ( $IC_{50}$ ) do EAFCi foi superior ao Trolox® em todas as concentrações testadas.

**Tabela 2:** Porcentagem de sequestro do radical DPPH em diferentes concentrações do extrato aquoso de *C. icaco*.

<i>Extrato aquoso de C. icaco</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	DPPH (I %)
1000	$76,08 \pm 0,53$
500	$78,14 \pm 0,20$
250	$78,83 \pm 0,10$
125	$78,83 \pm 0,00$
62,5	$50,60 \pm 0,26$
31,25	$23,41 \pm 1,37$

Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

**Gráfico 1:** Porcentagem de sequestro do radical DPPH do extrato aquoso de *C. icaco* em relação ao controle positivo Trolox®.



Com base nos achados, podemos inferir que o EAFCi tem um bom potencial antioxidante mesmo nas menores doses testadas, com a dose de 62,5 µg/mL do extrato sendo capaz de superar o parâmetro IC<sub>50</sub> com 50,60 ± 0,26 %. Outrossim, é importante salientar que o ensaio da capacidade antioxidante foi realizado com o extrato aquoso das folhas. Os dados encontrados na literatura são escassos, levando a dificuldade na comparação de resultados.

### **Avaliação da Atividade antioxidante pelo método ABTS**

A Tabela 4 apresenta os resultados de atividade antioxidante das diferentes concentrações do extrato, variando de 31,25 µg/mL a 1000 µg/mL, determinado pelo método de sequestro do radical livre ABTS. De acordo com Re et al. (1999), o método cromatográfico da captura do radical ABTS consiste numa importante ferramenta para determinar a atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas. Os resultados do teste foram calculados segundo a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox® e, após análise por espectrofotômetro, foi possível determinar quanto do radical ABTS foi capturado pelo EAFCi quando comparado ao controle (Gonçalves et al., 2017). EAFCi demonstrou boa atividade antioxidante, com taxas de sequestro de 49,31 ± 3,45 % do radical ABTS na concentração de 500 µg/mL e 65,65 ± 6,04 % na concentração de 1000 µg/mL.

**Tabela 4:** Porcentagem de sequestro do radical ABTS em diferentes concentrações do extrato aquoso de *C. icaco*.

<i>Extrato aquoso de C. icaco (µg/mL)</i>	<b>ABTS (%)</b>
<b>1000</b>	65,65 ± 6,04
<b>500</b>	49,31 ± 3,45
<b>250</b>	22,90 ± 1,53
<b>125</b>	20,00 ± 0,64
<b>62,5</b>	16,34 ± 0,53
<b>31,25</b>	13,28 ± 1,04

Os resultados são expressos como média ± DP (n = 3).

### Capacidade Antioxidante Total (AAT)

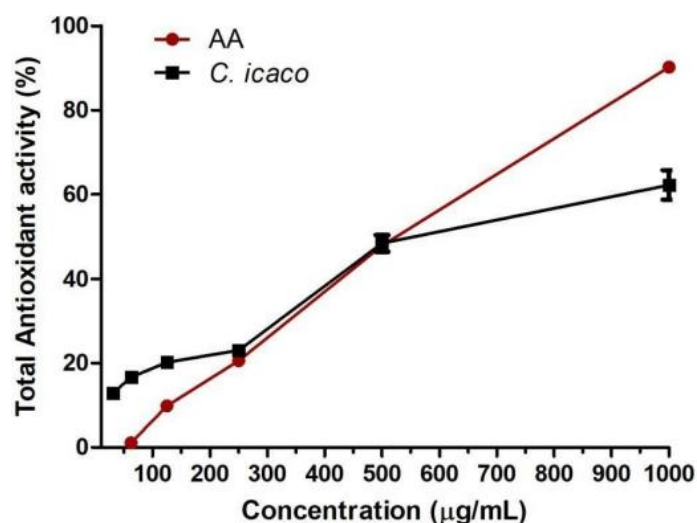
O método do complexo fosfomolibdênio empregado para determinar a atividade antioxidante total (AAT) consiste na mudança de coloração da solução durante a redução do  $\text{Mo}^{4+}$  para  $\text{Mo}^{5+}$ , sendo considerado uma forma simples, de baixo custo e, portanto, bastante útil para a análise do EAFCi (Araújo et al. 2020). Na Tabela 3 estão contidos os resultados da absorvância do EAFCi no ensaio do fosfomolibdênio para aferir a AAT, descrita por Aguilar et al. (2013), nas concentrações que variam de 31,25 µg/mL a 1000 µg/mL. Foi montada uma curva linear, expressa no Gráfico 2, que demonstra a absorvância na presença do extrato quando comparada ao controle positivo do ácido ascórbico. No Gráfico 2 é possível observar que a concentração necessária para reduzir 50% do  $\text{Mo}^{4+}$  para  $\text{Mo}^{5+}$ , com subsequente formação de fosfato de  $\text{Mo}^{5+}$ , foi semelhante ao ácido ascórbico. Contudo, o conteúdo presente em 1000 µg/mL do EAFCi apresentou ação antioxidante inferior quando comparado ao equivalente do controle positivo.

**Tabela 3:** Porcentagem da capacidade antioxidante total em diferentes concentrações do extrato aquoso de *C. icaco*.

Extrato aquoso de <i>C. icaco</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	ATT (%)
1000	68,09 $\pm$ 7,66
500	32,16 $\pm$ 4,08
250	14,99 $\pm$ 2,39
125	7,42 $\pm$ 1,98
62,5	3,46 $\pm$ 2,08
31,25	1,93 $\pm$ 0,18

Os resultados são expressos como média  $\pm$  DP (n = 3).

**Gráfico 2:** Porcentagem da capacidade antioxidante total em diferentes concentrações do extrato aquoso de *C. icaco* em relação ao controle positivo Ácido ascórbico.



Os produtos naturais são usados em todo o mundo devido às suas propriedades farmacológicas já estabelecidas (Machado; Fernandes Júnior, 2011). Várias patologias estão relacionadas com a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS). Esses radicais livres podem levar ao estresse oxidativo e danificar a estrutura das

biomoléculas e, com isso, ocasionar disfunções celulares e até mesmo a morte celular (Sun; Zhang; Zkang, 2011). As plantas medicinais são capazes de produzir várias moléculas com ação antioxidante, sendo, portanto, uma alternativa para o controle e tratamento de várias doenças (Mishra; Ojha; Chaudhury, 2012). *C. icaco* se mostrou uma alternativa promissora ao combate às EROs devido ao potencial antioxidante evidenciado neste estudo, neste caso demonstrado pela capacidade antioxidante atrelada à presença dos flavonoides de EAFCi.

### **Determinação da Atividade hemolítica em eritrócitos humanos**

O EAFCi não foi capaz de causar lise dos eritrócitos nas concentrações testadas até 3840 µg/mL, portanto a CE50 (concentração média capaz de provocar 50 % do efeito máximo) > 3840 µg/mL. Esse ensaio foi realizado visando avaliar a capacidade que o extrato tem de provocar danos nas membranas de eritrócitos humanos, uma vez que a ruptura de eritrócitos é uma barreira para implantação dos ensaios *in vivo* (Pietkiewicz et al., 2010). Sendo assim, é possível afirmar que o EAFCi não apresenta ação citotóxica, entretanto, são necessários estudos adicionais com concentrações superiores para investigar em qual concentração o extrato em estudo é capaz de causar hemólise em eritrócitos humanos. Essa baixa toxicidade é um fator interessante para o desenvolvimento de produtos antimicrobianos (Sette-de-Souza et al., 2020a), tendo em vista que o EAFCi foi capaz de inibir o crescimento de microrganismos de interesse odontológico ao passo de que não causou danos nas membranas de eritrócitos humanos.

### **Atividade antibacteriana do extrato aquoso das folhas de *Chrysobalanus icaco***

A resistência bacteriana e fúngica são desafios crescentes na área da saúde, tornando esse estudo relevante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, sendo assim, foram investigadas cepas dentro desse padrão, estacando-se *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* (Fumes, 2018). O *S. mutans* é uma bactéria comumente encontrada na cavidade oral e é conhecida por desempenhar um papel significativo no desenvolvimento de doenças bucais biofilme dependentes (Lemos, 2019). O *E. faecalis* pode causar uma variedade de doenças, especialmente quando se torna uma bactéria oportunista e infecta o trato urinário, além de causar sepse ao cair na corrente sanguínea (Herrera-Hidalgo, 2020). Já a *Candida albicans* é um fungo que normalmente faz parte da microbiota natural do corpo humano, encontrando-se principalmente na boca, no trato gastrointestinal e na vagina, que assim como os outros

microrganismos, em homeostase não causa problemas significativos. No entanto, pode-se multiplicar descontroladamente e causar infecções cutânea, vaginal e sistêmica (Hsu, 2021).

Os valores referentes à concentração inibitória mínima atingiram valores entre 250 µg/ml para o *E. faecalis* e 1000 µg/ml para a *C. albicans*. Em comparação a diversos outros antibióticos de uso clínico e comercial, o metronidazol, a amoxicilina e a azitromicina apresentaram concentração inibitória mínima de 20, 30 e 10 µg, respectivamente, na análise contra cepas padrão cariogênicas e periodontopatogênicas, de importância odontológica (Abullais Saquib, 2021).

Analisando o *E. faecalis* em cepas padrão (ATCC 29212) e selvagem (MB146), o estudo de Sette-de-Souza (2020b) encontrou valores de 60 µg e 120 µg, respectivamente, quando testadas contra a clorexidina, um potente bactericida utilizado contra microorganismos bucais. Apesar de menores do que o valor encontrado para os extratos testados neste trabalho, o valor é semelhante aos extratos hidroalcoólicos da *Schinopsis brasiliensis*, que atingiu CIM de 500 µg/mL contra cepas padrão de *E. faecalis* e *S. mutans* (Sette-de-Souza et al., 2020a; Sette-de-Souza et al., 2020b), e valores bem menores do que a *Punica granatum*, que chegou a apresentar valores de 5210 µg/mL contra cepas de interesse odontológico (Abullais Saquib, 2021) e de 780 µg/mL quando o extrato aquoso da *Nepeta Deflersiana* contra bactérias orais (Ahmad I, 2021).

Em relação a atividade antifúngica, nem o extrato etanólico nem o extrato aquoso de *Rhaphiodon echinus* mostraram uma atividade clinicamente relevante (MIC < 1024 mg/mL) contra a *C. albicans* testada (Costa, 2017), em comparação com antifúngicos de ação conhecida, como a nistatina, que chega a apresentar MIC de 50 µg/mL (Sartoratto, 2004). Esses resultados são compatíveis com os apresentados neste trabalho. Mas, ainda assim, Sartoratto et al. (2004), define o potencial antifúngico como forte quando a CIM atinge valores inferiores a 500 µg/mL, moderado entre 600 µg/mL–1500 µg/mL e fraco quando os valores da CIM foram superiores a 1500 µg/mL. Dessa forma, o *C. icaco* pode apresentar ainda mais potencial contra cepas bacterianas e fúngicas ao ser testado em valores maiores da sua concentração nos extratos analisados, além de possíveis modificações na coleta da espécie vegetal, pois variações sazonais e regiões de coleta podem trazer alterações na composição fitoquímica dos extratos vegetais (Sharifi-Rad, 2018).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato de *C. icaco* demonstrou não ser tóxico para os eritrócitos humanos nas concentrações testadas, ao mesmo tempo em que exibiu atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem que tais efeitos benéficos possivelmente estão relacionados à presença de flavonoides no extrato. Essas descobertas são de grande importância, uma vez que abrem novas perspectivas para pesquisas adicionais em busca de alternativas terapêuticas e para o desenvolvimento de produtos direcionados ao controle de doenças bucais dependentes de biofilme.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, bem como da agência de fomento aos processos 88881.692858/2022-01 e 88887.798320/2022-00 do PDPG-POSDOC (PDPG - Programa de Pós-Doutorado Estratégico). Os autores ainda agradecem ao Laboratório Multiusuário de Biotecnologia do Sertão Pernambucano (BIOSPE) pelo suporte durante as atividades desenvolvidas.

## CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não tem conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ABULLAIS SAQUIB, S. et al. Synergistic antibacterial activity of herbal extracts with antibiotics on bacteria responsible for periodontitis. **J Infect Dev Ctries**, Nov 30;15(11):1685-1693. doi: 10.3855/jidc.14904, 2021.
- AHMAD, I. et al. Inhibitory Effect of *Nepeta deflersiana* on Climax Bacterial Community Isolated from the Oral Plaque of Patients with Periodontal Disease. **Molecules**, Jan 3;26(1):202. doi: 10.3390/molecules26010202, 2021.
- BARBOSA, A.P., et al. Antidiabetic effect of the *Chrysobalanus icaco* L. aqueous extract in rats. **J Med Food**. Jun;16(6):538-43. doi: 10.1089/jmf.2012.0084, 2013.
- C.L.S.I. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**, 4th Edition: Wayne, PA: 46 p. 2017.
- COSTA, A.R, et al. *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial. **Microb Pathog**, Jun;107:280-286. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.001, 2017.



DUTRA, R.C., CAMPOS, M.M., SANTOS, A.R., CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res.** 2016 Oct;112:4-29. doi: 10.1016/j.phrs.2016.01.021, 2016.

FUMES, A.C., DA SILVA TELLES, P.D., CORONA, S.A.M., BORSATTO, M.C. Effect of aPDT on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* present in the dental biofilm: Systematic review. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, Mar;21:363-366. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.01.013, 2018.

HERRERA-HIDALGO, L., et al. *Enterococcus faecalis* Endocarditis and Outpatient Treatment: A Systematic Review of Current Alternatives. **Antibiotics (Basel)**, Sep 30;9(10):657. doi: 10.3390/antibiotics9100657, 2020.

HSU, H., SHETH, C.C., VESES, V. Herbal Extracts with Antifungal Activity against *Candida albicans*: A Systematic Review. **Mini Rev Med Chem**, 21(1):90-117. doi: 10.2174/1389557520666200628032116, 2021.

LARSSON DGJ & FLACH CF. Antibiotic resistance in the environment. **Nat Rev Microbiol.** May;20(5):257-269. doi: 10.1038/s41579-021-00649-x. Epub 2021 Nov 4. PMID: 34737424; PMCID: PMC8567979, 2022.

LEMOS, J.A., et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Spectr.** Jan;7(1):10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018. PMID: 30657107; PMCID: PMC6615571, 2019.

MACEDO-COSTA, M.R. et al. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Solanum paniculatum* Linn. against planktonic oral bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 10, p. 1001-1005, 2014.

MACEDO-COSTA, M.R et al. *Solanum paniculatum* Linn: A potential antimicrobial agent against oral microorganisms. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 48, p. 1688-1692, 2017.

SETTE-DE-SOUZA, P. H. et al. Antimicrobial Activity of *Schinopsis brasiliensis* Engler Extract-Loaded Chitosan Microparticles in Oral Infectious Disease. **AAPS Pharm SciTech.** Aug 27;21(7):246. doi: 10.1208/s12249-020-01786-x. PMID: 32856115, 2020.

SETTE-DE-SOUZA, P. H. et al. *Schinopsis brasiliensis* Engl. to combat the biofilm-dependents diseases in vitro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 92, 2020a.

SETTE-DE-SOUZA, P. H. et al. Antimicrobial activity of *schinopsis brasiliensis* engler extract-loaded chitosan microparticles in oral infectious disease. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, p. 1-11, 2020b.

SETTE-DE-SOUZA, P. H. et al. Antibacterial activity and phytochemical screening of extracts of *Lippia alba* (Mill). **NE Brown. Afr J Microbiol Res**, v. 8, n. 29, p. 2783-87, 2014.

SETTE-DE-SOUZA, P. H. et al. Kuguacin: biological activities of triterpenoid from *Momordica charantia*—a scoping review. **Advances in Traditional Medicine**, v. 23, n. 1, p. 97-104, 2023.

SETTE-DE-SOUZA, Pedro Henrique et al. Two phytochemicals from *Schinopsis brasiliensis* show promising antiviral activity with multiple targets in Influenza A virus. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, 2021.

SHARIFI-RAD, M. , et al. Matricaria genus as a source of antimicrobial agents: From farm to pharmacy and food applications. **Microbiol Res.** 2018 Oct;215:76-88. doi: 10.1016/j.micres.2018.06.010. Epub 2018 Jun 25. PMID: 30172312.

SILVA, D. R. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Chenopodium ambrosioides* e *Ruta graveolens* sobre *Streptococcus mutans*. **Arch Health Invest**, v. 7, n. 4, 2018.

SILVA, N.B. et al. Ação antimicrobiana da farinha de banana verde sobre microrganismos presentes no biofilme dentário. **Revista e-ciência**, v. 4, n. 2, p. 26-31, 2016.

VENANCIO VP, MARQUES MC, ALMEIDA MR, MARIUTTI LR, SOUZA VC, BARBOSA F JR, PIRES BIANCHI ML, MARZOCCHI-MACHADO CM, MERCADANTE AZ, ANTUNES LM. *Chrysobalanus icaco* L. fruits inhibit NADPH oxidase complex and protect DNA against doxorubicin-induced damage in Wistar male rats. **J Toxicol Environ Health A.** 2016;79(20):885-93. doi: 10.1080/15287394.2016.1193454. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27494754.

WHITE PA, ARAÚJO JM, CERCATO LM, SOUZA LA, BARBOSA AP, QUINTANS-JUNIOR LJ, MACHADO UF, CAMARGO EA, BRITO LC, SANTOS MR. *Chrysobalanus icaco* L. Leaves Normalizes Insulin Sensitivity and Blood Glucose and Inhibits Weight Gain in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **J Med Food.** 2016 Feb;19(2):155-60. doi: 10.1089/jmf.2015.0034. PMID: 26854845.